

Association of adiponectin rs17300539 gene polymorphism with a non-alcoholic fatty liver disease in an Iranian population

Rezaie F¹, Nezhadali M^{1*}, Hedayati M²

1- Department of Biology, Islamshahr Branch, Islamic Azad University, Islamshahr, I. R. Iran.

2- Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, I. R. Iran.

Received: 2017/11/8 | Accepted: 2018/06/20

Abstract:

Background: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a chronic liver disorder, resulting from exceeding fat cumulating in the liver. Adiponectin, a protein secreted from the adipose tissue, reduces liver inflammation. In this study, the relationship between adiponectin rs17300539 gene polymorphism and a non-alcoholic fatty liver disease was investigated.

Materials and Methods: This case-control study was conducted on 80 subjects with NAFLD and 80 healthy subjects. The determination of polymorphism rs17300539 of adiponectin gene was performed by the PCR-RFLP method and electrophoresis technique. The plasma levels of adiponectin and insulin hormones were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

Results: The results showed that there was no significant difference in allele frequencies between the two groups of the case and control ($P>0.05$). The body mass index (BMI) in genotype GA carriers was higher than that of genotype GG carriers ($P<0.05$). Moreover, the diastolic blood pressure in the male patients carrying the genotype GA was higher than that in the genotype GG carriers ($P<0.05$). In the female patients carrying the genotype GA, the AST and triglyceride levels were higher than the GG female carriers ($P<0.05$).

Conclusion: It seems that the allele G can be beneficial in reducing the side-effects of the non-alcoholic fatty liver disease.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver, Adiponectin, Polymorphism, Adipose tissue

* Corresponding Author.

Email: ma_nejadali@yahoo.com

Tel: 0098 912 387 5493

Fax: 0098 215 635 6176

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2018; Vol. 22, No 4, Pages 379-386

Please cite this article as: Rezaie F, Nezhadali M, Hedayati M. Association of adiponectin rs-17300539 gene polymorphism with a non-alcoholic fatty liver disease in an Iranian population. Feyz 2018; 22(4): 379-86.

ارتباط پلی مورفیسم rs17300539 در زن آدیپونکتین با بیماری کبد چرب غیرالکلی در یک جمعیت ایرانی

*^۱ فهیمه رضایی، معصومه نژادعلی، ^۲ مهدی هدایتی

خلاصه:

سابقه و هدف: بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) یک اختلال مزمن کبدی ناشی از تجمع بیش از حد چربی در کبد است. آدیپونکتین، پروتئین مترشحه از بافت چربی، باعث تخفیف التهابات کبدی می‌گردد. در این تحقیق ارتباط پلی مورفیسم rs17300539 زن آدیپونکتین با بیماری کبد چرب غیرالکلی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد-شاهدی روی ۸۰ فرد مبتلا به NAFLD و ۸۰ فرد سالم انجام شد. تعیین پلی مورفیسم rs17300539 با روش PCR-RFLP و تکنیک الکتروفورز انجام شده است. سطح هورمون‌های آدیپونکتین و انسولین به وسیله کیت الایزا اندازه‌گیری شد.

نتایج: یافته‌ها نشان داد تفاوت معنی‌دار در فراوانی آل‌ل‌ها بین دو گروه مورد و شاهد وجود ندارد ($P > 0.05$). میزان BMI در بیماران حامل ژنوتیپ GA بیشتر از حاملین GG بود ($P < 0.05$). همچنین، فشار دیاستولیک در مردان بیمار حامل ژنوتیپ GA بیشتر از حاملین GG بود ($P < 0.05$). به علاوه، در زنان بیمار حامل ژنوتیپ GA میزان تری‌گلیسرید و آسپارتات آمینوترانسفراز بیشتر از زنان بیمار حامل GG بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد آلل G در کم شدن عوارض حاصل از بیماری کبد چرب غیرالکلی موثر است.

واژگان کلیدی: کبد چرب غیرالکلی، آدیپونکتین، پلی مورفیسم، بافت چربی

دو مانند علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۴، مهر و آبان ۹۷، صفحات ۳۸۶-۳۷۹

بافت چربی یکی از بافت‌های درونریز فعال است. بیش از ۱۰۰ فاکتور شناسایی شده توسط بافت چربی تولید و ترشح می‌شود که از جمله آنها می‌توان به آدیپوکین‌ها اشاره کرد [۷،۶]. آدیپونکتین یکی از آدیپوکین‌های است که شامل ۲۴۴ اسید آمینه با وزن مولکولی ۳۰ کیلو Dalton می‌باشد؛ در ساختار پلی‌پیتیدی آن ۴ دومین قابل تشخیص است [۸،۶]. آدیپونکتین دو گیرنده به نام‌های AdipoR1 و AdipoR2 دارد که به ترتیب در کبد و ماهیچه اسکلتی یافت می‌شوند [۹،۶]. آدیپونکتین روی فاکتور نکروز دهنه تومور موثر بوده و مانع بیان، ترشح و عمل آن می‌شود. فاکتور نکروز دهنه تومور یک سیتوکین پیش‌التهابی است که باعث ایجاد التهاب، لیپولیز و تخریب عمل انسولین می‌شود. لذا، آدیپونکتین بر درجات مختلف التهاب کبدی و دیابت نوع دو و نیز کبد چرب غیرالکلی موثر است [۱۰،۸]. مطالعات نشان می‌دهد در بیماری کبد چرب غیرالکلی و سیروز کبدی میزان آدیپونکتین کاهش می‌یابد [۱۱،۷]. متابولیسم چربی در کبد به وسیله پروتئین کیناز واپسیه به آدنوزین مونوفسفات تنظیم می‌گردد که توسط آدیپونکتین فعل می‌شود؛ از این‌رو به دلیل کاهش غلظت آدیپونکتین در این بیماران، سطح تری‌گلیسرید و LDL افزایش می‌یابد [۹-۱۴]. اثرات متقابل آدیپونکتین و کبد چرب غیرالکلی به دلیل نقش آدیپونکتین در افزایش میزان اکسیداسیون اسید چرب، کاهش گلکونوزنر و نوولپوژنر است؛ به عبارت دیگر، آدیپونکتین در متابولیسم لیپیدها و عمل

مقدمه

بیماری کبد چرب غیرالکلی (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن کبدی در بسیاری از کشورهای جهان است [۱،۲]. کبد چرب غیرالکلی نوعی آسیب بالینی است که در اثر رسوب و تجمع بیش از حد ذرات چربی در سلول‌های کبد ایجاد می‌شود [۲،۱] و ممکن است در نهایت به سیروز کبدی و سرطان کبد تبدیل شود [۱]. از مشخصات این بیماری، اختلال در متابولیزه کردن چربی‌ها، دیابت و فشار خون بالا [۲،۱] و نیز افزایش آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز کبدی است [۱]. فراوانی بیماری کبد چرب غیرالکلی حدود ۱۰ تا ۳۰ درصد است و در جمعیت بیماران دیابتی نوع ۲ فراوانی آن در حدود ۷۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است [۳،۲]. فراوانی این بیماری در آمریکایی‌های آفریقایی‌تبار کمتر و در آمریکایی‌های اسپانیایی‌تبار و اروپایی‌تبار بیشتر است [۵،۴].

^۱ دانشجو، گروه زیست شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

^۲ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران
^۳ دانشیار، مرکز تحقیقات علمی سلولی و مولکولی، گدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*^۴ نشان نهادنده مسئول، اسلامشهر، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۲۱۵۶۳۵۵۶۱۷۶، دورنوبیس: ۰۹۱۲۳۸۷۵۴۹۳

پست الکترونیک: ma_nejadali@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۳/۳۰

اخلاقی، اطلاعات درباره پژوهش و اهداف به افراد داده شد و در صورت داشتن رضایت کامل در این مطالعه وارد شدند. برای هر فرد پرسشنامه عمومی و پزشکی شامل سابقه بیماری، مصرف دارو و غیره تکمیل شد. از افراد مراجعه کننده به بیمارستان‌های مذکور با رعایت ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتابی، ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی گرفته شد. پنج میلی‌لیتر از نمونه مذکور در لوله حاوی EDTA و ۵ میلی‌لیتر باقی‌مانده در لوله فاقد ضد انعقاد ریخته شد. بعد از لخته شدن خون در لوله فاقد ضد انعقاد، سرم به کمک سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه ۳۰۰۰ RPM) جدا گردید و در دمای ۸۰-۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. DNA ژئومی از لوله‌های خون تام حاوی ضد انعقاد با روش Salting out استخراج گردید [۲۶] و در دمای ۲۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شاخص توده بدنه از تقسیم وزن به کیلوگرم بر مبنی‌ور قدم به متر اندازه‌گیری شد [۱۴، ۱۶]. سطح هورمون‌های آدیپونکتین و انسولین با استفاده از کیت الایزا شرکت مرکودیا تعیین شد. در این مطالعه اندازه‌گیری قند خون ناشتا، کلسترول تام، تری‌گلیسرید، LDL-C، HDL-C، AST و ALT به وسیله کیت پارس‌آزمون و با روش الایزا توسط دستگاه Biotechnica مدل BT3500 انجام شد. جهت تعیین ژنتیک پلی مورفیسم rs17300539 در ژن آدیپونکتین از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. برای این کار نیاز به دو پرایمر بود که توسط نرم‌افزارهای gene runner و الیگو طراحی شد و توالی آن در جدول شماره ۱ آمده است. عملکرد اختصاصی آغازگرها با پایگاه Blast تائید شد. برای تعیین پلی مورفیسم ابتدا به وسیله PCR یک توالی ۲۹۶ جفت بازی حامل پلی مورفیسم BioRad rs17300539 ژن آدیپونکتین در دستگاه ترموسایکلر ساخت کشور آمریکا تکثیر شد. جهت انجام واکنش Master mix مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل DNA (dNTP, Taq polymerase, MgCl₂) یک میکرولیتر بر ژئومی، یک میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول از میکرولیتر و آب مقطر تهیه شد. تمامی مواد مورد نیاز PCR از شرکت سیناژن تهیه گردید. برنامه تنظیم شده برای ترموسایکل برای عملکرد بهتر پرایمر در دو مرحله و بدین صورت بود: مرحله دناتوراسیون ابتدایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس، ۱۰ سیکل برای هر سیکل، دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه. سپس، ۲۰ سیکل شامل: دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱

انسولین نقش دارد [۱۵-۱۷]. علاوه براین، آدیپونکتین در تنظیم میزان AST و ALT موثر است و باعث کاهش سطح آنها می‌شود [۱۲، ۹]. اثر متقابل عوامل محیطی و فاکتورها ژنتیکی فنوتیپ‌های کبد چرب غیرالکلی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بسیاری از پلی مورفیسم‌های معمول در جمعیت آسیایی از جمله فاکتور خطر برای ابتلا به کبد چرب غیرالکلی است [۱۹، ۱۸]. مطالعات نشان می‌دهند بین تغییرات در سطح نوکلئوتید و سطح آدیپونکتین ارتباط وجود دارد. تحقیقات زیادی در زمینه بررسی اثرات پلی مورفیسم‌ها در ایجاد بیماری کبد چرب انجام شده است rs17300539 [۱۱]. برخی مطالعات نشان می‌دهند بین پلی مورفیسم و سطح آدیپونکتین ارتباط وجود دارد [۲۱، ۲۰، ۱۶]. تحقیقات rs17300539 نقش بازدارنده در ترشح آدیپونکتین داشته و باعث کاهش آدیپونکتین پلاسمای می‌گردد [۲۲]. بررسی‌های rs17300539 در برخی جمعیت‌ها نشان داده است که آلل G باعث افزایش بیان ژن آدیپونکتین و همچنین افزایش ترشح آن می‌گردد [۲۱]. این در حالی است که در rs17300539 باعث کاهش آدیپونکتین و افزایش ابلاستیک، دیابت Hivert و همکاران آلل G باعث مطالعه کاهش سطح آدیپونکتین و افزایش ابلاستیک، دیابت نوع ۲ و تری‌گلیسرید ارتباط نشان داده است [۲۳]. در این مطالعه فراوانی پلی مورفیسم rs17300539 و ارتباط آن با متغیرهای بیوشیمیابی، تن‌سنجه و بیماری کبد چرب غیرالکلی در یک جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به روش مورد-شاهدی در بازه زمانی شهریور ۱۳۹۵ لغایت مهر ۱۳۹۶ انجام شد. در این مطالعه از بین مراجعه-کنندگان به بیمارستان‌های بوعلی و امیرالمؤمنین تهران که تشخیص کبد چرب غیرالکلی آنان با سونوگرافی تائید شده بود، ۸۰ نفر به عنوان بیمار انتخاب شدند و از افرادی که بدلا لیل مختلف مراجعه کرده بودند و نتایج سونوگرافی کبد آنها طبیعی بود، ۸۰ نفر به عنوان شاهد انتخاب گردیدند. استخراج DNA و اندازه‌گیری متغیرهای بیوشیمیابی و تعیین پلی مورفیسم در پژوهشگاه غدد و متابولیسم دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. همه افراد انتخاب شده ایرانی بوده و از افراد غیر ایرانی اعم از افغان در پژوهش استفاده نشده است. شرط ورود به مطالعه عدم مصرف الکل و داروهای متabolیکی بود، زیرا داروهایی مانند متformorین که برای درمان بیماری کبد چرب غیرالکلی تجویز می‌شود موجب تغییر در سطح هورمون آدیپونکتین می‌گردد [۲۵، ۲۴]. جهت رعایت موازنین

سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

دقیقه و در پایان ۲۰ سیکل گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه

جدول شماره ۱- پرایمرهای استفاده شده برای انجام PCR

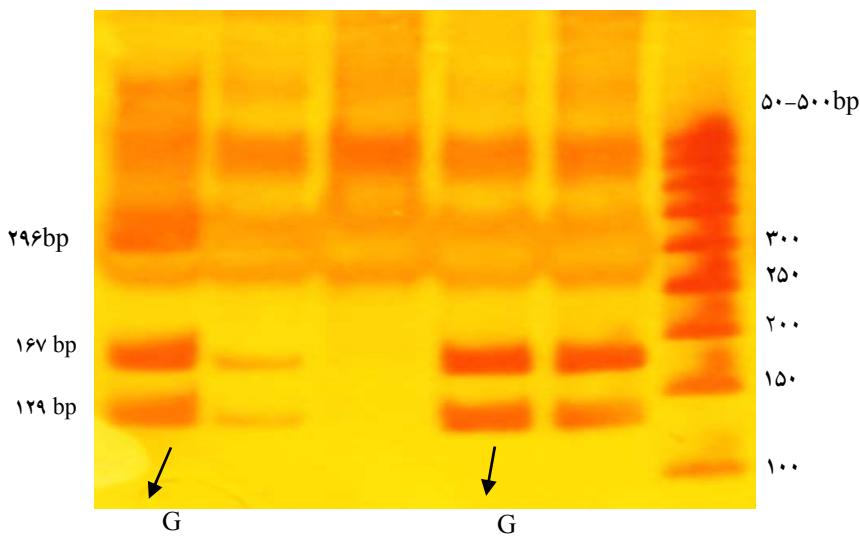
پلی مورفیسم شماره rs	Forward primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	اندازه توالی (bp)	نقطه ذوب درجه سانتی گراد
rs17300539 (-11391 G/A)	AGGCTCTGTGTGGACT GTGGA	CCTGGAGAACTGGAA GCTGC	۲۹۶	۶۳/۳

۱ نشان داده شده است. ژنوتیپ GA شامل سه باند با طول‌های ۲۹۶، ۱۶۷ و ۱۶۹ bp، ۲۹۶، ۱۶۷ و ۱۶۹ bp GG شامل دو باند با طول‌های ۲۹۶ و ۱۶۷ bp و ژنوتیپ AA شامل یک قطعه با طول ۱۶۹ bp است که در پژوهش حاضر مشاهده نشد (شکل شماره ۱). فراوانی ژنوتیپ GG در پلی‌مورفیسم rs17300539 به ترتیب در افراد سالم و بیمار ۹۶/۳ و ۹۰ درصد و فراوانی ژنوتیپ GA ۳/۸ درصد بود (جدول شماره ۳). تحلیل رگرسیونی ژنوتیپ‌ها نشان داد بین ژنوتیپ‌های GG و GA و بیماری کبد چرب غیرالکلی ارتباطی وجود ندارد. فراوانی آلل G در دو گروه سالم و بیمار به ترتیب ۹۸ و ۹۵ درصد بود. تحلیل رگرسیونی آلل G نشان داد تفاوت معنی‌دار بین فراوانی آلل G در گروه سالم و بیمار وجود ندارد ($P>0.05$). ارتباط بین ژنوتیپ‌های GG و GA و پلی‌مورفیسم rs17300539 ژن آدیپونکتین با متغیرهای بیوشیمیابی و تن‌سنگی در دو گروه سالم و بیمار بررسی شد (جدول شماره ۴). نتایج نشان می‌دهد میزان نمایه توده بدنه و فشار دیاستولیک در افراد بیمار حامل ژنوتیپ GA بیشتر از حاملین GG می‌باشد. در گروه سالم بین متغیرهای بیوشیمیابی و تن‌سنگی با ژنوتیپ‌های GG و GA ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. همان‌طور که در جدول شماره ۵ آمده است میزان تری‌گلیسرید و آنزیم AST در زنان بیمار حامل ژنوتیپ GA بیشتر از زنان بیمار حامل GG است ($P<0.05$). همچنین، سطح کلسترول تام در زنان بیمار حامل ژنوتیپ GA از حاملین GG بیشتر بود، اما اختلاف آنها معنی‌دار نبود. در مردان بیمار، حاملین ژنوتیپ GA در مقایسه با حاملین ژنوتیپ GG فشار دیاستولیک بیشتر داشتند. به علاوه، نتایج نشان داد در بیماران تفاوت معنی‌دار بین حاملین ژنوتیپ GA نسبت به GG از نظر تری‌گلیسرید، آنزیم AST و فشار دیاستولیک وجود دارد. سطح سرمی تری‌گلیسرید، قند خون ناشتا، AST، HDL، ALT و فشار دیاستولیک در افراد بیمار بالاتر از افراد سالم بود. سطح آدیپونکتین در افراد بیمار پایین‌تر از افراد سالم بود و نمایه توده بدنه (BMI) در افراد بیمار بالاتر بود.

صحت تکثیر قطعه مورد نظر به وسیله تکنیک الکتروفورز روی ژل آکریل آمید ۸ درصد بررسی گردید و رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره انجام شد. ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs17300539 ژن آدیپونکتین با استفاده از تکنیک RFLP و آنزیم محدود کننده MspI تعیین شد. جایگاه برش برای آنزیم محدود کننده MspI به ترتیب زیر بود: $3'...CGC\uparrow C...5'...C^{\downarrow}CGG...3'$. جهت تعیین ژنوتیپ محلوت واکنش شامل ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۹ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر بافر Tango و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MspI $\mu\text{l U}/\mu\text{l}$ به مدت ۴ ساعت هضم شد. با تکنیک الکتروفورز، قطعات حاصل از هضم آنزیمی تفکیک شد و مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای کمی به صورت میانگین \pm انحراف معیار و متغیرهای کیفی به صورت درصد بیان شد. برای مقایسه یافته‌های آزمایشگاهی و خصوصیات دموگرافیک در افراد سالم و بیمار از آزمون‌های t مستقل و من- ویتنی و برای متغیرهای کیفی از آزمون مجذور کای استفاده شد. با استفاده از رگرسیون لجستیک ارتباط بین خطر ابتلا به بیماری و هریک از ژنوتیپ‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه بین ژنوتیپ‌ها در بیماران به تفکیک زن و مرد و نیز سالم یا بیمار بودن با استفاده از روش‌های ذکر شده انجام شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید.

نتایج

در این پژوهش ۸۰ نفر به عنوان گروه بیمار و ۸۰ نفر به عنوان گروه شاهد وارد مطالعه شدند. میانگین سنی افراد بیمار ۵۷/۵ و ۴۴/۳۲ و افراد سالم ۳۵/۴۲ سال بود. تعداد ۴۶ زن سالم (۴۴/۳۲ درصد)، ۳۴ مرد سالم (۴۲/۵ درصد)، ۳۷ زن بیمار (۴۶/۳ درصد) و ۴۳ مرد بیمار (۵۳/۸ درصد) در مطالعه وارد شدند که تفاوت دو گروه از نظر جنسیت افراد معنی‌دار نبود (جدول شماره ۲). نتیجه الکتروفورز محصولات PCR پلی‌مورفیسم rs17300539 با استفاده از تکنیک RFLP و توسط آنزیم MspI در شکل شماره



شکل شماره ۱- نتیجه هضم آنزیمی پلی مورفیسم rs17300539 توسط آنزیم MspI: در این شکل طول قطعات بریده شده به وسیله آنزیم نمایش داده شده است. این قطعات در ژنوتیپ GA شامل سه باند با طولهای ۲۹۶، ۱۶۷ و ۱۲۹ bp و در ژنوتیپ GG شامل دو باند با طولهای ۱۶۷ و ۱۲۹ bp می‌باشد. ژنوتیپ AA نیز شامل یک باند با طول ۲۹۶ bp می‌باشد که در پژوهش حاضر وجود نداشت.

جدول شماره ۲- توزیع متغیرهای دموگرافیک و پروفایل‌های قند و لیپید و هومون‌های انسولین و آدیپونکتین در گروه‌های مطالعه

P	سلام (n=۸۰)	بیمار (n=۸۰)	متغیر
NS	۳۴/۴۶	۴۲/۴۷	جنس (زن / مرد)
NS	۳۵/۴۲±۸/۵	۴۴/۳۳±۹/۶	سن
P<۰/۰۰۱	۲۳/۶۱±۲/۹	۲۸/۷۴±۴/۶	BMI (Kg/M ²)
P<۰/۰۱	۹۲/۰۸±۸/۰۳	۹۱/۹۸±۱۳/۸	FBS (Mg/dL)
NS	۱۰۵/۶۸±۲۵/۰۱	۱۵۲/۰۱±۶۹/۹	Cholesterol (mg/dL)
P<۰/۰۰۱	۹۷/۵±۴۲/۹	۱۷۰/۳۰±۴۳/۲	Triglyceride (mg/dL)
NS	۸۹/۰۶±۲۲/۵	۹۴/۱۶±۳۰/۶	LDL (mg/dL)
P<۰/۰۰۱	۴۸/۴۲±۱۲/۱	۳۵/۱۵±۱۲/۶	HDL (mg/dL)
P<۰/۰۰۱	۱۶/۵۵±۴/۴	۲۶/۴۴±۸/۳	AST (IU/L)
P<۰/۰۰۱	۱۷/۹۱±۷/۸	۳۵/۳۳±۱۷/۲	ALT (IU/L)
NS	۱۱/۵۷±۱۱/۴	۲۲/۴۵±۳۳	Insulin (mM/L)
P<۰/۰۰۱	۷۱/۴۲±۳۰/۴	۵۳/۸۹±۲۵/۶	Adiponectin (mM/L)
P<۰/۰۵	۷/۹۵±۰/۳۵	۸/۰۹±۰/۶۷	Dystolic Pressure (mmHg)
NS	۱۱/۴۸±۱/۳	۱۲/۲±۱/۸	Systolic Pressure (mmHg)

جدول شماره ۳- ارتباط ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs17300539 با کبد چرب غیرالکلی

P	OR (CI=۹۵%)	سلام	بیمار	ژنوتیپ
NS		N=۸۰	N=۸۰	rs17300539
NS	۱/۸۵۲ (۰/۲-۲۳/۴)	۷۷ (%۶۶/۳)	۷۲ (%۹۰)	GG
NS	۰/۳۵ (۰/۰۹-۱/۳۷)	۳ (%۳/۸)	۸ (%۱۰)	GA
NS	۱/۷۵ (۰/۷۲-۱۰/۵۸)	۱۵۷ (%۹۸)	۱۵۲ (%۹۵)	G
NS	۰/۳۶ (۰/۰۹-۱/۳۹)	۳ (%۲)	۸ (%۰/۵)	A

جدول شماره ۴- بررسی پارامترهای بیوشیمیایی در گروه‌های مطالعه

متغیر	بیمار				سالم	P	بیمار	P	(n=۸۰)	سالم	P
	GG	GA	GG	GA							
ژنتیپ					۷۲		۸		۷۷		۳
تعداد					(۳۹/۷۳)		(۴/۴)		(۳۴/۶۳)		(۰/۴)
جنس (زن/ مرد)											
BMI (Kg/M ²)					۲۲/۳۷۶		۲۸/۰۳۱		۲۲/۵۶۷		P<۰/۰۵
FBS (Mg/Dl)					۹۱/۶۷		۹۴/۷۵		۸۷/۷۵		NS
Cholesterol (mg/dL)					۱۶۵/۷۵		۱۴۱/۷۵		۱۶۸/۱۸		NS
Triglyceride (mg/dL)					۱۵۱/۱۹		۱۵۶/۳۸		۹۶/۱۸		NS
LDL (mg/dL)					۹۲/۷۱		۱۰۷/۱۸		۸۹/۸۸		NS
HDL (mg/dL)					۳۴/۸۱		۳۸/۲۵		۴۸/۹۹		NS
AST (IU/L)					۲۶/۲۳		۲۸/۳۸		۱۸/۰۵		NS
ALT (IU/L)					۳۵/۲۰		۳۵/۶۳		۱۶/۶۴		NS
Insulin (mM/L)					۲۱/۹۶		۲۶/۸۸		۱۲/۵۴		NS
Adiponectin (mM/L)					۵/۴۱		۵/۱۶		۷/۵۵		NS
Dystolic Pressure (mmHg)					۸/۰۴		۸/۵۶		۷/۹۲		P<۰/۰۵
Systolic Pressure (mmHg)					۱۲/۱۹		۱۳/۰۶		۱۱/۵۹		NS

جدول شماره ۵- بررسی پارامترهای بیوشیمیایی و نمایه توده بدنی در بیماران حاملین ژنتیپ GG و GA با توجه به جنسیت

متغیر	مردان بیمار				زنان بیمار	P	مردان	P	زنان	P	متغیر
	GG	GA	GG	GA							
ژنتیپ					۳۹		۴		۳۳		۴
تعداد											
BMI (Kg/M ²)					۲۹/۲۹۳		۳۴/۱۶۸		۲۷/۶۰۱		۲۹/۸۹۵
FBS (Mg/Dl)					۹۰/۸۷		۸۷/۷۵		۹۲/۶۱		۱۰۱/۷۵
Cholesterol (mg/dL)					۱۶۸/۱۸		۱۴۱/۷۵		۱۷۳/۹۱		۱۸۹/۷۵
Triglyceride (mg/dL)					۱۶۸/۱۹		۱۴۱/۳۷۵		۱۳۹/۳۳		۲۲۳/۵۰
LDL (mg/dL)					۱۰۰/۲۶		۱۱۰/۷۵		۸۳/۷۹		۱۰۳/۶۰
HDL (mg/dL)					۳۴/۷۷		۳۹		۳۴/۸۵		۳۷/۵۰
AST (IU/L)					۲۷/۳۴		۲۵/۵۰		۲۴/۹۱		۳۱/۲۵
ALT (IU/L)					۳۶/۵۲		۲۳/۵۰		۲۳/۶۴		۳۸/۷۵
Insulin (mM/L)					۴/۸۷		۱۴/۸۵۰		۱۷/۲۶		۳۸/۹۲
Adiponectin (mM/L)					۴/۹۸		۵/۳۵		۷/۰۴		۵/۳۵
Dystolic Pressure (mmHg)					۸/۰۵		۸/۵		۸/۰۳		P<۰/۰۵
Systolic Pressure (mmHg)					۱۲/۲۰۵		۱۲/۱۸		۱۲/۱۲		۱۳

متابولیک را افزایش می‌دهد [۲۲]. در جمعیت مورد مطالعه ما فراوانی آلل G پلی‌مورفیسم rs17300539 در بیماران ۹۵ درصد و در افراد سالم ۹۸ درصد بود و تفاوت معنی داری نداشتند. فراوانی ژنتیپ GG در گروه سالم ۹۶/۳ درصد و در بیماران ۹۰ درصد و نیز فراوانی ژنتیپ GA در گروه سالم ۳ درصد و در بیماران ۱۰ درصد بود. تحلیل آماری داده‌ها تفاوت معنی داری را در فراوانی ژنتیپ‌ها بین گروه سالم و بیمار نشان نداد؛ یعنی ارتباطی بین ژنتیپ‌های این پلی‌مورفیسم و بیماری کبد چرب غیرالکلی وجود نداشت. برخلاف نتایج ما، Hivert و همکاران بیان کرده‌اند که آلل G در پلی‌مورفیسم rs17300539 ژن آدیپونکتین

بحث

در پژوهش حاضر فراوانی پلی‌مورفیسم rs17300539 ژن آدیپونکتین و ارتباط آن با متغیرهای بیوشیمیایی و شاخص توده بدنی بررسی شد. یافته‌های این تحقیق نشان داد اگرچه فراوانی آلل G در افراد سالم بیشتر است، اما تفاوت معنی دار نیست. همچنین، تفاوت معنی دار در میانگین تری‌گلیسرید، AST و نمایه توده بدن در بیماران حامل ژنتیپ GG نسبت به GA مشاهده شد. در بیماران حامل ژنتیپ GG نسبت به GA مطالعات متعددی در زمینه ارتباط SNP‌های ژن آدیپونکتین با بیماری کبد چرب غیرالکلی انجام شده است. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند بیماری کبد چرب غیرالکلی شناس شناس ابتلا به بیماری

Menzaghi و همکاران که روی جمعیت فرقه ای در منطقه مرکزی ایتالیا انجام شد، حاملین آلل A پلی مورفیسم GG rs17300539 دارای وزن و BMI کمتری نسبت به حاملین GG بودند [۲۹]. همچنین، پژوهش Morandi و همکاران روی جمعیت اصیل اروپایی نشان داد، حاملین آلل A دارای BMI پایین تری نسبت به حاملین GG هستند [۳۰] که این مورد برخلاف تحقیق ما می باشد. بر اساس نتایج ما در افراد مبتلا به بیماری کبد چرب غیرالکلی میزان BMI حاملین ژنوتیپ GA از حاملین GG بیشتر بود. اختلاف بین نتایج حاصل از پژوهش ما با برخی پژوهش های دیگر در این زمینه می تواند به علت اختلاف در حجم نمونه، تاثیر عوامل محیطی، سن، تزاد افراد شرکت کننده، اثرات سایر پلی مورفیسم ها و ژن ها و تداخل ژن ها باشد. از محدودیت های این مطالعه بروز کبد چرب در سن بالا و عدم مصرف الکل و داروهای متابولیکی در بیماران بود؛ از این رو تفاوت معنی دار در میانگین سنی افراد سالم و بیمار مشاهده شد. افراد سالم و بیماران مبتلا به کبد چرب غیرالکلی که در این طرح شرکت کردند سابقه مصرف داروی متابولیکی برای درمان نداشتند که این امر از مهم ترین ویژگی های این طرح می باشد.

نتیجه گیری

در مجموع می توان گفت وجود آلل G در کم شدن عوارض حاصل از بیماری کبد چرب غیرالکلی موثر است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمامی افراد شرکت کننده در این تحقیق و دوستان عزیزی که در پژوهش کده غدد دانشگاه شهید بهشتی ما را یاری رساندند، اعلام می نمایم.

References:

- [1] Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA* 2015; 313(22): 2263–73.
- [2] Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Soo-koian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1: 15080.
- [3] Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology* 2015; 148(3): 547–55.
- [4] Goh GB, McCullough AJ. Natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2016; 61(5): 1226–33.
- [5] Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y, et al. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology* 2016; 64(5): 1577–86.
- [6] Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol* 2016; 8(2): 101–9.
- [7] Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: A systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13(4): 643–54.

با افزایش ابتلا به سندروم متابولیک در ارتباط است و امکان ابتلا به دیابت نوع ۲ را افزایش می دهد [۲۲]. مطالعه Trlaled و همکاران روی ۱۲۸۵ زن و ۹۶۷ مرد در ایالات متحده آمریکا نشان داد پلی مورفیسم rs17300539 به عنوان مهار کننده ترشح آدیپونکتین عمل می کند و باعث کم شدن آدیپونکتین پلاسمای و عملکرد آن می گردد [۲۲]. مطالعه انجام شده توسط Wessel و همکاران در جمعیت مبتلا به بیماری قلبی و عروقی نیز ارتباط پلی مورفیسم rs17300539 با افزایش سطح سرمی آدیپونکتین را تائید کرد [۲۷]. Vasseur و همکاران نیز در جمعیت فرقه ای تبار فرانسوی بین آلل A و افزایش سطح سرمی آدیپونکتین ارتباط معنی داری مشاهده کردند [۲۸]. همچنین، Morandi و همکاران در جمعیت ایتالیایی نشان دادند سطح آدیپونکتین و انسولین در حاملین ژنوتیپ های GG پلی مورفیسم rs17300539 کمتر است و بین این پلی مورفیسم با سطح سرمی آدیپونکتین، قند خون ناشتا، سطح انسولین ناشتا، لیپویروتین با چگالی بالا، کلسترول و تری گلیسرید ارتباط وجود دارد [۲۵]. برخلاف این مطالعات در تحقیق ما بین ژنوتیپ های پلی مورفیسم و سطح انسولین و آدیپونکتین ارتباطی یافت نشد، ولی بین ژنوتیپ ها و نمایه توده بدنه و فشار خون دیاستولی ارتباط معنی دار مشاهده شد. همچنین، ارتباط معنی دار بین سطح تری گلیسرید با ژنوتیپ ها در زنان بیمار یافت شد. در پژوهش حاضر میزان انسولین بیماران حامل ژنوتیپ GA از حاملین ژنوتیپ GG بیشتر بود و این نتیجه نشان می دهد وجود آلل G بر میزان انسولین موثر است. در زنان مبتلا به بیماری کبد چرب غیرالکلی سطح سرمی AST در حاملین ژنوتیپ GA rs17300539 در ژن آدیپونکتین از حاملین ژنوتیپ GG بیشتر بود. همچنین، میزان فشار دیاستولیک در بیماران حامل ژنوتیپ GA بالاتر از حاملین GG بود. بر اساس نتایج مطالعه

- [8] Robinson K, John Prins J, Venkatesh B. Clinical review: Adiponectin biology and its role in inflammation and critical illness. *Crit Care* 2011; 15(2): 221.
- [9] Koehler EM, Plompene EP, Schouten JN, Hansen BE, Darwish Murad S, et al. Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: The Rotterdam study. *Hepatology* 2016; 63(1): 138–47.
- [10] Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001; 50(9): 2094–9.
- [11] Reeves HL, Zaki MY, Day CP. Hepatocellular carcinoma in obesity, type 2 diabetes, and NAFLD. *Dig Dis Sci* 2016; 61(5): 1234–45.
- [12] Wei Z, Li-Oun Z, Xiao-ling H, Jian Q, Guoyue Y. Association of adiponectin gene polymorphism and additional gene–gene interaction with nonalcoholic fatty liver disease in the Chinese Han population. *Hepatol INT* 2016; 10(3): 511–17.
- [13] Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S, et al. Hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis in United States veterans is associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14(1): 124–31.
- [14] European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016; 64(6): 1388–402.
- [15] Zhou Y, Oresic M, Leivonen M, Gopalacharyulu P, Hyysalo J, Arola J, et al. Noninvasive detection of nonalcoholic steatohepatitis using clinical markers and circulating levels of lipids and metabolites. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14(10): 1463–72.
- [16] Loomba R, Quehenberger O, Armando A, Dennis EA. Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *J Lipid Res* 2015; 56(1): 185–92.
- [17] Kaswala DH, Lai M, Afshar NH. Fibrosis assessment in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci* 2016; 61(5): 1356–64.
- [18] Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *BMC-Med* 2017; 15(1): 45.
- [19] Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2015; 149(2): 389–97.
- [20] Paouri E, Tzara O, Kartalou GI, Zenelak S, Georgopoulos S. Peripheral Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) modulates amyloid pathology by regulating blood-derived immune cells and glial response in the brain of AD/TNF transgenic mice. *J Neurosci* 2017; 37(20): 2484–16.
- [21] Polyzos SA, Kountouras J. Nonalcoholic fatty liver diseases and adipokines: a novel role for fat imbalance. *Immuno-Gastroenterol* 2014; 2: 129–31.
- [22] Henneman P, Aulchenko YS, Frants RS, Zorkoltseva IV, Zillikens MC, Frolich ME, et al. Genetic architecture of plasma adiponectin overlaps with the genetics of metabolic syndrome. *Diabet Car* 2010; 33(4): 908–13.
- [23] Hivert MF, Manning AK, McAtee JB, Florez JC, Dupuis J, Fox CS, et al. Common variants in the adiponectin gene (ADIPOQ) associated with plasma adiponectin levels, type 2 diabetes and diabetes-related quantitative traits: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2008; 57(12): 3353–9.
- [24] Li Y, Liu L, Wang B, Wang J, Chen D. Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Rep* 2013; 1(1): 57–64.
- [25] Morandi A, Maffei C, Lobbens, Bouatia-Najib, Huide B, Pineil D, F roquel, Early detrimental metabolic outcomes of rs17300539- A allele of AdipoQ gene despite higher adiponectinemia. *Obesity* 2010; 18(7): 1469–73.
- [26] Souvik Ghatak, Rajendra Bose Muthukumaran, and Senthil Kumar Nachimuthu Author information Copyright and License information. A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis. *J Biomol Tech* 2013; 24(4): 224–31.
- [27] Wassel CL, Pankow JS, Jacobs Jr DR, Steffes MW, Li NA, Schreiner PJ. Variants in the adiponectin gene and serum adiponectin: the Coronary Artery Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Obesity* 2010; 18(12): 2333–8.
- [28] Vasseur F, Helbecque N, Lobbens S, Vasseur-Delannoy V, Dina C, Clement C, et al. Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabesity. *Diabetologia* 2005; 48(5): 892–99.
- [29] Menzaghi C, Ercolino T, Salvemini L, Coco A, Fini G, Di Paola R, et al. Multigenic control of serum adiponectin levels: evidence for a role of the APM1 gene and a locus on 14q13. *Physiol Genomic* 2005; 19(2): 170–4.
- [30] Morandi A, Maffei C, Lobbens S, Bouatia-Naji N, Heude B, Pinelli L, et al. Early detrimental metabolic outcomes of rs17300539-A Allele of ADIPOQ gene despite higher adiponectinemia. *Obesity* 2010; 18(7): 1469–73.