

## Association of Polymorphism of LRP4 Gene (rs 4752947) among Post Menopausal Women with Osteoporosis in North of Iran

Saeid Kavosian<sup>1</sup>, Alimohammad Asgharian<sup>2\*</sup>, Ramin Ataei<sup>3</sup>

1-MSc in Cell and Molecular Biology, College of Basic Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

2-Assistant Professor, PhD of Cell and Molecular Biology, Department Cell and Molecular Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

3-Assistant Professor, PhD of Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

Received: 30 Apr 2016, Accepted: 10 Aug 2016

### Abstract

**Background:** Osteoporosis is described as a disorder and skeletal disease that decrease bone strength and increases the risk of a bone fractures. Genetic factors have effect role in the progression of the osteoporosis. The aim of this study was to investigate the association between LRP4 gene polymorphism with osteoporosis in a population of postmenopausal women from north of Iran.

**Materials and Methods:** In this case-control study, 80 female patients with osteoporosis and 80 healthy females without osteoporosis with average age of 45-60 has been investigated. After DNA extraction from genome samples, polymorphism of LRP4 (rs4752947) gene have been investigated by PCR-RFLP method. Data were analyzed by SPSS software.

**Results:** Our results showed no significant relationship between polymorphism of LRP4(rs4752947) gene and the risk of osteoporosis disease in two patients and control groups. Also, AT genotype and TT genotype compared with AA genotype increased the chance of disease by 1379 and 3.5, respectively. In addition, TT alleles compared with AA alleles, increased the chance of osteoporosis up to 1.605 times.

**Conclusion:** Of course, more complementary studies considering other LRP4 gene subtypes with more individuals for better findings are needed.

**Keywords:** LRP4, Osteoporosis, Polymorphism

\*Corresponding Author:

Address: Department of Cell and Molecular Biology, College of Basic Science, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

Email: mehranasgharian@yahoo.com

## همراهی پلی مورفیسیم ژن LRP4 (rs4752947) در زنان یائسه دچار پوکی استخوان شمال کشور

سعید کاووسیان<sup>۱</sup>، علی محمد اصغریان<sup>۲\*</sup>، رامین عطایی<sup>۳</sup>

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

۲- استادیار، دکتری تخصصی زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.

۳- استادیار، دکتری تخصصی داروسازی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۵/۲۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** استئوپورر یا پوکی استخوان، یک اختلال و بیماری اسکلتی با مشخصه بارز کاهش استحکام و تراکم بافت استخوانی است منجر به افزایش شکستگی استخوانها می شود. عوامل ژنتیکی فرد جزء عوامل موثر در پیشرفت این بیماری می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط پلی مورفیسیم ژن LRP4 با پوکی استخوان در خانمهای یائسه در شمال کشور بود.

**مواد و روشها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، ۸۰ بیمار استئوپروتیک و ۸۰ نفرخانم سالم (گروه شاهد) در دامنه سنی ۴۵ تا ۶۰ سال بررسی شدند. پس از استخراج DNA ژنومی، پلی مورفیسیم ژن (rs4752947) LRP4 با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز به روش هضم آنزیمی (PCR-RFLP) بررسی شد و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت.

**یافتهها:** نتایج تحقیق هیچ گونه ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسیم rs 4752947 ژن LRP4 و شانس ابتلا به بیماری استئوپورز بین دو گروه بیمار و کنترل را نشان نداد. هم چنین ژنوتایپ AT و ژنوتایپ TT نسبت به ژنوتایپ AA به ترتیب شانس ابتلا به بیماری را به میزان ۱/۳۷۹ و ۳/۵ برابر افزایش داد. علاوه بر این، آلل T در مقایسه با آلل A شانس ابتلا به پوکی استخوان را ۱/۶۰۵ بار افزایش داد.

**نتیجه گیری:** ارتباط بین پلی مورفیسیمهای ژنوتیپهای دیگر ژن LRP4 و پوکی استخوان مستلزم بررسی بیشتر در جمعیت های دیگر و بزرگ تر است.

**واژگان کلیدی:** پلی مورفیسیم، پوکی استخوان، ژن LRP4

\* نویسنده مسئول: ایران، تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی.

Email: mehranasgharian@yahoo.com

## مقدمه

خطر شکستگی را افزایش می‌دهند. آزمایشات ایمونوهیستوشیمی بیان کننده این می‌باشد که ژن LRP4 (پروتئین وابسته به لیوپروتئین با دانسیته پائین) در مسیر سیگنالینگ Wnt پروتئین اسکروستین سلول‌های هدف استوبلاست و استئوسیت را تنظیم می‌کند. پروتئین اسکروستین تولید استخوان‌های جدید را کند کرده یا متوقف می‌سازد. مطالعات نشان داده است که ارتباط بین اسکروستین و LRP4 برای عملکرد مهار اسکروستین در شکل‌گیری استخوان مورد نیاز است و به نقش جدیدی برای LRP4 در استخوان اشاره دارد. وجود LRP4 باعث مهار اسکروستین می‌گردد و مهار اسکروستین که به LRP5/6 باند شده است باعث مهار سیگنال WNT می‌گردد که این خود تشکیل استخوان را از بین می‌برد. و همچنین LRP4 به عنوان یک تنظیم کننده تراکم توده استخوانی ظهور می‌کند (۹). با بررسی پلی مورفیسم‌های مربوط به ژن LRP4 در پایگاه داده‌ها (NCBI) از بین پلی مورفیسم‌های موجود با توجه به معیارهایی هم چون اعتبار سنجی، میزان درصد فراوانی الل جهش یافته در جمعیت و جایگاه آن در ژن به بررسی rs4752947 در بیماران مبتلا به استئوپوروز در شمال کشور پرداختیم.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت موردی -شاهدی صورت گرفته است. جامعه آماری شامل ۱۶۰ نفر در محدوده سنی ۶۰-۴۵ سال از میان زنان یائسه مراجعه کننده به بیمارستان ولیعصر قائمشهر از سال ۱۳۹۲-۱۳۹۴ بودند. ۸۰ زن مبتلا به پوکی استخوان که با انجام تست رادیوگرافی پوکی استخوان در این افراد تشخیص داده شد و هم چنین ۸۰ نفر کنترل (بدون پوکی استخوان) به کمک سوابق پزشکی، انجام مصاحبه و طبق اصول اخلاقی با اخذ رضایت نامه کتبی توسط پرسش‌نامه بررسی شدند. معیارهای ورود شامل سن، جنس، فاکتورهای کلینیک و پاتولوژیک مانند شاخص توده بدنی Body Mass Density (BMD) می‌باشد و معیارهای خروجی مصرف الکل و دخانیات و بیماری‌های زمینه‌ای مانند روماتیسم مفصلی و کانسر استخوان می‌باشد. مطالعه با اخذ مجوز شماره مورخ ۹۴/۴/۱۳ مورخ ۹۴/۵/۱۴ شورای پژوهش دانشگاه آزاد

استئوپوروز یا پوکی استخوان به عنوان یک اختلال و بیماری اسکلتی، با مشخصه بارز کاهش قدرت استخوان می‌باشد که فرد بیمار را مستعد شکستگی استخوان می‌کند (۱). یکی از عوامل مهم ایجاد پوکی استخوان، عدم ساخته شدن استخوان به میزان کافی در دوران کودکی و نوجوانی است. این مسئله باعث می‌شود که حداکثر مقدار توده استخوانی به کمتر از مقدار مورد نیاز آن فرد برسد (۲). این کمبود (حداکثر توده استخوان)، مهم‌ترین عامل برای افزایش خطر ابتلا به پوکی استخوان در سنین بالاتر می‌باشد. در سنین پس از یائسگی، با کم شدن تولید هورمون استروژن میزان تحلیل در توده استخوان در زنان به شدت افزایش می‌یابد (۳). تحقیقات منتشر شده در نشریه سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد حدود ۴۰ درصد زنان و ۱۰ درصد مردان در طول زندگی خود با خطر ابتلا به پوکی استخوان مواجهند و در سرتاسر دنیا از هر ۳ زن، یک نفر و از هر ۵ مرد یک مرد بالای ۵۰ سال دچار پوکی استخوان هستند (۴). گزارش‌های وزارت بهداشت حاکی از آن است که در ایران حدود ۴/۵ درصد مردان و ۸ درصد زنان به بیماری پوکی استخوان مبتلا هستند. هم‌چنین تقریباً از هر ۴ زن ایرانی بالای ۵۰ سال، یک نفر به پوکی استخوان مبتلاست. علاوه بر این در همین گروه سنی ۳۵ درصد مردان و ۴۰ درصد زنان ضعف استخوانی (استئوپنی) دارند. فاکتورهای محیطی و ژنتیکی بر ایجاد تثبیت توده استخوانی موثر می‌باشد که سهم فاکتورهای ژنتیکی ۹۰-۶۰ درصد در تغییرات توده استخوانی افراد دخیلند (۵).

مطالعات گسترده ژنومی برای شناسایی لوکوس دخیل در استئوپوروز از سال ۲۰۰۷ آغاز شده و تاکنون مطالعات وسیع و زیادی در این مورد صورت گرفته است (۶، ۷). در مطالعات گذشته نشان داده شد که حداقل ۳۰ ژن در شیوع این بیماری نقش دارند (۸). محققان در بزرگترین مطالعه ژنتیکی از پوکی استخوان تا به امروز در بیش از پنجاه گروه تحقیقاتی در سراسر اروپا، امریکای شمالی، شرق آسیا و استرالیا بیشتر از هشتاد هزار نفر از افراد را مورد مطالعه قرار داده‌اند و دریافته‌اند که متغیرها در ۵۶ منطقه از ژنوم تحت تاثیر تراکم مواد معدنی استخوان هستند، در حالی که چهارده مورد از این وارینت‌ها

دستگاه ترموسایکلر مدل اپندورف ساخت آلمان انجام شد. برنامه کلی PCR شامل واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، واسرشته سازی چرخه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و طولی شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد در ۱ دقیقه در ۳۵ سیکل و سرانجام در نهایت طولی شدن نهایی ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. برای بررسی صحت قطعه به دست آمده محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد و در کنار نشان گر با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورزانجام شد. جهت هضم آنزیمی ۷ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ میکرولیتر از آنزیم ApoI (Thermo Scientific) و ۲ میکرولیتر بافر مورد نیاز آنزیم در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر براساس دستورالعمل آنزیم مخلوط شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. برای بررسی ژنوتیپی، محصول به دست آمده روی ژل آگاروز ۲ درصد قرار گرفت و در کنار نشان گر و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورزانجام شد. علاوه بر این برای تایید یافته‌های حاصل از هضم آنزیمی به روش PCR-RFLP، بر روی ده درصد از نمونه‌ها تعیین توالی انجام شد.

اسلامی واحد تکابن و رضایت‌نامه از افراد شرکت کننده انجام گردید.

### استخراج DNA

پس از جمع‌آوری نمونه‌های خون کامل، از نمونه‌های مورد مطالعه DNA ژنومیک از لکوسیت‌های خون محیطی با روش استاندارد رسوب دهی نمک استخراج گردید. پس از استخراج DNA از نمونه‌های مورد تحقیق به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت DNA و آگاهی از غلظت و میزان خالص بودن آن جذب نمونه نوری DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Nanodrop) در طول موج‌های ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm همراه بررسی در ژل آگاروز یک درصد بررسی شد.

### هضم آنزیمی

پلی مورفیسم ژن LRP4 (rs4752947) به وسیله روش مبتنی بر تکثیر و ایجاد ناحیه محدود کننده مورد بررسی قرار گرفت. برای تکثیر ناحیه مورد نظر از ۱ میکرولیتر DNA ژنومی، ۲ میلی مول MgCL<sub>2</sub>، ۱/۵ میکرومول dNTPs، ۱ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای اختصاصی (طراحی توسط نرم افزار Allel ID 6 (جدول ۱)، ۲ واحد آنزیم تک DNA پلیمرز Taq DNA Polymerase Fermentase) در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر با استفاده از

### جدول ۱. مشخصات آنزیم و پرایمرهای مورد استفاده

شماره IS	پرایمر
4752947	Forward: CCTTGCTCTATCAATCTGTGACT Reverse: TGAAGTCATGTCCTTTGAGTTCTC

### هضم آنزیمی

۲ درصد قرار گرفت و در کنار نشان گر و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید الکتروفورزانجام شد. علاوه بر این برای تایید یافته‌های حاصل از هضم آنزیمی به روش PCR-RFLP، بر روی ده درصد از نمونه‌ها تعیین توالی انجام شد.

### تحلیل آماری

آنالیزهای آماری با SPSS (نسخه ۲۲) و نرم افزار MedCalc انجام گرفت. از تحلیل واریانس دو طرفه، جهت بررسی اثر پلی مورفیسم بر BMD (Bone marrow density) استفاده شد. متغیرهای قابل اندازه‌گیری بین بیماران

جهت هضم آنزیمی ۷ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ میکرولیتر از آنزیم محدود کننده ApoI (Thermo Scientific) و ۲ میکرولیتر بافر مورد نیاز آنزیم در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر براساس دستورالعمل آنزیم مخلوط شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. این آنزیم در مورد ژنوتیپ جهش یافته (TT) برش ایجاد کرده و دو محصول با طول‌های ۱۳۶ bp و ۱۳۱ bp می‌دهد و برای بررسی ژنوتیپی، محصول به دست آمده روی ژل آگاروز

بود ( $p < 0.001$ ). با توجه به تست رادیوگرافی جهت تشخیص پوکی استخوان، میزان تراکم استخوانی در ناحیه مهره کمری و استخوان هیپ با دو معیار T.score و Z.score تعیین گردید. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان می‌دهد که میزان تراکم استخوانی در دو ناحیه مهره کمری و استخوان‌های هیپ در افراد بیمار تفاوت معنی‌داری با افراد گروه سالم (شاهد) داشت ( $p < 0.001$ ) (جدول ۲).

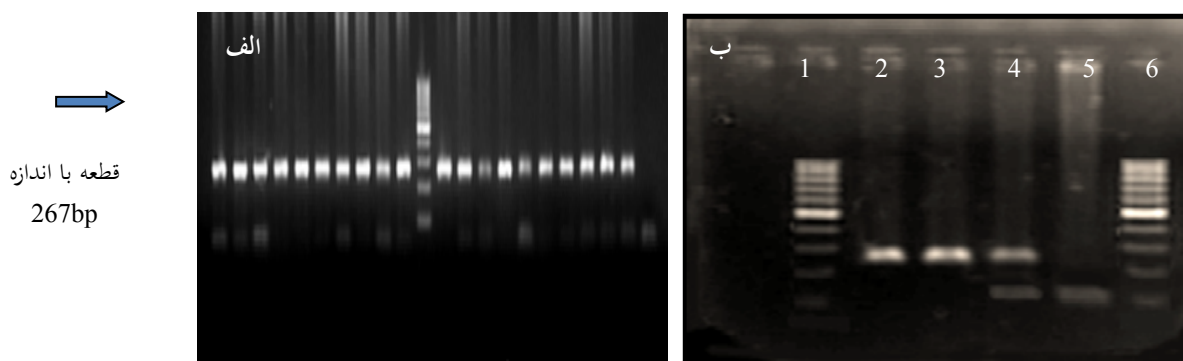
کلیه DNA های استخراج شده از کیفیت مطلوبی برخوردار بوده و میزان جذب نوری در ۲۸۰/۲۶۰ بیش‌تر از ۱٫۸ بود.

شکل ۱ به ترتیب نتیجه الکتروفورز محصولات PCR قبل و بعد از هضم آنزیمی را نشان می‌دهد. به طوری که شکل الف راندمان عملکرد واکنش زنجیره‌ای را در نمونه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. در شکل ب محصول تکثیر مورد هضم آنزیمی قرار گرفت تا الگوی بانندی زیر حاصل شود.

و کنترل‌ها با استفاده از independent student t-test مقایسه شده است و داده‌ها به صورت  $\text{mean} \pm \text{SD}$  ارائه شد. تفاوت‌های بین متغیرهای طبقه‌بندی شده، توزیع ژنوتایپ و معادله هاردی واینبرگ با آنالیز  $\chi^2$  یا Fisher exact test آزمایش شدند. ارتباط بین ریسک ژنوتایپ‌ها و بیماری استئوپوروز با odds ratio (OR) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد (CI) ارزیابی شد.

### یافته‌ها

در این مطالعه به طور کلی ۱۶۰ نفر زن یائسه در محدوده سنی ۶۰-۴۵ سال شرکت داشته‌اند. در این مطالعه ۸۰ نفر بیمار مبتلا به استئوپوروز (با میانگین سنی  $58/4 \pm 0/5$  و ۸۰ فرد شاهد و سالم با میانگین سنی  $55/14 \pm 0/56$  وارد مطالعه شده‌اند. طبق آزمون آماری کای دو نشان داده شده در جدول ۲ اختلاف میانگین سنی در دو گروه بیمار و کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود ( $p < 0.001$ ). هم‌چنین نشان داده شد که توزیع سن بین دو گروه شاهد و بیمار دارای توزیع نرمال



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR قبل (الف) و بعد از هضم آنزیمی (ب) روی ژل ۲ درصد. به ترتیب از چپ به راست: ۱- Ladder bp ۵۰۰، ۲- محصول برش نداده ۳- ژنوتیپ هموزیگوت وحشی A/A (-/-)، ۴- ژنوتیپ هتروزیگوت A/T (+/-) ۵- هموزیگوت جهش یافته T/T (+/+) ۶- Ladder bp ۵۰۰

جدول ۲. آنالیز آماری نتایج سن و BMD در دو گروه بیمار و سالم

سطح معنی داری	گروه کنترل (n=۸۰)	گروه بیمار (n=۸۰)	
<۰/۰۰۱	۵۵/۱۴±۰/۵۶	۵۸/۴±۰/۵	سن
<۰/۰۰۱	۱/۲۴±۰/۰۱	-۰/۸±۰/۰۱	تراکم استخوانی (BMD) مهره کمری (g/cm <sup>2</sup> )
<۰/۰۰۱	-۰/۴۳±۰/۰۱	-۳/۰۵±۰/۰۷	T-score مهره کمری
<۰/۰۰۱	-۰/۵۱±۰/۰۱	-۲±۰/۰۸	Z-score مهره کمری
<۰/۰۰۱	-۰/۷±۰/۰۷	-۱/۶۱±۰/۱۲	T-score استخوان گردن راست هیپ
<۰/۰۰۱	-۰/۸±۰/۰۹	-۱/۴۸±۰/۰۹	T-score استخوان گردن چپ هیپ
<۰/۰۰۱	۱/۲۸±۰/۰۸	-۰/۶۷±۰/۰۹	Z-score استخوان گردن راست هیپ
<۰/۰۰۱	۱/۲۵±۰/۰۸	-۰/۶۷±۰/۰۹	Z-score استخوان گردن چپ هیپ

توزیع فراوانی ژنوتیپی و اللی در دو گروه زنان دارای پوکی استخوان و گروه سالم در جدول ۳ خلاصه شده است. آنالیز آماری نشان می‌دهد که درصد فراوانی ژنوتیپ‌ها در بیماران AA (۶۰) و AT (۳۲/۵) و TT (۷/۵) می‌باشد و درصد فراوانی ژنوتیپ‌ها در گروه شاهد AA (۷۰) و AT (۲۷/۵) و TT (۲/۵) بوده است. هم‌چنین نشان داده شد که ژنوتایپ AT نسبت به ژنوتایپ AA شانس ابتلا به بیماری را به میزان ۱/۳۷۹ برابر و ژنوتایپ TT نسبت به AA شانس ابتلا به بیماری را به میزان ۳/۵ برابر افزایش می‌دهد. ال T نسبت به ال A به میزان ۱/۶۰۵ برابر، شانس بیماری را افزایش می‌دهد.

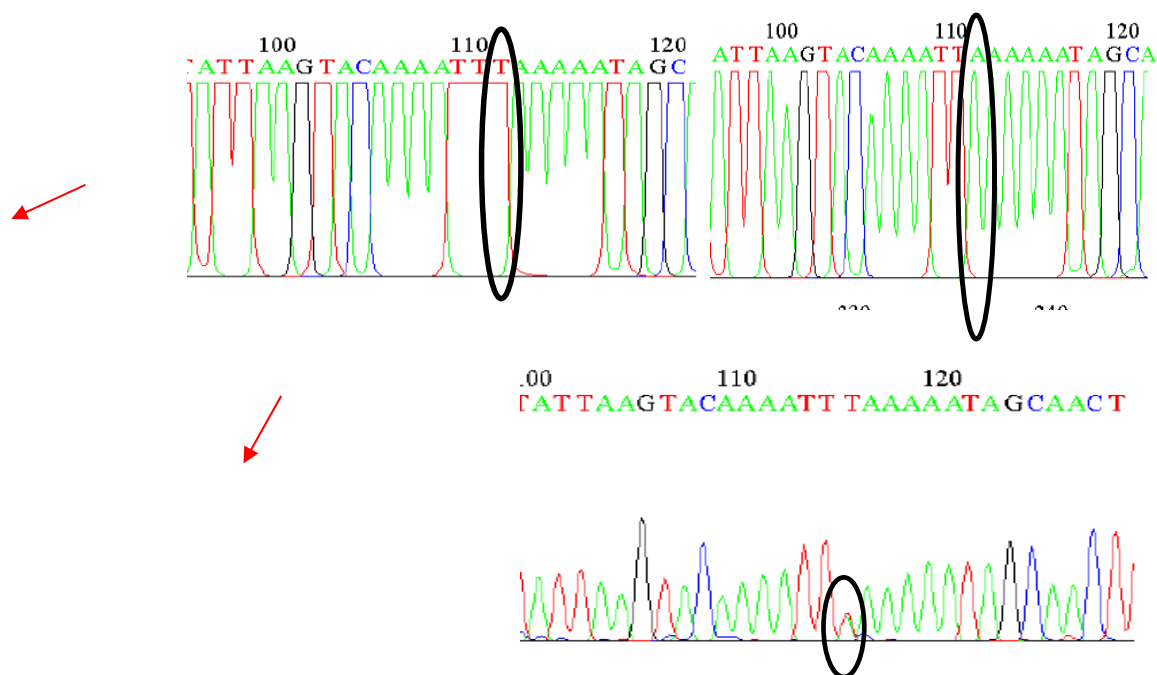
توزیع فراوانی ژنوتیپی و اللی در دو گروه زنان دارای پوکی استخوان و گروه سالم در جدول ۳ خلاصه شده است. آنالیز آماری نشان می‌دهد که درصد فراوانی ژنوتیپ‌ها در بیماران AA (۶۰) و AT (۳۲/۵) و TT (۷/۵) می‌باشد و درصد فراوانی ژنوتیپ‌ها در گروه شاهد AA (۷۰) و AT (۲۷/۵) و TT (۲/۵) بوده است. هم‌چنین نشان داده شد که ژنوتایپ AT نسبت به ژنوتایپ AA شانس ابتلا به بیماری را به میزان ۱/۳۷۹ برابر و ژنوتایپ TT نسبت به AA شانس ابتلا به بیماری را به میزان ۳/۵ برابر افزایش می‌دهد. ال T نسبت به ال A به میزان ۱/۶۰۵ برابر، شانس بیماری را افزایش می‌دهد.

جدول ۳. توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دو گروه بیمار و شاهد

پلی مورفیسم	ژنوتیپ	تعداد بیماران (درصد)	تعداد شاهد (درصد)	chi square	P value	OR	CI ۹۵ (درصد)
Rs4752947	AA	۴۸ (۶۰٪)	۵۶ (۷۰٪)	۰/۱۹	۰/۳۶	۱	(۰/۶۹۴ - ۲/۷۳۹)
	AT	۲۶ (۳۲/۵)	۲۲ (۲۷/۵)	۰/۴۹	۰/۱۴	۱/۳۷۹	(۰/۶۷۵ - ۱۸/۱۵۴)
	TT	۶ (۷/۵)	۲ (۲/۵)	۰/۲۸	۰/۱	۳/۵	(۰/۹۲۱ - ۲/۷۹۹)
آلل	A	۱۲۲ (۷۶/۲۵)	۱۳۴ (۸۳/۷۵)	۰/۰۹		۱/۶۰۵	
	T	۳۸ (۲۳/۷۵)	۲۶ (۱۶/۲۵)	۰/۰۹		۱/۶۰۵	

شکل ۲ تعیین توالی نتایج به دست آمده از روش هضم آنزیمی را نشان می‌دهد. لازم به توضیح است که در این مطالعه ۱۰ درصد نمونه‌ها جهت تعیین توالی ارسال شدند که به ذکر یک نمونه از آن اشاره شده است.

شکل ۲ تعیین توالی نتایج به دست آمده از روش هضم آنزیمی را نشان می‌دهد. لازم به توضیح است که در این مطالعه ۱۰ درصد نمونه‌ها جهت تعیین توالی ارسال شدند که به ذکر یک نمونه از آن اشاره شده است.



شکل ۲. تعیین توالی برای rs:4752947. نواحی بیضی شکل **مشکی فلش‌ها** نشان دهنده جایگاه پلی مورفیسم می‌باشد. الف) ژنوتایپ هموزیگوت موتانت، ب) ژنوتایپ هموزیگوت وحشی، ج) ژنوتایپ هتروزیگوت

همچنین الی T نسبت به الی A به میزان ۱/۶۰۵ برابر، شانس بیماری را افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط سیمونا و همکاران بر روی جمعیت مردان سالمند انجام شد ارتباط بین پلی مورفیسم FokI با تراکم استخوان گردن ران و مهره کمری در دوران پیری مشاهده شد (۱۰). در سال ۲۰۱۰ کیون تکسو و همکاران نشان دادند که ارتباط معنی‌دار بین ژنوتایپ BsmI با BMD مهره کمری وجود دارد ولی ارتباط معنی‌داری بین ژنوتایپ BsmI با BMD گردن استخوان ران وجود ندارد (۱۱). در سال ۲۰۰۹ ریوادرینا و همکاران با بررسی متا آنالیزی که بر روی مطالعات ژنومی انجام شده بر روی ۱۹۱۹۵ نفر از افراد شمال اروپا صورت پذیرفت، ارتباط LRP4 با تنوع BMD ستون فقرات کمری و استخوان ران نشان دادند (۱۲). چانگک و همکاران در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ انجام دادند نشان داده‌اند که با

## بحث

هدف از این مطالعه بررسی همراهی بین پلی مورفیسم (rs4752947) و ژن LRP4 با پوکی استخوان در زنان یائسه منطقه شمال کشور بود. نتایج نشان داده است که میزان تراکم استخوانی در دو ناحیه مهره کمری و استخوان‌های هیپ در افراد بیمار تفاوت معنی‌داری با افراد گروه سالم (شاهد) دارد ( $p < 0.001$ ). اما با بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم rs4752947 با میزان تراکم مهره کمری و استخوان‌های هیپ در دو گروه بیمار و کنترل ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ( $p > 0.05$ ) علی‌رغم عدم ارتباط معنی‌دار در این پلی مورفیسم اما مطالعه ما نشان داد که ژنوتایپ AT نسبت به ژنوتایپ AA شانس ابتلا به بیماری را به میزان ۱/۳۷۹ برابر افزایش می‌دهد و ژنوتایپ TT نسبت به AA شانس ابتلا به بیماری را به میزان ۳/۵ برابر افزایش می‌دهد و

نمونه و ساب تایپ‌های بیشتر ژن LRP4 در نقاط مختلف کشور و دیگر نژادها انجام گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد می‌باشد که در انستیتو پاستور آمل انجام شده است. از همکاران مرکز مذکور جهت همکاری در این پروژه نهایت تشکر را داریم هم‌چنین از همکاری آقای صادق فتاحی در طراحی پرایمرها و آنزیم محدود کننده سپاس‌گزاری می‌گردد.

### منابع

1. Boudin E, Steenackers E, de Freitas F, Nielsen TL, Andersen M, Brixen K, et al. A common LRP4 haplotype is associated with bone mineral density and hip geometry in men—Data from the Odense Androgen Study (OAS). *Bone*. 2013;53(2):414-20.
2. Gupta R, Al-saeed O, Azizieh F, Albusairi A, Gupta P, Mohammed A. Evaluation of bone mineral density in postmenopausal women in Kuwait. *Journal of Clinical Densitometry*. 2012;15(2):211-6.
3. Ghasemi S, Sadeghi H. Effect of different exercises on the bone mineral density, pain and quality of life in people with osteoporosis. 2015.
4. Kanis J, Johnell O, Oden A, Sernbo I, Redlund-Johnell I, Dawson A, et al. Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö. *Osteoporosis international*. 2000;11(8):669-74.
5. Deng H, Livshits G, Yakovenko K, Xu F, Conway T, Davies K, et al. Evidence for a major gene for bone mineral density/content in human pedigrees identified via probands with extreme bone mineral density. *Annals of human genetics*. 2002;66(01):61-74.
6. Golchin MM, Heidari L, Ghaderian SMH, Akhavan-Niaki H. Osteoporosis: A Silent Disease with Complex Genetic Contribution. *Journal of Genetics and Genomics*. 2016;43(2):49-61.

تخریب عملکرد ژن LRP4 سبب افزایش پروتئین لسکلروستین شده و بنابراین باعث افزایش حجم توده استخوان می‌گردد. آنها در این تحقیق نشان داده‌اند که ژن LRP4 نقش کلیدی در هموستاز استخوان دارد (۱۳). هم‌چنین کومار و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم‌های rs3816614 و rs6485702 در ژن LRP4 با مقدار BMD پس از کنترل عوامل مخدوش کننده و مسیر سیگنالینگ Wnt وجود دارد (۱۴). وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی ۱۱۳ پلی مورفیسم در ۱۶ ژن مرتبط با استئوپروزیس نشان داده‌اند که پلی مورفیسم‌های rs17790156 and rs898604 در ژن LRP4 با شکستگی‌های استخوانی در افراد استئوپروز در ارتباط می‌باشد (۱۵). در سال ۲۰۱۳ بوین و همکاران با بررسی ژن LRP4 نشان داده‌اند که ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم‌های rs2306029 and rs6485702 در ژن LRP4 با BMD همه استخوان‌ها به جزء استخوان سر ران وجود دارد (۱). براساس مطالعه حاضر و با توجه به مطالعات گذشته نقش ژن LRP4 را در بیماری استئوپروز را نمی‌توان نادیده گرفت و اگرچه در مطالعات ما این ارتباطات پررنگ نبود اما ارتباطات ژنوتایپینگ این احتمال را به وجود می‌آورد که با افزایش تعداد و محدوده جغرافیایی مطالعه و بررسی پلی مورفیسم‌های دیگر این ژن و با بررسی پلی مورفیسم‌های بیشتر این ارتباط بیشتر مشاهده شود.

### نتیجه گیری

طبق این مطالعه با بررسی توزیع ژنوتیپی و آللی در بین افراد بیمار و سالم اختلاف معنی‌داری بین دو گروه بیمار و سالم در دانسیته استخوان و میزان بروز استئوپروز مشاهده نشد. اما در این مطالعه مشخص شد که جهش در الل T شانس ابتلا به بیماری را بالا می‌برد و فنوتیپ TT مستعد ایجاد بیماری استئوپروز می‌باشد. پیشنهاد می‌شود این مطالعه با تعداد بیشتری



Osteoporosis in Postmenopausal Women. *International Biological and Biomedical Journal*. 2015;1(2):72-80.

8. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(12):3318-25.

9. Leupin O, Piters E, Halleux C, Hu S, Kramer I, Morvan F, et al. Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(22):19489-500.

10. Mencej-Bedrač S, Preželj J, Kocjan T, Teskač K, Ostanek B, Šmelcer M, et al. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density. *Journal of molecular endocrinology*. 2009;42(3):239-47.

11. Suh KT, Eun I-S, Lee JS. Polymorphism in vitamin D receptor is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *European Spine Journal*. 2010;19(9):1545-50.

12. Rivadeneira F, Styrkársdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, Hsu Y-H, Richards JB, et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by

7. Fattahi S, Yousefi GA, Amirbozorgi G, Lotfi M, Naeiji A, Asouri M, et al. Lack of Association of CYP2E1 and CYP1A1 Polymorphisms With large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nature genetics*. 2009;41(11):1199-206.

13. Chang MK, Kramer I, Huber T, Kinzel B, Guth-Gundel S, Leupin O, et al. Disruption of Lrp4 function by genetic deletion or pharmacological blockade increases bone mass and serum sclerostin levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;(48)111;E5187-95.

14. Kumar J, Swanberg M, McGuigan F, Callreus M, Gerdhem P, Akesson K. LRP4 association to bone properties and fracture and interaction with genes in the Wnt- and BMP signaling pathways. *Bone*. 2011;49(3):343-8.

15. Wang C, Zhang Z, Zhang H, He JW, Gu JM, Hu WW, et al. Susceptibility genes for osteoporotic fracture in postmenopausal Chinese women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2012;27(12):2582-91.