

ارتباط پلی مورفیسم rs2241766 ژن آدیپونکتین با بیماری کبد چرب غیرالکلی در یک جمعیت ایرانی

سمانه ربیعی^۱، معصومه نژادعلی^{۱*}، مهدی هدایتی^۲

^۱گروه زیست شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران، ^۲مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون ریز، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۳/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۴

چکیده

زمینه و هدف: آدیپونکتین فراوان ترین پپتید مترشح از بافت چربی است که نقش مهمی در بروز چاقی دارد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2241766 (+45T>G) با متغیرهای بیوشیمیایی و تن سنجی در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی بود.

روش بررسی: این مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۸۰ بیمار مبتلا به کبد چرب غیر الکلی به عنوان مورد و ۸۰ فرد سالم به عنوان شاهد انجام شد (۷۷ مرد و ۸۳ زن). میزان تری گلیسرید، کلسترول تام، HDL و LDL با روش های استاندارد و با استفاده از کیت پارس آزمون و میزان آدیپونکتین با کیت الایزا اندازه گیری شد. تعیین ژنوتیپ نیز با روش PCR-RFLP انجام شد. داده های جمع آوری شده با استفاده از آزمون های تی مستقل، من ویتنی، کای دو و آزمون کلموگروف- اسمیرنوف تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: فراوانی ژنوتیپ TG در افراد بیمار (۵۲/۴ درصد) و فراوانی ژنوتیپ TT در افراد سالم (۵۲/۷ درصد) بیشتر بود، اما تحلیل رگرسیونی نشان داد ژنوتیپ های پلی مورفیسم rs2241766 در بروز بیماری کبد چرب نقش ندارند ($p > 0.05$). مطالعه حاضر نشان داد حاملین ژنوتیپ های TT، TG و GG پلی مورفیسم rs2241766 در هیچ یک از متغیرها در گروه سالم اختلاف معنی دار ندارد ($p > 0.05$)، اما در افراد بیمار، سطح کلسترول در ژنوتیپ ها اختلاف معنی دار نشان داد ($p = 0.02$).

نتیجه گیری: نتایج نشان داد اگرچه فراوانی ژنوتیپ GT و آلل G در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی شایع تر است، اما ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم rs2241766 در ژن آدیپونکتین و بیماری کبد چرب غیر الکلی و سطح آدیپونکتین وجود ندارد.

واژه های کلیدی: بیماری کبد چرب غیر الکلی، آدیپونکتین، پلی مورفیسم، متابولیسم لیپید

*نویسنده مسئول: معصومه نژادعلی، اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی اسلامشهر، واحد اسلامشهر، گروه زیست شناسی

Email: ma_nejadali@yahoo.com

مقدمه

امروزه بیماری کبد چرب غیرالکلی (Non- alcoholic fatty liver disease) شایع ترین بیماری کبدی در کشورهای توسعه یافته است (۱) که در صورت عدم تشخیص و درمان تا ابتلا به سیروز کبدی و گاهی مرگ پیش خواهد رفت (۲ و ۳). این بیماری با دیابت، چاقی، فشار خون، سندرم متابولیک و بیماری های قلبی و عروقی در ارتباط است و به علت چاقی، تغییر سبک زندگی و کاهش فعالیت های فیزیکی شیوع آن روز به روز در حال افزایش است (۴ و ۵). مطالعه ها نشان می دهد، بیش از ۷۰ درصد بیماران دیابتی مبتلا به کبد چرب هستند و همچنین حدود ۷۵ درصد افراد چاق دچار استئاتوز کبد می شوند. بنابراین ریسک ابتلا به کبد چرب در افراد چاق و بیماران مبتلا به دیابت نوع دو، بسیار بالاست (۲).

بیماری کبد چرب غیر الکلی با بسیاری از آدیپوکاین ها یا هورمون های مترشحه از بافت چربی سفید در ارتباط است که یکی از مهم ترین آنها آدیپونکتین می باشد (۶). این هورمون مانع ورود اسیدهای چرب به داخل سلول های کبدی می شود و از بالا رفتن آن در سلول های کبدی جلوگیری می کند، همچنین با افزایش سوخت و ساز چربی در داخل سلول های کبدی از تجمع چربی در کبد و در نتیجه آسیب آن، جلوگیری می کند (۸ و ۱۰ و ۲۰). این واسطه شیمیایی یک عامل مهم حساس کننده کبد به اثر انسولین است و گلوکونئوز کبدی را کاهش می دهد (۹ و ۱۱ و ۱۲ و ۱۳). آدیپونکتین دارای اثر

ضد التهابی و آنتی آتروژنیک نیز می باشد (۲ و ۱۰ و ۱۴ و ۱۵). مطالعه ها نشان می دهد میزان هورمون آدیپونکتین در بیماری کبد چرب غیرالکلی کاهش می یابد (۱۶ و ۱۴). همچنین در افراد چاق نیز آدیپونکتین سطوح پایین تری نسبت به افراد با وزن طبیعی دارد و این کاهش می تواند با ایجاد مقاومت به انسولین و ابتلا به کبد چرب همراه باشد (۱۷ و ۷). بنابراین آدیپونکتین می تواند نوید مهمی برای استفاده کلینیکی در جلوگیری و درمان التهابات کبدی، چاقی و دیابت باشد (۱۱ و ۲).

ژن آدیپونکتین پلی مورفیسم های متعددی دارد که به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته اند (۱۸). عملکرد این واریانت ها بر بیماری متابولیکی در جمعیت و کشورهای مختلف یکسان نمی باشد (۱۴). مطالعه ها نشان داده است برخی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی ژن آدیپونکتین (Single nucleotide polymorphism) نقش مهمی در افزایش ریسک ابتلا به کبد چرب غیر الکلی دارند (۱۸). از جمله پلی مورفیسم های معمول در ژن آدیپونکتین پلی مورفیسم rs2241766 در اگزون ۲ است (۱۴) که حاصل جانشینی باز گوانین به جای باز تیمین می باشد (۱۷). این موتاسیون اگر چه خاموش است و موجب تغییر ساختار آدیپونکتین نمی شود (GGT → GGG, Gly15Gly)، اما گزارش ها نشان می دهد بر ویرایش و پایداری mRNA و سطح آدیپونکتین مؤثر است (۱۴) و نقش مهمی در توسعه بیماری کبد چرب دارد (۱۹). گزارش ها نشان می دهد اثرات این

پلی‌مورفیسم بر بیماری‌ها در جمعیت‌ها، متفاوت است (۲۰). مطالعه در بیماران هندی، ارتباط پلی‌مورفیسم rs266729 را با بروز و شدت NAFLD، نشان داده است (۴). دو مطالعه در زمینه ارتباط پلی‌مورفیسم rs2241766 ژن آدیپونکتین و بیماری دیابت نوع ۲ در ایران انجام شد که در یک مطالعه ارتباط معنی‌دار مشاهده شد (۲۱). اگرچه اثرات این پلی‌مورفیسم بر بیماری‌های متابولیکی و بیماری کبد چرب در برخی جمعیت‌ها نشان داده شده است، اما تحقیقی بر روی ارتباط پلی‌مورفیسم rs2241766 ژن آدیپونکتین و بیماری کبد چرب در جمعیت ایران انجام نشده است. در این مطالعه به بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم با سطح آدیپونکتین و پروفایل لیپیدی در بیماران کبد چرب غیر الکلی در جمعیت ایرانی پرداخته شد.

روش بررسی

این پژوهش به روش مورد-شاهدی انجام شد. در این مطالعه از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی بیمارستان بوعلی و بیمارستان امیرالمومنین تهران که تشخیص کبد چرب غیر الکلی آنان با سونوگرافی تأیید شده بود، ۸۰ نفر به عنوان بیمار مبتلا به کبد چرب غیر الکلی انتخاب شدند و از افرادی که به دلایل مختلف مراجعه کرده بودند و نتایج سونوگرافی کبد آنها طبیعی بود، ۸۰ نفر به عنوان شاهد انتخاب شدند. تعداد نمونه بر اساس فرمول حجم نمونه، محاسبه شد. زمان انجام تحقیق مرداد ماه سال ۹۵ لغایت شهریور ماه سال ۹۶ بود که

بر اساس تفاهم هلیسینکی انجام شد. این مطالعه دارای کد اخلاق می‌باشد که در دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد تصویب شد. معیار ورود به این مطالعه سونوگرافی و معیارهای خروج از تحقیق سابقه مصرف داروی متابولیکی، مصرف الکل، مصرف مواد مخدر، بیماری حاد، حاملگی، بیماری کلیوی، بیماری‌های کبد، بیماری قلبی، سرطان، بیماری‌های ایمنی، عفونت و فشار خون بالا و سایر بیماری‌های شناخته شده بود. جهت رعایت موازین اخلاقی، اطلاعات درباره پژوهش و اهداف به افراد داده شد و پس از کسب رضایت آگاهانه، ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون با رعایت ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی گرفته شد. ۵ میلی‌لیتر از نمونه مذکور، در لوله حاوی ضدانعقاد EDTA^(۱) جهت استخراج DNA و ۵ میلی‌لیتر باقی مانده در لوله فاقد ضدانعقاد جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی ریخته شد. پس از انجام سانتریفیوژ نمونه خون فاقد ضدانعقاد سرم جدا و برای اندازه‌گیری متغیرهای بیوشیمیایی استفاده شد (۱۴).

شاخص‌های تن سنجی شامل قد، وزن و فشارخون با ابزارهای لازم مانند ترازو و قدسنج اندازه‌گیری شد و شاخص توده بدن (BMI) نیز از تقسیم وزن بر مجذور قد حاصل شد (۲۰ و ۲۲). فاکتورهای بیوشیمیایی مانند قند خون ناشتا، تری گلیسرید، کلسترول، HDL-C به وسیله کیت پارس

1-Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)

مرحله و بدین صورت تنظیم شد. دنا تورا سیون اولیه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۱۰ سیکل که هر سیکل شامل؛ دنا تورا سیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت یک دقیقه. سپس ۲۰ سیکل شامل دنا تورا سیون ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه. سپس تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در نهایت قطعه ای به طول ۳۷۲ جفت باز حاصل گردید.

پس از انجام PCR صحت تکثیر قطعه مورد نظر به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد و با استفاده از رنگ آمیزی با محلول ژل رد شرکت زیست فناوری کوثر بررسی گردید. سپس طی روش RFLP^(۲) نمونه های حاوی قطعات تکثیر یافته به میزان ۴ میکرو لیتر، ۰/۴ میکرو لیتر آنزیم محدود کننده SmaI شرکت TaKaRa ساخت ژاپن و ۴ میکرو لیتر آب مقطر داخل میکروتیوپ ریخته و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده و سپس برش داده شدند و مجدداً الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد انجام شد و تعیین ژنوتیپ با استفاده از دستگاه ژل

آزمون و با روش الایزا به وسیله دستگاه Biotechnical مدل BT3500 اندازه گیری شد. LDL کلسترول از طریق فرمول فریدوالد محاسبه گردید. میزان آدیپونکتین با کیت الایزا مرکودیای سوئد انجام شد (۱۴). کلیه کارهای آزمایشگاهی به استثناء اندازه گیری قند ناشتا در پژوهشگاه غدد و متابولیسم دانشگاه شهید بهشتی انجام شد.

DNA ژنومی از لوله های خون تام حاوی ضد انعقاد با روش Salting out استخراج گردید (۲۲ و ۲۵). تکثیر قطعه های حامل پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2241766 واقع در اگزون شماره ۲ ژن آدیپونکتین با روش PCR^(۱) انجام گرفت. برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر مدل Applied Biosystems 2070 شرکت ABI استفاده شد. در این مرحله نیاز به دو نوع پرایمر Reverse و Forward داریم. پرایمرها به وسیله نرم افزار Generunner طراحی شد. عملکرد اختصاصی آغازگرها با Blast تأیید شد و از شرکت سیناژن تهیه گردید. جهت انجام PCR، مخلوطی با حجم ۲۵ میکرو لیتر متشکل از ۱ میکرو لیتر سرم حاوی DNA، ۱۲/۵ میکرو لیتر مسترمیکس امپلیکون شرکت پیشگام، ۰/۹ میکرو لیتر از هر کدام از پرایمرها و ۹/۷ میکرو لیتر آب مقطر داخل میکروتیوپها ریخته شد و داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد (۱۴).

Forward primer: 5'_GAAGTAGACTCTGCTGAGATGG_3'

Reverse primer: 5'_TATCAGTGTAGGAGGTCTGTGATG_3'

برنامه ترموسایکلر برای عملکرد بهتر پرایمر در دو

1-Polymerase chain reaction(PCR)
2-Restriction fragmentation length polymorphism(RFLP)

داک انجام گرفت (۲۳ و ۱۵). ژنوتیپ TT با یک باند و طول باند ۳۷۲bp، ژنوتیپ TG با سه باند و طول باندهای ۳۷۲bp، ۲۰۹bp و ۱۶۳bp و ژنوتیپ GG با دو باند و طول باندهای ۱۶۳bp و ۲۰۹bp مشخص شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های آماری و بررسی فرضیه‌های تحقیق با بهره‌گیری از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. برای تجزیه و تحلیل فرضیه‌های تحقیق از آزمون تی مستقل، من ویتنی و کای دو بهره گرفته شد. عوامل کمی با استفاده از آزمون کلموگروف اسمیرنوف از نظر وضعیت نرمال بودن مورد بررسی قرار گرفت. در صورت عدم برقراری شرط نرمال بودن، برای مقایسه میان دو گروه مورد و شاهد از آزمون من ویتنی استفاده شد و در غیر این صورت از آزمون تی مستقل استفاده شد. عوامل کیفی با استفاده از آزمون کای دو یا فیشر مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

از ۱۶۰ فرد شرکت کننده ۸۰ نفر مبتلا به کبد چرب غیر الکلی و ۸۰ نفر سالم بودند. حداقل سن افراد ۲۰ و حداکثر سن آنها ۶۰ سال بود. تعداد زنان ۹۱ نفر و تعداد مردان ۶۹ نفر بود. از افراد مورد مطالعه متغیرهای بالینی و تن سنجی شامل: قد، نمایه توده بدنی و هم‌چنین متوسط میزان سرمی کلسترول تام، تری‌گلیسرید، HDL و LDL اندازه‌گیری شد. متغیرهای کمی با توزیع نرمال به صورت میانگین و انحراف استاندارد گزارش شد. متغیرهای کمی به صورت

تعداد و درصد گزارش شد. مقایسه متغیرهای مورد بررسی در افراد بیمار و سالم در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان می‌دهد در متغیرهای BMI، تری‌گلیسرید، میزان آدیپونکتین و HDL در دو گروه اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p < 0.05$)، اما فراوانی ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم +45T>G در افراد سالم و بیمار اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p > 0.05$).

در این مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم rs2241766 ژن آدیپونکتین با متغیرهای نمایه توده بدنی، کلسترول تام، تری‌گلیسرید، آدیپونکتین و HDL و LDL در افراد سالم و بیمار بررسی شد. بر اساس جدول ۲ در هیچ یک از متغیرها در افراد سالم حامل ژنوتیپ‌های TT، TG و GG این پلی‌مورفیسم اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($p > 0.05$). در افراد سالم تنها یک فرد حامل ژنوتیپ GG مشاهده شد، که در آنالیز آماری حذف گردید.

بررسی ارتباط متغیرها با ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs2241766 در افراد بیمار (جدول ۳) نشان داد در میزان آدیپونکتین و نمایه توده بدنی، تری‌گلیسرید، HDL و LDL در حاملین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs2241766 در افراد مبتلا به کبد چرب غیر الکلی اختلاف معنی‌دار وجود ندارد ($p > 0.05$)، اما میزان کلسترول در این افراد اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p = 0.02$).

ارتباط ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs2241766 با بیماری کبد چرب غیر الکلی در جدول ۴ آمده است.

تحلیل رگرسیونی ژنوتیپ (جدول ۴) نشان داد فراوانی افراد بیمار با ژنوتیپ TG بیشتر از افراد سالم است، همچنین فراوانی حاملین ژنوتیپ TT در گروه سالم بیشتر است، ولی تفاوت معنی‌دار در فراوانی هیچ یک از ژنوتیپ‌ها در دو گروه سالم و بیمار مشاهده نشد و به طور کلی ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs2241766 در بروز بیماری کبد چرب غیر الکی نقش معنی‌دار ندارد ($p > 0.05$).

جدول ۱: توزیع فراوانی مورد بررسی به تفکیک وجود یا عدم وجود بیماری کبد چرب

متغیر کمی	کبد چرب (تعداد=۸۰)	سالم (تعداد=۸۰)	سطح معنی‌داری
نمایه توده بدنی (کیلوگرم/مترمربع)	۲۸/۶۵±۴/۶۸	۲۳/۷۸±۳/۳۴	<۰/۰۰۱
HDL (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۳۴/۹۵±۱۲/۶۸	۴۷/۸۲±۱۰/۶۹	<۰/۰۰۱
LDL (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۹۳/۵۵±۳۱/۱۳	۹۲/۵۴±۲۴/۹۲	۰/۸۲۲
کلسترول (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۱۷۰/۱۴±۴۲/۹۶	۱۶۳/۳۰±۳۲/۳۴	۰/۲۵۷
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۱۲۶ (۱۰۰/۵-۱۸۵)	۹۰ (۶۵-۱۲۴)	<۰/۰۰۱
آدیپونکتین (میلی مول بر لیتر)	۴/۴۸ (۳/۸۵-۶/۷)	۶/۳۲ (۵/۱-۷/۹۴)	<۰/۰۰۱
ژنوتایپ rs2241766			۰/۰۹۸
TT	۵۲ (۶۴/۲)	۵۸ (۷۳/۴)	
GG	۷ (۸/۶)	۱ (۱/۳)	
GT	۲۲ (۲۷/۲)	۲۰ (۲۵/۳)	
الل			۰/۰۵۴
T	۱۲۶ (۷۷/۸)	۱۳۶ (۸۶/۱)	
G	۳۶ (۲۲/۲)	۲۲ (۱۳/۹)	

جدول ۲: توزیع فراوانی افراد مورد بررسی در هر ژنوتایپ rs2241766 برای افراد سالم

متغیر کمی	TT	GT	سطح معنی‌داری
نمایه توده بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)	۲۳/۵۵±۳/۵۹	۲۴/۴۴±۲/۵۴	۰/۳۰۸
کلسترول (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۱۶۳/۲۱±۳۳/۹۷	۱۶۱/۸۵±۲۷/۶۵	۰/۸۷۳
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۹۱ (۶۸-۱۵۲/۵)	۸۶/۵ (۶۲/۵-۱۱۰)	۰/۳۵۱
آدیپونکتین (میلی مول بر لیتر)	۶/۳۶ (۵/۰۶-۷/۷۸)	۶/۱۶ (۵/۱۷-۸/۵۳)	۰/۷۷۹
HDL (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۴۷/۳۸±۱۰/۵۰	۴۷/۷۵±۹/۹۷	۰/۸۹۱
LDL (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۹۲/۷۹±۲۳/۸۰	۹۰/۷۰±۲۸/۶۴	۰/۷۴۹

جدول ۳: توزیع فراوانی افراد مورد بررسی در هر ژنوتایپ rs2241766 برای افراد بیمار

متغیر کمی	TT	GG	GT	سطح معنی‌داری
نمایه توده بدنی (کیلوگرم/مترمربع)	۲۷/۷۰±۴/۵۶	۳۱/۷۹±۴/۱۵	۲۹/۹۱±۴/۵۵	۰/۰۶۱
کلسترول (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۱۷۸/۲۹±۴۴/۳۳	۱۶۲/۵۷±۴۲/۶۱	۱۵۲/۲۷±۳۵/۴۹	۰/۰۲۲
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۱۳۱ (۱۰۳/۷۵-۱۸۵)	۱۲۰ (۱۰۸-۱۸۰)	۱۱۹ (۸۶/۷۵-۱۸۸/۷۵)	۰/۸۱۰
آدیپونکتین (میلی مول بر لیتر)	۴/۴۱ (۳/۸۰-۶/۵۹)	۵/۱ (۴/۲۵-۵/۳۳)	۴/۴۶ (۳/۸۴-۷/۱۰)	۰/۸۳۴
HDL (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۳۵/۰۵±۱۲/۱۳	۴۰/۴۳±۸/۴۶	۳۲/۹۹±۱۴/۸۷	۰/۵۳۶
LDL (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۹۵/۵۳±۳۳/۳۷	۷۳/۴۳±۲۵/۱۴	۹۵/۲۷±۲۵/۶۹	۰/۹۷۵

جدول ۴: تحلیل رگرسیونی ژنوتایپ‌ها با بیماری کبد چرب غیر الکلی بر اساس سن

ژنوتایپ rs2241766	طبقه	بیمار	سالم	سطح معنی‌داری	تعدیل نشده	سطح معنی‌داری	تعدیل شده
OR (95%CI)							OR (95%CI)
TT	۵۲ (۴۷/۳)	۵۸ (۵۲/۷)	۰/۲۱۰	۰/۶۵ (۰/۳۳-۱/۲۷)	۰/۱۰۲	۰/۵۲ (۰/۲۴-۱/۱۴)	
GG	۷ (۸۷/۵)	۱ (۱۲/۵)	۰/۰۶۵	۷/۳۸ (۰/۸۹-۶۱/۴۳)	۰/۱۱۴	۵/۸۳ (۰/۶۵-۵۱/۷۸)	
GT	۲۲ (۵۲/۴)	۲۰ (۴۷/۶)	۰/۷۹۱	۱/۱۰ (۰/۵۴-۲/۲۳)	۰/۳۹۵	۱/۴۲ (۰/۶۳-۳/۲۱)	

بحث

دانشمندان ارتباط آدیپونکتین و وارینت‌های ژنتیکی را با بیماری کبد چرب در برخی جمعیت‌ها نشان داده‌اند (۱۸ و ۱۴). هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیزم تک نوکلئوتیدی rs2241766 (+45T>G) با متغیرهای بیوشیمیایی و تن‌سنجی در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی بود.

در مطالعه حاضر، سطح آدیپونکتین، تری‌گلیسرید، نمایه توده بدنی و HDL در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی نسبت به افراد سالم تفاوت معنی‌دار نشان داد. کاهش میزان آدیپونکتین در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی (۲۴) و اختلاف معنی‌دار در سطح تری‌گلیسرید و HDL بین گروه سالم و افراد مبتلا به بیماری‌های متابولیکی در برخی از پژوهش‌ها یافت شده است (۲۵). محققان نشان داده‌اند سطوح پایین آدیپونکتین ارتباط مثبت با افزایش خطر بیماری قلب و عروق دارد و سطح بالای آدیپونکتین محافظتی در برابر ابتلا به این بیماری است (۲۶).

در پژوهش حاضر ارتباطی معنی‌دار بین پلی مورفیزم rs2241766 ژن آدیپونکتین با سطح

هورمون آدیپونکتین و نمایه توده بدنی و پروفایل لیپیدی در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی و افراد سالم یافت نشد. دمی‌رجی و همکاران نیز گزارش کردند میزان آدیپونکتین سرم با پلی مورفیزم rs2241766 ارتباط ندارد (۲۷) در حالی که در یک جمعیت کره‌ای مبتلا به دیابت، بین پلی مورفیزم rs2241766 و سطح سرمی آدیپونکتین و چاقی و مقاومت به انسولین ارتباط یافت شد (۲۸). همچنین در مطالعه گاپتا و همکاران بین پلی مورفیزم rs2241766 و کاهش سطوح آدیپونکتین در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی ارتباط معنی‌دار مشاهده شد (۲۷). محققین در بررسی روی جمعیت ایتالیایی نیز بین پلی مورفیزم +45T>G با مقاومت به انسولین و سایر شاخص‌های مربوط به آن از جمله افزایش وزن ارتباط معنی‌داری مشاهده کردند (۱۲) و تحقیق‌هایی روی مردم آسیا نشان داد پلی مورفیزم rs2241766 ژن آدیپونکتین با افزایش چربی و کاهش آدیپونکتین ارتباط دارد و فاکتور خطر برای کبد چرب غیر الکلی محسوب می‌گردد (۲۹). در حالی که در جمعیت ما بین این پلی مورفیزم با سطح آدیپونکتین و نمایه توده بدنی و پروفایل لیپیدی ارتباطی مشاهده نشد.

در مطالعه حاضر هیچ ارتباطی بین پلی‌مورفیسم $45T>G$ با کبد چرب غیرالکی مشاهده نشد، در پژوهش وانگ و همکاران بر روی مردم آسیا و چین، مشابه نتایج حاضر ارتباطی بین پلی‌مورفیسم $45T>G$ با کبد چرب غیرالکی یافت نشد (۲۵)، در حالی که در جمعیت چین شمالی بین این پلی‌مورفیسم با NAFLD ارتباط معنی‌دار مشاهده شد (۱۹). در تحقیقی دیگر در جمعیت چین کاهش آدیپونکتین و مقاومت به انسولین در بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکی مشاهده شد، اما ارتباط مستقیم بین این پلی‌مورفیسم با کبد چرب غیرالکی یافت نشد (۳۰). توکوشیگ و همکاران در جمعیت ژاپن، ارتباطی بین پلی‌مورفیسم $45T>G$ و بیماری کبد چرب غیرالکی مشاهده نکردند (۱۹)، اما پژوهشی دیگر در ژاپن ارتباط این پلی‌مورفیسم را با مقاومت به انسولین و پیشرفت فیروز کبدی در بیماران NAFLD نشان داد. در یک مطالعه در افراد ایتالیایی نیز ارتباط ژنوتیپ TT این پلی‌مورفیسم با استئاتوز کبدی و سطوح آدیپونکتین مشاهده شد (۳۰).

تحقیق دیگری در شهر دهلی کشور هند بر روی ۱۳۷ بیمار مبتلا به کبد چرب و ۲۵۰ فرد سالم انجام شد. در این مطالعه فراوانی پلی‌مورفیسم rs2241766 در افراد بیمار نسبت به افراد سالم بیشتر و سطح آدیپونکتین کمتر بود که ال G عامل کاهنده آدیپونکتین در بیماران بیان شد. این محقق‌ها گزارش کردند کاهش سطح پلاسمایی آدیپونکتین در بیماران نشان دهنده ارتباط عملکردی این پلی‌مورفیسم در

پاتوزن و پیشرفت NAFLD است (۳۱). موسو و همکاران نیز نشان دادند افراد با پلی‌مورفیسم rs2241766 دارای شیوع بالاتری از ابتلا به کبد چرب غیرالکی هستند و پیش‌بینی کردند افراد حامل این پلی‌مورفیسم در ابتلا به این بیماری مستعدتر هستند (۲۸). همچنین مطالعات متا آنالیز کانو و همکاران در مصر نشان داد پلی‌مورفیسم rs2241766 با افزایش ریسک بیماری‌های قلبی و عروقی ارتباط دارد ($OR>1$ و $p<0.05$) (۲۶). در تحقیق حاضر مشابه پژوهش‌های ذکر شده، فراوانی ژنوتیپ TT در افراد سالم و فراوانی ال G در افراد بیمار بیشتر بود، اما این اختلاف معنی‌دار نبود ($p=0.054$). به عبارتی در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌دار بین هیچ یک از ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs2241766 با بیماری کبد چرب غیرالکی مشاهده نشد ($p>0.05$). تناقض نتایج محققان، ممکن است ناشی از تفاوت‌های قومی این مطالعه‌ها باشد (۳۰). از این رو مطالعه‌های بیشتر با تعداد نمونه‌های بیشتر و ژادهای مختلف لازم است تا یافته‌ها تأیید شود (۱۹).

بیماری کبد چرب غیرالکی یکی از انواع آسیب‌های کبدی است که رابطه نزدیکی با استعداد ژنتیکی و محیطی دارد. برهم‌کنش این فاکتورها می‌تواند در فنوتیپ کبد چرب غیرالکی و پیش‌روی آن تأثیر داشته باشد. بسیاری از پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ژن آدیپونکتین به عنوان فاکتور خطر برای این بیماری به شمار می‌روند. تحقیق‌های زیادی برای شناخت رابطه ژن آدیپونکتین و

پلی‌مورفیسم‌های آن با کبد چرب غیرالکلی در سطح جهان انجام شده است، اما این تحقیق‌ها کافی نیست و مطالعه در این مورد ادامه دارد (۱۸). از محدودیت‌های این مطالعه عدم اندازه‌گیری سیتوکین‌های التهابی مانند TNF- α و IL-6 است که در بسیاری از مطالعه‌ها ارتباط و اثرات آن بر کبد چرب تأیید شده است. در این مطالعه انتخاب نمونه زیر نظر پزشکان فوق تخصص کبد و گوارش انجام شد و تعیین ژنوتیپ و اندازه‌گیری متغیرها با استفاده از کیت‌ها و دستگاه‌های دقیق و معتبر در پژوهشگاه غدد و متابولیسم شهید بهشتی انجام شد. با توجه به دخیل بودن فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در بیماری کبد چرب غیرالکلی و رو به گسترش بودن این بیماری، پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بیشتر و در حجم بالاتر در مورد این پلی‌مورفیسم و پلی‌مورفیسم‌های دیگر ژن آدیپونکتین در افراد ایرانی مبتلا به کبد چرب انجام شود تا بتوان با بررسی عوامل زمینه‌ساز آن و تغییر روش زندگی و رژیم غذایی از ابتلا به این بیماری و عوارض ناگوار آن پیشگیری کرد.

نتیجه‌گیری

بیماری کبد چربی غیر الکلی از مهم‌ترین بیماری‌های کبدی است که با توجه به شیوع گسترده در سال‌های اخیر لازم است مطالعه‌ها و تحقیق‌های بیشتری برای پیش‌بینی و درمان انجام شود. در این مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم rs2241766 در ژن آدیپونکتین با بیماری کبد چرب غیرالکلی و سطح

آدیپونکتین بررسی شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد، در جمعیت ما فراوانی ژنوتیپ GT و آلل G در گروه مبتلا به کبد چرب بیشتر است، اما ارتباط معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم rs2241766 ژن آدیپونکتین با کبد چرب غیر الکلی مشاهده نشد. همچنین ارتباطی بین این پلی‌مورفیسم و سطح آدیپونکتین، یافت نشد. به‌طور کلی بر طبق یافته‌ها، به نظر می‌رسد آلل T نقش محافظتی در برابر کبد چرب غیر الکلی دارد، اما ارتباط معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم rs2241766 و کبد چرب غیرالکلی وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مربوط به رشته بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامشهر می‌باشد. که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد. بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از جواد رستگار مقدم، میترا علی‌نژاد و مینو ساعتیان در بیمارستان بوعلی که در جمع‌آوری نمونه‌ها ما را یاری کردند، همچنین از تمامی افراد شرکت کننده در این طرح و دوستان عزیز که در پژوهشگاه غدد دانشگاه شهید بهشتی ما را یاری رساندند اعلام می‌دارم.

REFERENCES:

- 1.Campo JD, Gallego-Durán R, Gallego P, Grande L. Genetic and Epigenetic Regulation in NonalcoholicFatty Liver DiseaseInt. J Mol Sci 2018; 19(911): 1-11.
- 2.Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. J Clin Invest 2003; 112(1): 91-100.
- 3.Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment Frontline Gastroenterol. Bmjjournal 2014; 5(4): 277-86.
- 4.Li XL, Sui JQ, Lu LL, Zhang NN, Xu X, Dong QY, et al. Gene polymorphisms associated with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease: a concise review. Lipid Health Dis 2016; 2: 10-15.
- 5.Hsieh CJ, Wang PW, Hu TH. Association of adiponectin gene polymorphism with nonalcoholic fatty liver disease in Taiwanese patients with type 2 diabetes. Plos one 2015; Volume 10(6): 1371.
- 6.Kim SH, Kang ESK, Hur KY, Lee HJ, Han SJ, Kwak JY, et al. Adiponectin gene polymorphish 45T>G is associated with carotid artery plaque in patient with type 2 diabetes mellitus. Metabolism Clinical and Exprimental 2008; 57: 274-279.
- 7.Wu J, Liu Z, Meng K, zhang L. Association of adiponectin gene rs2241766 polymorphism with obesity in adult. Plos one 2014; 9(4): 123-7.
- 8.Cai Y, Zeng T, Chen L. Association of adiponectin polymorphism with the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. Journal of Diabetes 2015; 7(1): 31-40.
- 9.Lee S, Kwak H. Role of adiponectin in metabolic and cardiovascular disease. PMC 2014; 10(2): 54-9.
- 10.Tarek T, Tarek S, Olfat A, Amr A. Association of polymorphism in adiponectin 45T/G and leptin 2548G/A genes with type 2 diabetes mellitus in male Egyptians. Clinical Research 2015; 11(5): 937-44.
- 11.Yaofu F, Kun W, Shuhang X, Guofang C, Hongjie D, Chao L. Association between ADIPOQ +45T>G Polymorphism and Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. Internatinal Journal of Molecular Sciences 2015; 16(1): 704-23.
- 12.Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, Berg AH, Warram JH, Scherer PE, Trischitta V, Doria A. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. Diabetes 2002; 51(7): 2306-12.
- 13.Lim JW, Dillon J, Miller M. Proteomic and genomic studies of non-alcoholic fatty liver disease - clues in the pathogenesis. World J Gastroenterol 2014; 20(26): 8325-40.
- 14.Takhshid M, Haem Z, Aboulizadeh F. The association of circulating adiponectin and+45 T/G polymorphism of adiponectin gene with gestational diabetes mellitus in Iranian population. J Diabetes MetabDisord 2015; 14: 14-30.
- 15.Namvaran F, Azarpira N, Geramizadeh B, Rahimi-Moghaddam P. Distribution and genotype frequency of adiponectin(+45 T/G) and adiponectin receptor2 (+795 G/A) single nucleotide polymorphisms in Iranian population. Gene 2011; 486: 97-103.
- 16.Bugianesi E, Pagotto U, Manini R, Vanni E, Gastaldelli A, de lasio R, et al. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(6): 3498-504.
- 17.Li X, Wei D, He H, Zhang J, Wang C. Association of the adiponectin gene (ADIPOQ) +45 T>G polymorphism with the metabolic syndrome among Han Chinese in Sichuan province of China. Asia Pac J ClinNutr 2012; 21(2): 296-301.
- 18.Zhou YJ, Zhang ZS, Nie YQ, Cao J, Cao CY, Li YY. Association of adiponectin gene variation with progression of nonalcoholic fatty liver disease: A 4-year follow-up survey. Journal og digestive diseases. 2015; 10: 601-60919.Du S, Lu L, Liu Y, Dong Q, Xuan S, Xin Y. Association of adiponectin gene polymorphisms with the risk of coronary artery disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease in a chinese han population .Hepat Mon 2016; 16(7):1-9.
- 20.Motavi T, Salman T, Shaker O, Abdelhamid A. Association of polymorphism in adiponectin (+45 T/G) and leptin (–2548 G/A) genes with type 2 diabetes mellitus in male Egyptians. Arch Med Sci 2015; 11(5): 937–44.
- 21.Khodaeian M, Enayati S, Tabatabaei-Malazy O, Amoli M. Association between genetic variants and diabetesmellitus in iranian populations: a systematic review ofobservational studies)hindawi publishing corporation .Journal of Diabetes Research 2015; 585917: 21.

22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Journal List Nucleic Acids Resv* 1998; 16(8): 1215.
23. Mackawy AM. Association of the + 45T>G adiponectin gene polymorphism with insulin resistance in non-diabetic Saudi women. *Gene* 2013; 530(1): 158-63.
24. Ahmed Mohamed A, Sabry S, Mahmoud Abdallah A, Abd Elazeem N, Refaey D, Fedal Aljebaly HA, et al. Circulating adipokines in children with nonalcoholic fatty liver disease: possible noninvasive diagnostic markers. *Ann Gastroenterol* 2017; 30(4): 457-63.
25. Hashemi M, HanafiBojd H, EskandariNasab E, Bahari A, Hashemzahi N. Association of Adiponectin rs1501299 and rs266729 Gene Polymorphisms With Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal Hepatitis Monthly* 2013; 13(5): 1-7.
26. Kanu JS, Qiu S, Cheng Y, Li R, Kou C, Gu Y, et al. Associations between three common single nucleotide polymorphisms (rs266729, rs2241766, and rs1501299) of ADIPOQ and cardiovascular disease: a meta-analysis. *Lipids in Health and Disease* 2018; 17(126): 1-21.
27. Prakash J, Mittal B, Awasthi S, Srivastava N. Association of adiponectin gene polymorphism with adiponectin levels and risk for insulin resistance syndrome. *International Journal of Preventive Medicine* 2015; 6: 31.
28. Jang Y, Chae JS, Hyon YJ, Kim JY, Jeong YJ, et al. The influence of the adiponectin concentration and parameters of metabolic syndrome in non-diabetic Korean women. *Clin Chim Acta* 2008; 391: 85-90.
29. Wang BF, Wang Y, Ao R, Tong J, Wang BY. AdipoQ T45 G and G276 T polymorphisms and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease among asian populations: a meta-analysis and meta-regression. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2016; 30: 47-57.
30. Macaluso FS, Maida M, Petta S. Genetic background in nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review. *World J Gastroenterol* 2015; 21(39): 11088-111.
31. Gupta A, Marisa R, Singh Y. Association of adiponectin gene functional polymorphisms (-11377C/G and +45T/G) with nonalcoholic fatty liver disease. *Gene* 2012; 496: 63-9.

Association of Adiponectin Gene rs2241766 Polymorphism with non-Alcoholic Fatty Liver Disease in an Iranian Population

Rabiee S¹, Nezhadali M^{2*}, Hedayati M²

¹Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran, ²Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran.

Received: 18 Jun 2018

Accepted: 26 Sep 2018

Abstract

Background and Aim: Adiponectin is the most abundant peptide extracted from adipose tissue, which plays an important role in development of obesity. The purpose of this study was to evaluate the association of single-nucleotide polymorphism rs2241766 (+45T>G) with biochemical and anthropometric parameters in patients with non-alcoholic fatty liver.

Methods: The present case-control study was performed on 80 patients with non-alcoholic fatty liver and 80 healthy peoples as control (77 men and 83 women). Triglyceride, total cholesterol, HDL, LDL levels and adiponectin levels were measured by standard methods using Pars Azmoon kit and ELISA kit respectively. Genotyping was also performed by PCR-RFLP method. Data were analyzed using independent t-test, Mann-Whitney, Chi-square and Kolmogorov-Smirnov tests.

Results: Frequency of TG genotype was higher in patients (52.4%) and frequency of TT genotype in healthy people (52.7%), but regression analysis showed that rs2241766 polymorphism genotypes did not play a role in fatty liver disease ($p>0.05$). The present study showed that none of the variables in the carriers of TT, TG, and GG genotypes was significantly different in the healthy group ($p>0.05$), however, in the patients, the level of cholesterol in the genotypes was significantly different ($p=0.02$).

Conclusion: The results indicated that although the frequency of GT genotype and G allele in non-alcoholic fatty liver were more common. No significant relationship was seen between rs2241766 polymorphism in adiponectin genem, non-alcoholic fatty liver disease and adiponectin levels.

Key words: Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Adiponectin, Polymorphism, Lipid metabolism.

*Corresponding Author: Nezhadali M, Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, Iran.

Email: ma_nejadali@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Rabiee S, Nezhadali M, Hedayati M. Association of Adiponectin Gene rs2241766 Polymorphism with non-Alcoholic Fatty Liver Disease in an Iranian Population. Armaghane-danesh 2018; 23(4): 476-487