

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 ژن آدیپونکتین با بیماری کبد چرب غیرالکلی در یک جمعیت ایرانی

فهیمة رضایی^۱، معصومه نژادعلی^{۲*}، مهدی هدایتی^۳

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 ژن 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 اندازه گیری 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 تری گلیسرید و آسپاراتات 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 ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۴، مهر و آبان ۹۷، صفحات ۳۸۶-۳۷۹

مقدمه

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 آدیپوکین‌هاست که شامل ۲۴۴ اسید آمینه با وزن مولکولی ۳۰ کیلودالتون می‌باشد؛ در ساختار پلی پپتیدی 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 دهنده تومور موثر بوده و مانع بیان، ترشح و عمل آن می‌شود. فاکتور نکروز دهنده 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 وابسته به آدنوزین مونوفسفات تنظیم می‌گردد که توسط آدیپونکتین فعال می‌شود؛ از این رو به دلیل کاهش غلظت آدیپونکتین در این بیماران، سطح تری گلیسرید و LDL افزایش می‌یابد [۹-۱۴]. اثرات متقابل آدیپونکتین و کبد چرب غیرالکلی به دلیل نقش آدیپونکتین در افزایش میزان اکسیداسیون اسید چرب، کاهش گلکونوژنز و نوولپوژنز است؛ به عبارت دیگر، آدیپونکتین در متابولیسم لیپیدها و عمل

بیماری کبد چرب غیرالکلی (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن کبدی در بسیاری از کشورهای جهان است [۲،۱]. کبد چرب غیر-الکلی 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 متابولیسم چربی‌ها، دیابت و فشار خون بالا [۲،۱] و نیز افزایش آسپاراتات 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 آفریقایی تبار کمتر و در آمریکایی‌هایی اسپانیایی تبار و اروپایی تبار بیشتر است [۵،۴].

^۱ دانشجوی، 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، غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

اسلامشهر، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی

دوره نویسی: ۰۲۱۵۶۳۵۶۱۷۶

تلفن: ۰۹۱۲۳۸۷۵۴۳۳

پست الکترونیک: ma_nejadali@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۳/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۷

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 ناشتایی، ۱۰ میلی لیتر نمونه خون محیطی گرفته شد. پنج میلی لیتر از نمونه مذکور در لوله حاوی EDTA و ۵ میلی لیتر باقی مانده در لوله فاقد ضد انعقاد ریخته شد. بعد از لخته شدن خون در لوله فاقد ضد انعقاد، سرم به کمک سانتریفوژ (۱۰ دقیقه ۳۰۰۰ RPM) جدا گردید و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. DNA ژنومی از لوله‌های خون تام حاوی ضد انعقاد با روش Salting out استخراج گردید [۲۶] و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. شاخص توده بدنی از تقسیم وزن به کیلوگرم بر مجذور قد به متر اندازه گیری شد [۱۴، ۱۶]. سطح هورمون‌های آدیپونکتین و انسولین با استفاده از کیت الایزا شرکت مرکودیا تعیین شد. در این مطالعه اندازه گیری قند خون ناشتا، کلسترل تام، تری گلیسرید، HDL-C، LDL-C، ALT و AST به وسیله کیت پارس‌آزمون و با روش الایزا توسط دستگاه Biotechnica مدل BT3500 انجام شد. جهت تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم rs17300539 در ژن آدیپونکتین از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد. برای این کار نیاز به دو پرایمر بود که توسط نرم افزارهای 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 rs17300539 ژن آدیپونکتین در دستگاه ترموسایکلر BioRad ساخت کشور آمریکا تکثیر شد. جهت انجام واکنش PCR، مخلوط واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل Master mix (dNTP, Taq polymerase, MgCl₂)، یک میکرولیتر DNA ژنومی، یک میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر و آب مقطر تهیه شد. تمامی مواد مورد نیاز PCR از شرکت سیناژن تهیه گردید. برنامه تنظیم شده برای ترموسایکلر برای عملکرد بهتر پرایمر در دو مرحله و بدین صورت بود: مرحله دناتوراسیون ابتدایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد، سپس، ۱۰ سیکل برای هر سیکل، دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت یک دقیقه. سپس، ۲۰ سیکل شامل: دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۱

انسولین نقش دارد [۱۷-۱۵]. علاوه بر این، آدیپونکتین در تنظیم میزان AST و ALT موثر است و باعث کاهش سطح آن‌ها می شود [۱۲، ۹]. اثر متقابل عوامل محیطی و فاکتورها ژنتیکی فنوتیپ‌های کبد چرب غیرالکلی را تحت تاثیر قرار می دهد. بسیاری از پلی مورفیسم‌های معمول در جمعیت آسیایی از جمله فاکتور خطر برای ابتلا به کبد چرب غیرالکلی است [۱۹، ۱۸]. مطالعات نشان می دهند 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 [۱۱]. برخی مطالعات نشان می دهند بین پلی مورفیسم rs17300539 و سطح آدیپونکتین ارتباط وجود دارد [۲۱، ۲۰، ۱۶]. تحقیقات Trlated و همکارانش در ایالات متحده آمریکا نشان داد پلی-مورفیسم rs17300539 نقش بازدارنده در ترشح آدیپونکتین داشته و باعث کاهش آدیپونکتین پلاسما می گردد [۲۲]. بررسی‌های انجام شده روی پلی مورفیسم rs17300539 در برخی جمعیت‌ها نشان داده است که آلل G باعث افزایش بیان ژن آدیپونکتین و همچنین افزایش ترشح آن می گردد [۲۱]. این در حالی است که در مطالعه Hivert و همکاران آلل G پلی مورفیسم rs17300539 با کاهش سطح آدیپونکتین و افزایش ابتلا به سندروم متابولیک، دیابت نوع ۲ و تری گلیسرید ارتباط نشان داده است [۲۳]. در این مطالعه فراوانی پلی مورفیسم rs17300539 و ارتباط آن با متغیرهای بیوشیمیایی، تن سنجی 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 امیرالمومنین تهران که تشخیص کبد چرب غیرالکلی آنان با سونوگرافی تائید شده بود، ۸۰ نفر به-عنوان بیمار 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 گردیدند. استخراج DNA و اندازه گیری متغیرهای بیوشیمیایی 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 متابولیکی بود، زیرا داروهایی مانند متفورمین که برای درمان بیماری کبد چرب غیرالکلی تجویز می شود موجب تغییر در سطح هورمون آدیپونکتین می گردد [۲۴، ۲۵]. جهت رعایت موازین

دقیقه و در پایان ۲۰ سیکل گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

جدول شماره ۱- پرایمرهای استفاده شده برای انجام PCR

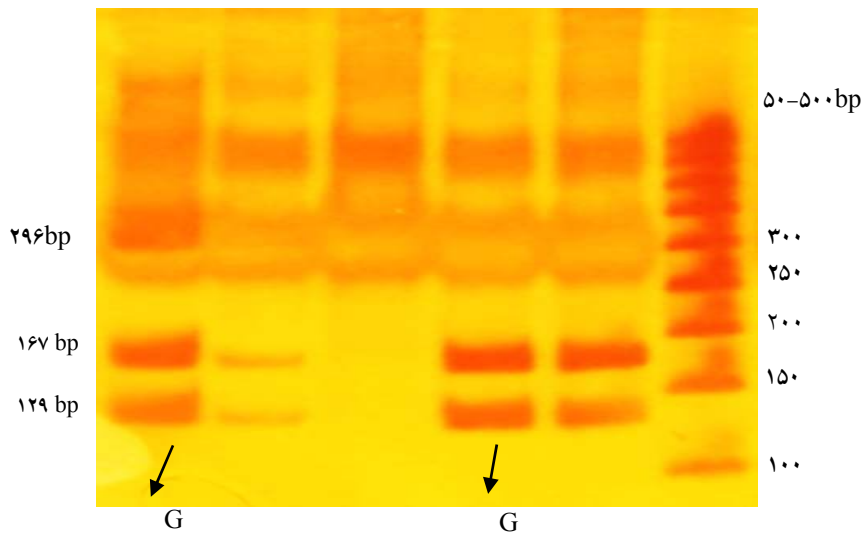
بلی مورفیسیم شماره rs	Forward primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	اندازه توالی (bp)	نقطه ذوب درجه سانتی‌گراد
rs17300539 (-11391 G/A)	AGGCTCTGTGTGGACT GTGGA	CCTGGAGAAGCTGGAA GCTGC	۲۹۶	۶۳٫۳

۱ نشان داده شده است. ژنوتیپ GA شامل سه باند با طول‌های ۲۹۶، ۱۶۷ و ۱۲۹ bp، ژنوتیپ GG شامل دو باند با طول‌های ۱۲۹ و ۱۶۷ bp و ژنوتیپ AA شامل یک قطعه با طول ۲۹۶ bp است که در پژوهش حاضر مشاهده نشد (شکل شماره ۱). فراوانی ژنوتیپ GG در پلی‌مورفیسیم rs17300539 به ترتیب در افراد سالم و بیمار ۹۶/۳ و ۹۰ درصد و فراوانی ژنوتیپ GA ۳/۸ و ۱۰ 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 پلی-مورفیسیم rs17300539 ژن آدیپونکتین با متغیرهای بیوشیمیایی و تن‌سنجی در دو گروه سالم و بیمار بررسی شد (جدول شماره ۴). نتایج نشان می‌دهد میزان نمایه توده بدنی و فشار دیاستولیک در افراد بیمار حامل ژنوتیپ GA بیشتر از حاملین GG می‌باشد. در گروه سالم بین متغیرهای بیوشیمیایی و تن‌سنجی 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، HDL، AST، 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 بدنی (BMI) در افراد بیمار بالاتر بود.

صحت تکثیر قطعه مورد نظر به وسیله تکنیک الکتروفورز روی ژل آکریل‌آمید ۸ درصد بررسی گردید و رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره انجام شد. ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسیم rs17300539 ژن آدیپونکتین با استفاده از تکنیک RFLP و آنزیم محدود کننده MspI تعیین شد. جایگاه برش برای آنزیم محدود کننده MspI ترتیب زیر بود: 3'...CGG... 5' و 5'...GGC... 3'. جهت تعیین ژنوتیپ مخلوط واکنش شامل ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۹ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر بافر Tango و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MspI $U/\mu l$ ۱۰ تهیه گردید و در دمای ۳۷ °C 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 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 ۴۴/۳۲ و افراد سالم ۳۵/۴۲ سال بود. تعداد ۴۶ زن سالم (۵۷/۵ 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 پلی‌مورفیسیم 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 طول های ۲۹۶، ۱۶۷ و ۱۲۹ bp و در ژنوتیپ GG شامل دو باند با طول های ۱۲۹ و ۱۶۷ می باشد. ژنوتیپ AA نیز شامل یک باند با طول ۲۹۶ bp می باشد که در پژوهش حاضر وجود نداشت.

جدول شماره ۲- توزیع متغیرهای دموگرافیک و پروفایل های قند و لیپید و هورمون های انسولین و آدیپونکتین در گروه های مطالعه

متغیر	بیمار (n=۸۰)	سالم (n=۸۰)	P
جنس (زن / مرد)	۴۳/۳۷	۳۴/۴۶	NS
سن	۴۴/۳۳±۹/۶	۳۵/۴۲±۸/۵	NS
BMI (Kg/M ²)	۲۸/۷۴±۴/۶	۲۳/۶۱±۲/۹	P<۰/۰۰۱
FBS (Mg/Dl)	۹۱/۹۸±۱۳/۸	۹۲/۰۸±۸/۰۳	P<۰/۰۱
Cholesterol (mg/dL)	۱۵۲/۰۱±۶۹/۹	۱۰۵/۶۸±۲۵/۰۱	NS
Triglyceride (mg/dL)	۱۷۰/۳۰±۴۳/۲	۹۷/۵±۴۲/۹	P<۰/۰۰۱
LDL (mg/dL)	۹۴/۱۶±۳۰/۶	۸۹/۰۶±۲۲/۵	NS
HDL (mg/dL)	۳۵/۱۵±۱۲/۶	۴۸/۴۲±۱۲/۱	P<۰/۰۰۱
AST (IU/L)	۲۶/۴۴±۸/۳	۱۶/۵۵±۴/۴	P<۰/۰۰۱
ALT (IU/L)	۳۵/۳۳±۱۷/۲	۱۷/۹۱±۷/۸	P<۰/۰۰۱
Insulin (mM/L)	۲۲/۴۵±۳۳	۱۱/۵۷±۱۱/۴	NS
Adiponectin (mM/L)	۵۳/۸۹±۲۵/۶	۷۱/۴۳±۳۰/۴	P<۰/۰۰۱
Dystolic Pressure (mmHg)	۸/۰۹±۰/۶۷	۷/۹۵±۰/۳۵	P<۰/۰۰۵
Systolic Pressure (mmHg)	۱۲/۲±۱/۸	۱۱/۴۸±۱/۳	NS

جدول شماره ۳- ارتباط ژنوتیپ های پلی مورفیسم rs17300539 با کبد چرب غیر الکلی

ژنوتیپ	بیمار	سالم	OR (CI=۰/۹۵)	P
rs17300539	N=۸۰	N=۸۰		NS
GG	۷۲ (۰/۹۰)	۷۷ (۰/۹۶/۳)	۲/۸۵۲ (۰/۲ - ۲۳/۴)	NS
GA	۸ (۰/۱۰)	۳ (۰/۳/۸)	۰/۳۵ (۰/۰۹ - ۱/۳۷)	NS
G	۱۵۲ (۰/۹۵)	۱۵۷ (۰/۹۸)	۲/۷۵ (۰/۷۲ - ۱۰/۵۸)	NS
A	۸ (۰/۰۵)	۳ (۰/۲)	۰/۳۶ (۰/۰۹ - ۱/۳۹)	NS

جدول شماره ۴- بررسی پارامترهای بیوشیمیایی در گروه‌های مطالعه

متغیر	بیمار (n=۸۰)		سالم (n=۸۰)		P بیمار	P سالم
	GA	GG	GA	GG		
ژنوتیپ						
تعداد	۸	۷۲	۳	۷۷		
جنس (زن/ مرد)	(۴/۴)	(۳۹/۳۳)	(۰/۳)	(۳۴/۴۳)		
BMI (Kg/M ²)	۲۸/۰۳۱	۲۳/۳۷۶	۲۳/۵۶۷	۲۲/۶۶۰	P<۰/۰۵	NS
FBS (Mg/Dl)	۹۴/۷۵	۹۱/۶۷	۸۷/۷۵	۹۰/۸۷	NS	NS
Cholesterol (mg/dL)	۱۶۵/۷۵	۱۷۰/۸۱	۱۶۱/۷۵	۱۴۱/۷۵	NS	NS
Triglyceride (mg/dL)	۱۵۶/۳۸	۱۵۱/۱۹	۹۵/۲۵	۹۶/۱۸	NS	NS
LDL (mg/dL)	۱۰۷/۱۸	۹۲/۷۱	۸۸/۸۶	۸۹/۸۸	NS	NS
HDL (mg/dL)	۳۸/۲۵	۳۴/۸۱	۴۸/۹۹	۵۱/۴۵	NS	NS
AST (IU/L)	۲۸/۳۸	۲۶/۲۳	۱۷/۶۵	۱۸/۰۵	NS	NS
ALT (IU/L)	۳۵/۶۳	۳۵/۲۰	۱۶/۶۴	۱۸/۳۵	NS	NS
Insulin (mM/L)	۲۶/۸۸	۲۱/۹۶	۸/۶۵	۱۲/۵۴	NS	NS
Adiponectin (mM/L)	۵/۱۶	۵/۴۱	۷/۵۵	۷/۷۲	NS	NS
Dystolic Pressure (mmHg)	۸/۵۶	۸/۰۴	۸	۷/۹۲	P<۰/۰۵	NS
Systolic Pressure (mmHg)	۱۳/۰۶	۱۲/۱۹	۱۱/۴۳	۱۱/۵۹	NS	NS

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

متغیر	مردان بیمار (n=۴۳)		زنان بیمار (n=۳۷)		P مردان	P زنان
	GA	GG	GA	GG		
ژنوتیپ						
تعداد	۴	۳۹	۴	۳۳		
BMI (Kg/M ²)	۳۴/۱۶۸	۲۹/۲۹۳	۲۷/۶۰۱	۲۹/۸۹۵	NS	NS
FBS (Mg/Dl)	۸۷/۷۵	۹۰/۸۷	۱۰۱/۷۵	۹۲/۶۱	NS	NS
Cholesterol (mg/dL)	۱۴۱/۷۵	۱۶۸/۱۸	۱۷۳/۹۱	۱۸۹/۷۵	NS	NS
Triglyceride (mg/dL)	۱۴۱/۳۷۵	۱۶۸/۱۹	۱۳۹/۳۳	۲۲۳/۵۰	P<۰/۰۵	NS
LDL (mg/dL)	۱۱۰/۷۵	۱۰۰/۲۶	۸۳/۷۹	۱۰۳/۶۰	NS	NS
HDL (mg/dL)	۳۹	۳۴/۷۷	۳۴/۸۵	۳۷/۵۰	NS	NS
AST (IU/L)	۲۵/۵۰	۲۷/۳۴	۲۴/۹۱	۳۱/۲۵	P<۰/۰۵	NS
ALT (IU/L)	۲۳/۵۰	۳۶/۵۲	۲۳/۶۴	۳۸/۷۵	NS	NS
Insulin (mM/L)	۱۴/۸۵۰	۲۵/۹۴	۱۷/۲۶	۳۸/۹۲	NS	NS
Adiponectin (mM/L)	۴/۹۸	۴/۸۷	۷/۰۴	۵/۳۵	NS	NS
Dystolic Pressure (mmHg)	۸/۶۲	۸/۰۵	۸/۰۳	۸/۵	P<۰/۰۵	NS
Systolic Pressure (mmHg)	۱۳/۱۲	۱۲/۲۰۵	۱۲/۱۸	۱۳	NS	NS

بحث

در پژوهش حاضر فراوانی پلی مورفیسم 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 معنی‌دار نیست. همچنین، تفاوت معنی‌دار در میانگین تری‌گلیسرید، AST و نمایه توده بدن در بیماران حامل ژنوتیپ GG نسبت به GA مشاهده شد. 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 شانس ابتلا به بیماری

متابولیک را افزایش می‌دهد [۲۲]. در جمعیت مورد مطالعه ما فراوانی آلل G پلی مورفیسم rs17300539 در بیماران ۹۵ درصد و در افراد سالم ۹۸ درصد بود و تفاوت معنی‌داری نداشتند. فراوانی ژنوتیپ GG در گروه سالم ۹۶/۳ درصد و در بیماران ۹۰ درصد و نیز فراوانی ژنوتیپ GA در گروه سالم ۳ درصد و در بیماران ۱۰ درصد بود. تحلیل آماری داده‌ها تفاوت معنی‌داری را در فراوانی ژنوتیپ‌ها بین گروه سالم و بیمار نشان نداد؛ یعنی ارتباطی بین ژنوتیپ‌های این پلی مورفیسم و بیماری کبد چرب غیر-الکلی وجود نداشت. برخلاف نتایج ما، Hivert و همکاران بیان کرده‌اند که آلل G در پلی مورفیسم rs17300539 ژن آدیپونکتین

Menzaghi و همکاران که روی جمعیت قفقازی در منطقه مرکزی ایتالیا انجام شد، حاملین آلل A پلی مورفیسم 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، نژاد 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 پژوهشکده 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, Sookoian 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.

با افزایش ابتلا به سندرم متابولیک در ارتباط است و امکان ابتلا به دیابت نوع ۲ را افزایش می دهد [۲۳]. مطالعه Trlated 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 پلاسما و عملکرد آن می گردد [۲۲]. مطالعه انجام شده توسط Wassel و همکاران در جمعیت مبتلا به بیماری قلبی و عروقی نیز ارتباط پلی مورفیسم rs17300539 با افزایش سطح سرمی آدیپونکتین را تأیید کرد [۲۷]. Vasseur و همکاران نیز در جمعیت قفقازی تبار فرانسوی بین آلل A و افزایش سطح سرمی آدیپونکتین ارتباط معنی داری مشاهده کرده اند [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، لیپوپروتئین 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 بدنی 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

[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.

- [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, Plompen 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 non-alcoholic 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, Afdhal 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, McAteer 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 S, Bouatia-Najin, Heude B, Pineil D, Froquelp, 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. Hypoadiponectinemia 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 diabetes. *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.