Original Article

Determination of apolipoprotein E genotyping in diabetic patients with cardiovascular diseases with allele specific PCR method

Rashidian B, Rezvani Z*

Department of Biotechnology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, I.R. Iran.

2022/04/15 | Accepted: 2022/09/3

Abstract:

Background: Apolipoprotein E (ApoE) is one of the several important lipoproteins in lipid metabolism, and many studies have been conducted on it. In various studies, the role of this protein in diseases such as Alzheimer's disease, cardiovascular disease, diabetes and immune deficiency diseases such as AIDS have been addressed. The gene is a polymorphic apolipoprotein with three transcripts or different alleles called e2, e3 and e4. These three alleles have six genotypes E2E2, E2E3, E2E4, E3E3, E3E4 and E4E4 with different frequency in the population. Depending on the demographic, geographic and racial characteristics of these genotypes, they are seen with varying frequency in the population, which is in any case the highest frequency related to E3E3. In this study determinated apolipoprotein E genotyping in diabetic patients with cardiovascular diseases with allele specific PCR method.

Materials and Methods: This study was performed on 107 blood samples of diabetic patients with cardiovascular disease living in Kashan. To determine the genotype of this gene, allele specific PCR with five primers was used and then the pattern of bands in electrophoresis was used.

Results: The results show that in this population (diabetic patients with cardiovascular disease living in Kashan), as in most Iranian and world populations, the most genotype is E3E3. Also, the frequency of e2, e3 and e4 alleles is 5.1, 79 and 15.9%, respectively.

Conclusion: This study shows that there is an average impact of this genotype on lipoproteins of plasma or types of CVD, so it can be helpful to predict and prevent diseases associated with this genotype.

Keywords: Apolipoprotein E genotype, Cardiovascular disease, Diabetes, Relative allele frequency, Allele specific PCR

***Corresponding Author**
Email: rezvani@kashanu.ac.ir
Tel: 0098 31 55912301
Fax: 0098 31 559 12397

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, September, 2022; Vol. 26, No 4, Pages 466-473

Please cite this article as: Rashidian B, Rezvani Z. Determination of apolipoprotein E genotyping in diabetic patients with cardiovascular diseases with allele specific PCR method. ***Feyz*** 2022; 26(4): 466-73.

تعیین ژنوتیپ آپولیپوپروتئین E در بیماران دیابتی با عارضه قلبی - عروقی با تکنیک PCR اختصاصی آلل

بهاره رشیدیان[۱]، زهرا رضوانی[۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: آپولیپوپروتئین E (ApoE) یکی از چند لیپوپروتئین مهم در متابولیسم لیپیدهاست که پژوهش‌های فراوانی در رابطه با آن انجام شده است. در این پژوهش‌ها به نقش این پروتئین در بیماری‌هایی مثل آلزایمر، بیماری‌های قلبی - عروقی، دیابت و بیماری‌های نقص ایمنی مانند ایدز پرداخته شده است. ژن این آپولیپوپروتئین چندشکلی و دارای سه رونوشت یا آلل مختلف به نام‌های e2، e3 و e4 است. این سه آلل به‌صورت شش ژنوتیپ E2E2، E2E3، E2E4، E3E3، E3E4 و E4E4 با فراوانی‌های مختلفی در جمعیت وجود دارند. بسته به ویژگی‌های جمعیتی، جغرافیایی و نژادی، این ژنوتیپ‌ها با فراوانی متغیر در جمعیت دیده می‌شوند که در هر حال بیشترین فراوانی مربوط به E3E3 است. در این تحقیق ژنوتیپ آپولیپوپروتئین E در بیماران دیابتی با عارضه قلبی - عروقی با تکنیک PCR اختصاصی آلل تعیین شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه روی ۱۰۷ نمونه خون بیمار دیابتی دارای بیماری‌های قلبی - عروقی ساکن شهر کاشان انجام گرفت. برای تعیین ژنوتیپ این ژن، از تکنیک PCR اختصاصی آلل با پنج پرایمر و سپس بررسی الگوی باندها در الکتروفورز استفاده شد.

نتایج: داده‌ها نشان می‌دهد که در جمعیت موردمطالعه یعنی بیماران دیابتی دارای بیماری‌های قلبی - عروقی ساکن شهر کاشان، بیشترین ژنوتیپ E3E3 است. همچنین فراوانی آلل‌های e2، e3 و e4 به‌ترتیب برابر با ۵/۱، ۷۹ و ۱۵/۹ درصد است.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که تأثیر متوسط این ژنوتیپ بر لیپوپروتئین‌های پلاسما یا انواع CVD وجود دارد، بنابراین می‌تواند برای پیش‌بینی و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با این ژنوتیپ مفید باشد.

واژگان کلیدی: آپولیپوپروتئین E، تعیین ژنوتیپ، بیماری قلبی - عروقی، دیابت، فراوانی نسبی آلل، تکنیک PCR اختصاصی آلل

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و ششم، شماره ۴، مهر-آبان ۱۴۰۱، صفحات ۴۷۳-۴۶۶

مقدمه

شواهد متعددی وجود دارد که آپولیپوپروتئین E یک پروتئین کلیدی در دیابت و آترواسکلروز است. دیابت، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های جهان است. براساس تخمین فدراسیون دیابت در سال ۲۰۲۲، ۵۳۷ میلیون بزرگسال در جهان مبتلا به دیابت بودند که تا سال ۲۰۴۵ این تعداد به ۷۸۳ میلیون خواهد رسید [۱]. از آن‌جایی که دیابت یکی از عوامل خطر عمده بیماری قلبی - عروقی است، درک گره مکانیسمی بین این بیماری‌ها بسیار اهمیت دارد [۲]. روشن است که مکانیسم‌های مرتبط به لیپوپروتئین، با تخریب‌های سیستم قلبی - عروقی در بیماران دیابتی مرتبط است [۳].

۱. کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

*نشانی نویسنده مسؤول:

کاشان، دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

تلفن: ۰۳۱ ۵۵۹۱۲۳۰۱ دورنویس: ۰۳۱ ۵۵۹۱۲۳۹۷

پست الکترونیک: Rezvani@kashanu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۲۶ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۶/۱۲

ژن ApoE که بر پاک‌سازی لیپوپروتئین [۴] و در پی آن بر پروفایل لیپیدی در بدن انسان تاثیر دارد [۵]، یکی از ژن‌هایی است که در چند دهه اخیر بسیار مورد مطالعه قرار داده شده است. ApoE انسانی یک گلیکوپروتئین ۳۴ کیلودالتونی بوده که عمدتاً در کبد سنتز شده، نقشی کلیدی در متابولیسم لیپید و انتقال آن دارد [۶]. ژن ApoE چندشکلی با سه آلل رایج e2، e3 و e4 است [۷]. این ژن‌ها سه ایزوفرم پروتئینی ApoE را کد می‌کنند که در e2 به‌صورت (سیستئین ۱۱۲/ سیستئین ۱۵۸)، در e3 به‌صورت (سیستئین ۱۱۲/ آرژنین ۱۵۸) و در e4 به‌صورت (آرژنین ۱۱۲/ آرژنین ۱۵۸) بوده که تنها در مکان‌های ۱۱۲ و ۱۵۸ در زنجیره پلی‌پپتیدی از نظر این دو اسیدآمینه با هم تفاوت دارند [۹،۸]. ایزوفرم‌های رایج ApoE تفاوت‌هایی در ساختار و عملکرد نشان داده، در چندین فرآیند پاتولوژیکی دخالت دارند [۱۰]. آلل e3 ایزوفرم غالب در تمام جمعیت‌های مطالعه‌شده است. آلل e4 با غلظت افزایش‌یافته کلسترول تام سرم و نیز احتمال بیشتر ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی همراه بوده [۱۱،۳] و همچنین عامل خطر عمده‌ای برای بیماری آلزایمر است [۱۲،۳]. به‌نظر می‌رسد که آلل e2 نقشی حفاظتی در برابر بیماری آلزایمر داشته، طول عمر را به‌همراه دارد [۱۳،۳]. سایر آپولیپوپروتئین‌ها مثل D، J و H هم نقش‌های بیولوژیکی قابل‌توجهی دارند. درواقع این

پروتئین‌ها نه‌تنها در متابولیسم لیپید بلکه در سایر عملکردهای مهم، مثل انتقال هورمون، فعالیت تجزیه پروتئین، تنظیم فاکتورهای انعقادی و مکانیسم‌های بازسازی دخالت دارند [۱۴]. به‌دنبال آن علاقه به آزمایش فردی بیماران و گروه‌های مورد مطالعه در مورد ایزوفرم‌های ApoE در حال افزایش است. ایزوفرم‌های ApoE اثرات مختلفی روی متابولیسم لیپوپروتئین‌های پلاسما دارند. آلل e2 با میزان کمتر LDL و خطر کمتر بیماری‌های قلبی - عروقی [۱۵] و آلل e4 با میزان بالاتر کلسترول تام، LDL و VLDL و خطر بیشتر بیماری‌های قلبی - عروقی همراه است [۱۶]. اختلال پاک‌سازی لیپیدی ایجادشده به‌وسیله آلل e4 را به تمایل بالاتر آن به گیرنده LDL (LDLR) در مقایسه با سایر آلل‌ها نسبت می‌دهند؛ به این‌ترتیب که گیرنده آن‌ها زودتر اشغال شده، در نتیجه تجمع ذرات LDL موجب مهار ساختن LDLR و پاک‌سازی کمتر ذرات لیپوپروتئینی خواهد شد [۱۷،۶]. همچنین ارتباط مستقیمی بین ایزوفرم‌های ApoE و آترواسکلروز نابالغ گزارش شده است [۱۸] و اخیراً گفته می‌شود که آلل e4 با پیشرفت هر دو بیماری دیابت نوع دو و بیماری قلبی - عروقی ارتباط دارد [۱۹،۱۵]. به‌نظر می‌رسد که آلل e4 در رابطه با ایجاد بیماری‌ها آللی پرخطر است؛ اما نقش e2 نیز در برخی موارد به‌طور مثال افزایش خطر آترواسکلروز در هایپرلیپوپروتئینمی نوع ۳ و مشکلات کلیوی در بیماران دیابتی نوع دو در سایر مطالعات دیده شده است. میزان کلسترول تام سرم و کلسترول LDL در افراد حامل آلل e2 و e4 بیشتر از افراد حامل آلل e3 است [۲۰،۶]. هدف این مطالعه تعیین پلی‌مورفیسم ژن ApoE در افراد دارای دیابت نوع دو و بیماری قلبی و گزارش فراوانی ژنوتیپ و آلل‌های مربوطه است. از بین روش‌های آنالیزی مختلف به‌کار گرفته‌شده برای تعیین پلی‌مورفیسم ApoE، در این‌جا یک فرآیند ساده که تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم ApoE را تسهیل می‌کند، معرفی شده است. در گذشته یکی از روش‌های ابتدایی تعیین فنوتیپ، ایزوالکتریک تمرکزی بوده که یک فرآیند بسیار پیچیده است و نیاز به تخصص قابل‌توجه دارد [۲۲،۲۱]. بنابراین پژوهشگران تلاش کردند تا بهترین راه را برای تعیین ژنوتیپ ApoE بیابند که ساده و دقیق و نیازمند به تخصص و تجهیزات کم بوده، در کل از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه باشد. برای آن‌ها این نکته اهمیت دارد که روش به تیمارهای بعدی یا هر فرآیند تحلیلی پیچیده‌ای نیاز نداشته باشد و پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (SNP) را به‌طور دقیق پوشش دهد. آن‌ها به یک PCR خوب برای تکثیر دو SNP و برای PCR هم به پرایمرهای خوب نیاز داشتند [۲۱]. آن‌ها در ابتدا روش PCR اختصاص‌یافته به آلل (AS-PCR) را استفاده کردند که دو SNP را به‌طور جداگانه تکثیر و با آنالیز الگوی باندهای آن‌ها روی ژل الکتروفورز ژنوتیپ را تعیین می‌کردند [۲۳]. اما در این روش به‌دلیل ایجاد تعداد زیادی قطعات کوچک و اختصاصی، تفسیر الگوها دشوار بود. بنابراین PCR بعدی براساس پلی‌مورفیسم قطعات محدود به طول (RFLP) بهینه شد که از آنزیم‌های محدودکننده و دو پرایمر اختصاصی برای تکثیر قطعات موردنظر استفاده می‌شود. در یک روش از دو آنزیم AfiIII و HaeII [۲۰] و در روشی دیگر تنها از آنزیم HhaI [۲۴] استفاده شده است. اما این روش‌ها نیز مشکلات گفته‌شده در قبل را داشت. یکی از بهترین روش‌ها، روش ARMS PCR بود که مقرون‌به‌صرفه، ساده و دقیق بوده، نیاز به ماده، تخصص، تجهیزات و تیمار بعدی کمتر دارد [۲۰]. ARMS PCR برای آشکارساختن ژنوتیپ ApoE در DNA انسانی استخراج‌شده از خون به‌طور موفقی به‌کار گرفته شد. پس از آن روش‌های دیگری مانند SSCP PCR [۲۵] و اسپکترومتری جرمی [۲۶] استفاده شد. یکی از روش‌های موفق تعیین ژنوتیپ، استفاده از PCR زمان حقیقی است که بسیار ساده و در زمان کم نتیجه‌بخش است؛ اما به‌دلیل هزینه بالای آن، استفاده از آن رایج نیست [۲۷]. یکی از روش‌های بهینه که بسیار نتیجه‌بخش بوده، روش اختصاصی با آلل (AS) ۵ پرایمری است. در این روش با بهینه کردن پرایمرها و شرایط PCR، تفسیر الگوهای الکتروفورز تسهیل یافته است. انواع روش‌ها به تعداد مختلف پرایمر نیاز دارند، اما در روشی که در این پژوهش استفاده شده، ۵ پرایمر نیاز است. با استفاده از ۴ پرایمر رفت الیگونوکلئوتیدی اختصاصی به آلل و یک پرایمر برگشتی مشترک می‌توان سه آلل رایج پلی‌مورفیسم ApoE را تعیین کرد. این سیستم، دو توالی ژن ApoE را تکثیر می‌کند که یکی به طول ۴۵۱ جفت باز و دیگری به طول ۵۸۸ جفت باز است (شکل شماره ۱) [۲۰]. این توالی‌ها زمانی تکثیر می‌شوند که DNA حاوی آللی خاص با پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی اختصاصی خودش در دمای مربوطه قرار گیرد. این روش ساده و قابل اعتماد بوده، نیازی به هضم با آنزیم‌های محدودکننده یا هیبریدشدن با پروب‌های الیگونوکلئوتیدی ندارد. تعیین ژنوتیپ با این روش مشکلات تغییرات پس‌ترجمه‌ای ApoE ایجادشده در روش ایزوالکتریک تمرکزی پروتئین بالغ پلاسمایی ApoE را ندارد [۲۵]. هرچند تمام روش‌های PCR نیز کارایی لازم را ندارند؛ به‌طور مثال ARMS و RFLP از SSCP دقیق‌تر هستند. اما روش‌های دقیق‌تر و آسان‌تر از روش استفاده‌شده در این پژوهش هم وجود دارند. به‌طور مثال در روش PCR زمان حقیقی تعیین ژنوتیپ سریع و آسان است؛ اما این روش مقرون‌به‌صرفه نیست [۲۰]. از روش‌های بسیار کارآمد و سریع استفاده از کیت‌های سریع است که به‌آسانی ژنوتیپ را مشخص می‌کند. اساس عملکرد این کیت مولکولی نیز روش اختصاصی به

آلل و تفاوت بین دو نوکلئوتید rs429358 و rs7412 است [۱۱،۲].

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

با بررسی کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، این پژوهش مجوز کتبی مبنی‌بر انجام نمونه‌گیری (سریال نامه: ۱/۱۲۱۹۵۲۷، شماره نامه: ۲۹/۵/۱/۵۲۱۱/ب)، به‌شرط رضایت بیماران به شرکت در این پژوهش دریافت کرد. با کسب رضایت آگاهانه از بیماران، ۲ میلی‌لیتر نمونه خون از بیماران دیابتی دارای بیماری‌های قلبی - عروقی گرفته شد. اطلاعات بیماران از مرکز دیابت در مرکز بهداشتی گلابچی در کاشان تهیه شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA به ۲ میلی‌لیتر نمونه خون نیاز است. ابتدا با افزودن محلول تجزیه گلبول قرمز، محلول به‌مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده می‌شود. قدم بعدی اضافه کردن محلول لیز هسته‌ای است که نوکلئیک‌اسیدها را دردسترس قرار می‌دهد. برای جداسازی پروتئین‌ها از آنزیم پروتئیناز k (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) استفاده و محلول در حمام آب به‌مدت دو ساعت قرار داده می‌شود. در مرحله بعد، پروتئین‌ها با استفاده از کلرید سدیم اشباع رسوب می‌کنند. سپس از ایزوپروپانول برای مشخص‌شدن کلاف DNA استفاده می‌شود. برای زدودن هرگونه آلودگی احتمالی با پروتئین، DNA با الکل شستشو داده می‌شود. درنهایت DNA در بافر TE حل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود [۲۸].

کنترل کیفیت و تعیین غلظت DNA

کیفیت DNA با تاباندن طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده و غلظت DNA با استفاده از قانون بیرلامبرت محاسبه می‌شود.

PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با روش اختصاصی آلل)

براساس روش یانگ و همکاران [۲۱]، برای تکثیر قطعه موردنظر شامل دو پلی‌مورفیسم، از ۵ پرایمر استفاده می‌شود. این ۵ پرایمر شامل دو پرایمر رفتی برای کدون ۱۱۲ (یکی برای سیستئین و یکی برای آرژنین)، دو پرایمر برگشتی برای کدون ۱۵۸ (یکی برای سیستئین و یکی برای آرژنین) و یک پرایمر برگشتی (مشترک برای هر دو کدون) هستند. دو قطعه DNA به‌طول ۴۵۱ و ۵۸۸ جفت باز به‌ترتیب به‌وسیله پرایمرهای ۱۵۸ و ۱۱۲ به‌همراه پرایمر برگشتی، تولید می‌شوند. توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ نشان داده شده‌اند. برای هر نمونه دو واکنش مجزا موردنیاز است: یک‌بار بین پرایمر رفت ۱۱۲ و پرایمر مشترک و بار دوم بین پرایمر رفت ۱۵۸ و پرایمر مشترک. سپس با تفسیر الگوی باندهای ایجادشده در ژل الکتروفورز، ژنوتیپ تعیین می‌شود. واکنش PCR در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۰/۴ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای سیستئین یا آرژنین، ۰/۸ میکرولیتر از پرایمر برگشتی، ۱/۶ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس امپلیکون (Ampliqon) بوده، با آب بدون نوکلئاز به حجم رسانده می‌شود. برنامه واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشتگی اوّلیه، ۳۵ مرحله تکثیر و یک مرحله گسترش نهایی است. واسرشتگی اوّلیه در دمای ۹۵ درجه و به‌مدت ۵ دقیقه انجام می‌گیرد. قدم بعدی خود شامل سه مرحله است: واسرشتگی در ۹۵ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۳ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه. قدم آخر یا گسترش نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام می‌گیرد. محصولات PCR به‌روی ژل آگارز ۳درصد به‌مدت ۳ ساعت با ولتاژ ۵۰ ولت الکتروفورز می‌گردند. برای تسهیل تفسیر باندهای الکتروفورز بهتر است در دو چاهک کنار هم، دو محصول PCR مربوط به یک نمونه بارگذاری شوند.

نتایج

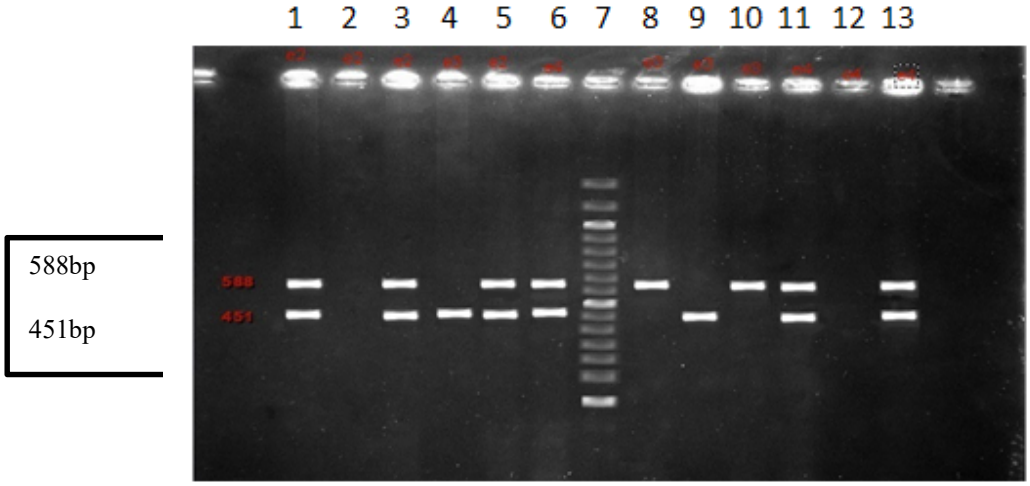
ژنوتیپ تمام ۱۰۷ نمونه از الگوی الکتروفورز آن‌ها در ژل تعیین می‌شود. شش ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت در شکل شماره ۱ نشان داده شده‌اند. برای هر نمونه، دو چاهک الکتروفورز اختصاص داده شد که در اوّلین چاهک قطعه DNA استخراج‌شده با پرایمرهای سیستئین و در دومین چاهک با پرایمرهای آرژنین تکثیر شدند. چاهک‌های ۱ و ۲، مربوط به یک نمونه DNA است و در هر دو جایگاه SNP یعنی ۱۱۲ (قطعه ۴۵۱ جفت باز) در جایگاه اوّل (آلل e2) و ۱۵۸ نیز (قطعه ۵۸۸ جفت باز) در جایگاه اوّل (آلل e2)، دارای سیستئین و فاقد آمینواسیدی در جایگاه دوم است، بنابراین ژنوتیپ این DNA، E2E2 است. چاهک‌های ۳ و ۴، مربوط به نمونه DNA بعدی است که سیستئین ۱۱۲ (قطعه ۴۵۱ جفت باز در جایگاه اوّل)، سیستئین ۱۵۸ (قطعه ۵۸۸ جفت باز در جایگاه اوّل) و یک آرژنین ۱۵۸ (قطعه ۵۸۸ جفت باز در جایگاه دوم) دارد، بنابراین ژنوتیپ این DNA، E2E3 است. چاهک‌های ۵ و ۶ نمونه بعدی است که در هر دو جایگاه هر دو آمینواسید را تکثیر کرده که ژنوتیپ E2E4 را نمایش می‌دهد (به این‌صورت که در جایگاه اوّل هر دو سیستئین برای آلل e2 و در جایگاه دوم هر دو آرژنین مربوط به آلل e4 است). چاهک هفتم خط‌کش مولکولی ۵۰ کیلوبازی برای ردیابی راحت‌تر قطعات است. چاهک ۸ و ۹،

مربوط به نمونه E3E3 بوده که در جایگاه اوّل دارای سیستئین (قطعه ۴۵۱ جفت بازی) و در جایگاه دوم دارای آرژنین (قطعه ۵۸۸ جفت بازی) است. چاهک ۱۰ و ۱۱ مربوط به نمونه E3E4 و چاهک ۱۲ و ۱۳ مربوط به ژنوتیپ E4E4 است که تنها اسیدآمینه آرژنین را در هر دو SNP داراست. در این پژوهش از ۱۰۷ بیمار مورد مطالعه از نظر سنی، ۵ نفر کمتر از ۴۵ سال (۷/۴ درصد)، ۳۷ نفر از ۴۵ تا ۶۰ سال (۳۴/۶ درصد) و ۶۵ نفر بیش از ۶۵ سال (۶۰/۷ درصد) بودند. این جمعیت متشکل از ۶۶ نفر زن (۶۱/۷ درصد) و ۴۱ نفر مرد (۳۸/۳ درصد) بود. پس از تعیین ژنوتیپ، فراوانی انواع ژنوتیپ و آللها مشخص می‌گردد که به‌ترتیب در جدول‌های شماره‌های ۲ و ۳ نمایش داده شده است. بیشترین فراوانی همانند اکثر جمعیت‌های مطالعه‌شده (به‌جز نژاد قفقازها) مربوط به ژنوتیپ E3E3 با درصد فراوانی ۶۵/۴ درصد بوده، کمترین درصد مربوط به ژنوتیپ E2E2 با فراوانی ۱/۹ درصد است. فراوانی‌های سایر ژنوتیپ‌های E2E3، E2E4، E3E4 و E4E4 به‌ترتیب برابر با ۳/۷، ۲/۸، ۲۳/۴ و ۲/۸ درصد است. از نظر نوع بیماری قلبی، از ۱۰۷ بیمار، ۴۰/۶ درصد از بیماران سابقه سکته قلبی داشته، ۳۰/۲ درصد مبتلا به آترواسکلروز بوده، ۲۹/۲ درصد دیگر نیز تحت درمان دارویی بیماری قلبی بودند.

جدول شماره ۱- پرایمرهای مربوط به واکنش PCR [۲۰]

Title	Sequence
F112-cysteine	5'- CGCGGACATGGAGGACGTTT-3'
F112-arginine	5'- CGCGGACATGGAGGACGTTC-3'
F158- cysteine	5'- ATGCCGATGACCTGCAGAATT-3'
F158- arginine	5'- ATGCCGATGACCTGCAGAATC-3'
Common reverse	5'- GTTCAGTGATTGTCGCTGGGCA-3'

شکل شماره ۱: ژنوتیپ ApoE در بیماران. نوار ۱ و ۲ مربوط به ژنوتیپ E2E2، نوار ۳ و ۴ مربوط به E2E3، نوار ۵ و ۶ مربوط به E2E4، نوار ۷ مربوط به خط‌کش ژنی ۵۰ جفت بازی، نوار ۸ و ۹ مربوط به E3E3، نوار ۱۰ و ۱۱ مربوط به E3E4 و نوار ۱۲ و ۱۳ نشان‌دهنده ژنوتیپ E4E4 است. برای هر ژنوتیپ، اوّلین نوار مربوط به محصولات PCR با پرایمرهای سیستئین با طول ۴۵۱ جفت باز و دومین نوار مربوط به محصولات PCR با پرایمرهای آرژنین با طول ۵۸۸ جفت باز است.



جدول شماره ۲- فراوانی انواع ژنوتیپ

ژنوتیپ	E2E2	E2E3	E2E4	E3E3	E3E4	E4E4
فراوانی (درصد)	(۱/۹)۲	(۳/۷)۴	(۲/۸)۳	(۶۵/۴)۷۰	(۲۳/۴)۲۵	(۲/۸)۳

جدول شماره ۳- فراوانی نسبی آللی ApoE

آلل	Allele e2	Allele e3	Allele e4
فراوانی نسبی (درصد)	۵/۱	۷۸/۹	۱۵/۸

بحث

بیماری‌های قلبی و دیابت، بیماری‌های پیچیده چندعاملی هستند که توسط عوامل ژنتیکی و محیطی متعدد تعیین شده، به‌میزان زیادی در مرگ‌ومیر در جهان نقش دارند. با تغییرات در سبک زندگی و افزایش طول عمر، شیوع این بیماری‌ها در همه جوامع به‌شدت در حال افزایش است. ApoE یک پروتئین ۳۴ کیلودالتون متشکل از ۲۹۹ آمینواسید بوده که مسؤول متابولیسم لیپید هستند و در انتقال تری‌گلیسیرید و متابولیسم کلسترول شرکت می‌کنند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که چگونه پلی‌مورفیسم‌های ApoE می‌توانند رونویسی ژن ApoE و کلسترول و TG را تحت‌تأثیر قرار داده [۲۹]، همچنین ممکن است دیس‌لیپیدمی یا دیس‌لیپوپروتئینمی به‌شدت در تشدید عوارض میکرو و ماکرو عروقی و آترواسکلروز تسریع‌شده مرتبط با آن در بیماران دیابتی نقش داشته باشد [۲]. در جمعیت‌های مختلف بسته به ژنتیک، منطقه جغرافیایی و عوامل متعدد

دیگر فراوانی نسبی آلل‌ها مختلف هستند و پژوهش‌های متعددی در جهان در مورد این مسأله انجام شده است. El-Lebedy و همکاران مشخص کردند که E3/E3 رایج‌ترین ژنوتیپ بوده، فراوانی قابل‌توجهی بالاتر از ژنوتیپ E3/E4 و آلل e4 در میان بیماران قلبی - عروقی مشاهده شد. افرادی که حامل ژنوتیپ E3/E4 بودند، ۳/۶ برابر بیشتر در معرض خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی بودند؛ درحالی‌که حاملین آلل e4 ۳/۲ برابر بیشتر در خطر بودند. در بیماران دیابتی، ژنوتیپ E3/E4 و آلل e4 خطر بیماری‌های قلبی - عروقی را به‌ترتیب ۴/۲ و ۲/۲۳ برابر افزایش دادند. تجزیه‌وتحلیل رگرسیون چندمتغیره ژنوتیپ E3/E4 را به‌عنوان یک عامل خطر مستقل برای بیماری‌های قلبی - عروقی شناسایی کرد، اما نه برای دیابت نوع دو، درحالی‌که آلل e4 یک عامل خطر مستقل برای دیابت نوع دو و بیماری‌های قلبی - عروقی بود و با ۵/۹ برابر خطر بیماری‌های قلبی - عروقی در بیماران دیابت نوع دو مرتبط بود [۲]. Wang و همکاران نشان دادند که ژنوتیپ‌های ApoE و فراوانی آللی به‌طور قابل‌توجهی در بین جمعیت‌های مختلف، فرق دارد. آلل e3 در همه جمعیت‌ها غالب است و تصور می‌شود که آلل e2 برای برخی از اثرات بیماری‌های قلبی اثر محافظتی دارد. فراوانی‌های مختلفی در سراسر اروپا در رابطه با آلل e4 شناسایی شده است که به‌تدریج از شمال به جنوب کاهش می‌یابد [۳۰]. به‌عنوان مثال فراوانی e4 از بیش از ۲۲ درصد در فنلاند و گرینلند تا کمتر از ۷ درصد در یونان و ایتالیا متغیر است. مطالعات اپیدمیولوژیک انجام‌شده در آسیا (ایران، هند، سنگاپور، ژاپن، چین و عربستان سعودی) نیز یافت شد که e3 شایع‌ترین زیرگروه (۸۷ درصد) است، درحالی‌که e2 و e4 در کشورهای آسیایی میزان شیوع پایینی دارند [۳۱]. همچنین مطالعه حاضر و همکاران گزارش کردند که ترتیب فراوانی آلل‌های ApoE در چین e3 بیشتر از e4 و e4 بیشتر از e2 است [۲۹]. پژوهش انجام‌شده در مکزیک در سال ۲۰۱۹ توسط Martínez-Magaña و همکاران نشان می‌دهد که فراوانی آلل‌های e3، e4 و e2 در این جمعیت به‌ترتیب برابر با ۸۸/۸۱، ۱۰/۶۷ و ۰/۵۳ درصد است. میزان HDL خون در افراد حامل آلل e2 (۴۱mg/dl)، به‌ترتیب از حاملین e3 (۳۸mg/dl) و e4 (۳۶mg/dl) بیشتر بوده است که نشان‌دهنده نقش مهمّ نوع آلل ApoE در پروفایل لیپیدی و به‌تبع آن میزان ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی است [۱۱]. در مطالعه انجام‌شده توسط افروزه و همکاران فراوانی آلل‌های e2، e3 و e4 در جمعیت بیماران قلبی - عروقی کشمیر به‌ترتیب برابر با ۶، ۷۲ و ۲۰ درصد است [۳۲]. همچنین مطالعه Seo همکاران در ۲۰۲۱ مبنی‌بر ارتباط ژنوتیپ ApoE با پروفایل لیپیدی و دیابت نوع دو، حاکی از ارتباطی محکم بین آلل e و دیابت در جمعیت کره جنوبی است [۳۳]. با توجه به اهمیت بالای این آلل در احتمال ابتلا به آلزایمر و تعیین‌کننده بودن آن در طول عمر [۳۴] و پژوهش‌های متعدد انجام‌شده در جمعیت‌های مختلف، امکان بررسی‌های فراتر نیز در جمعیت کاشان وجود دارد. آلزایمر که در سالمندان یک اختلال برگشت‌ناپذیر و پیش‌رونده است، افزون‌بر سایر بیماری‌های ناشی از سالخوردگی، آسیبی دوچندان بر ایشان وارد می‌کند. حاملین آلل e4 که احتمال بالایی در ابتلا به آلزایمر دارند [۳۵]، در صورت تعیین ژنوتیپ می‌توانند پیشگیری‌های لازم را انجام دهند و به آن‌ها کمک شایانی می‌کنند. روش‌های جدید تعیین ژنوتیپ مثل استفاده از بیومارکرها [۳۶]، زمینه‌های پژوهش‌های فراتری نیز پیشِ روی پژوهشگران قرار داده است.

نتیجه‌گیری

پس از تعیین ژنوتیپ‌ها و به‌دست‌آمدن فراوانی آن، مشخص شد که همانند اکثر جمعیت‌ها بیشترین فراوانی مربوط به E3E3 و پس از آن E3E4 است. اما در مورد کمترین فراوانی بین جمعیت‌ها تفاوت وجود دارد که در این جمعیت مربوط به ژنوتیپ E2E2 است. از نظر فراوانی نسبی آللی، فراوانی آلل‌های e2، e3 و e4 به‌ترتیب برابر با ۵/۱، ۷۹ و ۱۵/۹ درصد است. فراوانی قابل‌توجه آلل e4 (حدود ۱۶ درصد از جمعیت مورد مطالعه) که یک آلل پرخطر در رابطه با ابتلا به بیماری آلزایمر است، می‌تواند موضوع مهمّی برای بررسی‌های آتی باشد. بررسی‌های بیشتر بر روی جمعیت حاملین آلل e4 و اسکن‌های مغزی و آزمون‌های اختلال شناختی، همچنین مطالعات مولکولی مربوط به بیماری آلزایمر (مثل بررسی پروتئین‌هایی مانند تائو) می‌تواند به درک این موضوع کمک شایانی کند [۳۸،۳۷].

تشکر و قدردانی

از کارمندان کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کاشان که امکان جمع‌آوری نمونه و دسترسی به پرونده بیماران را فراهم نمودند، همچنین از دکتر حسین بوجاری که زحمت مشاوره آماری این پژوهش بر دوش ایشان بود و نیز از تمامی کارمندان و کارشناسان آزمایشگاه و واحد دیابت درمانگاه گلابچی به‌ویژه سرکار خانم لیلا خراسانی‌فر و خانم لیلا احمدی برای حمایت‌های بی‌دریغ ایشان سپاسگزاری می‌شود.

References:

[1] available at: https://diabetesatlas.org/ (accessed 27 May 2022)

[2] El-Lebedy D, Raslan HM, Mohammed AM. Apolipoprotein E gene polymorphism and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. ***Cardiovasc Diabetol*** 2016; 15(1): 1.

[3] Maratni NP, Saraswati MR, Dewi NN, Yasa IW, Eka Widyadharma IP, Putra IB, Suastika K. Association of Apolipoprotein E Gene Polymorphism with Lipid Profile and Ischemic Stroke Risk in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. ***J Nutr Metab*** 2021; 2021.

[4] Ferreira CN, Carvalho MG, Fernandes AP, Lima LM, Loures-Valle AA, Dantas J, et al. Comparative study of apolipoprotein-E polymorphism and plasma lipid levels in dyslipidemic and asymptomatic subjects, and their implication in cardio/cerebro-vascular disorders. ***Neurochem Int*** 2010; 56(1): 177-82.

[5] Grundy SM. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. ***Nat Rev Drug Discov*** 2006; 5(4): 295-309.

[6] Kockx M, Traini M, Kritharides L. Cell-specific production, secretion, and function of apolipoprotein E. ***J Mol Med*** 2018; 96(5): 361-71.

[7] Das H, McPherson J, Bruns G, Karathanasis S, Breslow J. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. ***J Biol Chem*** 1985; 260(10): 6240-7.

[8] Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, et al. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. ***Genomics*** 1988; 3(4): 373-9.

[9] Utermann G, Langenbeck U, Beisiegel U, Weber W. Genetics of the apolipoprotein E-system in man . ***Am J Hum Genet*** 1980; 32(3): 339.

[10] Mahley RW, Rall Jr SC. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. ***Annu Rev Genomics Hum Genet*** 2000; 1(1): 507-37.

[11] Martínez-Magaña JJ, Genis-Mendoza AD, Tovilla-Zarate CA, González-Castro TB, Juárez-Rojop IE, Hernández-Díaz Y, et al. Association between APOE polymorphisms and lipid profile in Mexican Amerindian population. ***Mol Genet Genomic Med*** 2019; 7(11): e958.

[12] Corder E, Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Small Ga, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. ***Science*** 1993; 261(5123): 921-3.

[13] Schächter F, Faure-Delanef L, Guénot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, et al. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. ***Nat Genet*** 1994; 6(1): 29-32.

[14] Siest G, Pillot T, Régis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, et al. Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. ***Clin Chem*** 1995; 41(8): 1068-86.

[15] Marais AD. Apolipoprotein E and atherosclerosis. ***Curr Atheroscler Rep*** 2021; 23(7): 1-1.

[16] Ceci FM, Ceccanti M, Petrella C, Vitali M, Messina MP, Chaldakov GN, et al. Alcohol drinking, apolipoprotein polymorphisms and the risk of cardiovascular diseases. ***Curr Neurovasc Res*** 2021; 18(1): 150-61.

[17] Mehta A, Shapiro MD. Apolipoproteins in vascular biology and atherosclerotic disease. ***Nat Rev Cardiol*** 2021;1-2.

[18] Horejsi B, Ceska R. Apolipoproteins and atherosclerosis. Apolipoprotein E and apolipoprotein (a) as candidate genes of premature development of atherosclerosis. ***Physiol Res*** 2000; 49: S63-S70.

[19] Chaudhary R, Likidlilid A, Peerapatdit T, Tresukosol D, Srisuma S, Ratanamaneechat S, et al. Apolipoprotein E gene polymorphism: effects on plasma lipids and risk of type 2 diabetes and coronary artery disease. ***Cardiovasc Diabetol*** 2012; 11(1): 36.

[20] You H, Chen J, Zhou J, Huang H, Pan J, Wang Z, et al. Amplification refractory mutation system polymerase chain reaction versus optimized polymerase chain reaction restriction-fragment length polymorphism for apolipoprotein E genotyping of majorly depressed patients. ***Mol Med Rep*** 2015; 12(5): 6829-34.

[21] Yang YG, Kim JY, Park SJ, Kim SW, Jeon OH, Kim DS. Apolipoprotein E genotyping by multiplex tetra-primer amplification refractory mutation system PCR in single reaction tube. ***J Biotechnol*** 2007; 131(2): 106-10.

[22] Cartier R, Sassolas A. Apolipoprotein E phenotyping by isoelectric focusing in immobilized pH gradients and silver staining. ***Electrophoresis*** 1992; 13(1): 252-7.

[23] Weisgraber KH, Newhouse YM, Mahley RW. Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes. ***Biochem Biophys Res Commun*** 1988; 157(3): 1212-7.

[24] Zivelin A, Rosenberg N, Peretz H, Amit Y, Kornbrot N, Seligsohn U. Improved method for genotyping apolipoprotein E polymorphisms by a PCR-based assay simultaneously utilizing two distinct restriction enzymes. ***Clin Chem*** 1997; 43(9): 1657-9.

[25] Tsai M, Suess P, Schwichtenberg K, Eckfeldt J, Yuan J, Tuchman M, et al. Determination of apolipoprotein E genotypes by single-strand conformational polymorphism. ***Clin Chem*** 1993; 39(10): 2121-4.

[26] Hirtz C, Vialaret J, Nouadje G, Schraen S, Benlian P, Mary S, et al. Development of new quantitative mass spectrometry and semi-automatic

isofocusing methods for the determination of Apolipoprotein E typing. ***Clin Chim Acta*** 2016; 454: 33-8.
[27] Aslanidis C, Schmitz G. High-speed apolipoprotein E genotyping and apolipoprotein B3500 mutation detection using real-time fluorescence PCR and melting curves. ***Clin Chem*** 1999; 45(7): 1094-7.
[28] Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. ***Nucleic Acids Res***1988; 16(3): 1215.
[29] Ma W, Ren X, Zhang L, Dong H, Lu X, Feng W. Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Coronary Artery Disease Risk Among Patients in Northwest China. ***Pharmacogenomics Pers Med*** 2021; 14: 1591.
[30] Wang C, Yan W, Wang H, Zhu J, Chen H. APOE polymorphism is associated with blood lipid and serum uric acid metabolism in hypertension or coronary heart disease in a Chinese population. ***Pharmacogenomics*** 2019; 20(14): 1021-31.
[31] Adler G, Adler MA, Urbańska A, Skonieczna-Żydecka K, Kiseljakovic E, Valjevac A, Parczewski M, Hadzovic-Dzuvo A. Bosnian study of APOE distribution (BOSAD): a comparison with other European populations. ***Ann Hum Biol*** 2017; 44(6): 568-73.
[32] Afroze D, Yousuf A, Tramboo NA, Shah ZA, Ahmad A. ApoE gene polymorphism and its relationship with coronary artery disease in ethnic Kashmiri population. ***Clin Experimental Med*** 2016; 16(4): 551-6.
[33] Seo JY, Youn BJ, Cheong HS, Shin HD. Association of APOE genotype with lipid profiles and type 2 diabetes mellitus in a Korean population. ***Genes Genomics*** 2021; 43(7): 725-35.
[34] Shinohara M, Suzuki K, Bu G, Sato N. Interaction Between APOE Genotype and Diabetes in Longevity. ***J Alzheimer's Dis*** 2021; 82(2): 719-26.
[35] Koutsodendris N, Nelson MR, Rao A, Huang Y. Apolipoprotein e and alzheimer's disease: Findings, hypotheses, and potential mechanisms. ***Annu Rev Pathol*** 2022; 17: 73-99.
[36] Palmqvist S, Stomrud E, Cullen N, Janelidze S, Manuilova E, Jethwa A, et al. An accurate fully automated panel of plasma biomarkers for Alzheimer's disease. ***Alzheimer's Dement*** 2022 Aug 11.
[37] Tao Q, Ang TF, Akhter-Khan SC, Itchapurapu IS, Killiany R, Zhang X, et al. Impact of C-Reactive Protein on Cognition and Alzheimer Disease Biomarkers in Homozygous APOE ε4 Carriers. ***Neurology*** 2021; 97(12): e1243-52.
[38] Nichols JB, Malek-Ahmadi M, Tariot PN, Serrano GE, Sue LI, Beach TG. Vascular Lesions, APOE ε4, and Tau Pathology in Alzheimer Disease. ***J Neuropathol Experimental Neurol*** 2021; 80(3): 240-6.