

بررسی دو پلی مورفیسم تاثیر گذار بر غلظت لیپوپروتئین با دانسیته بالا در بیماران قلبی عروقی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز - چند شکلی طول قطعه محدود (PCR-RFLP)

کیهان قطره سامانی*^۱، دکتر محمد نوری**، دکتر محمد رهبانی نوبر***، دکتر مرتضی هاشم زاده[†]، عفت فرخی[‡]، مسعود دارابی امین*

* دانشجوی PhD بیوشیمی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ** دانشیار گروه بیوشیمی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، *** استاد گروه بیوشیمی - مرکز تحقیقات کاربردی دارویی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز، † دانشیار گروه ژنتیک - مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ‡ کارشناس ارشد بیوشیمی - مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۲ تاریخ تایید: ۸۷/۵/۶

چکیده:

زمینه و هدف: ارتباط معکوس بین لیپوپروتئین های با دانسیته بالا (HDL-C) و بیماری عروق کرونر شناخته شده است. کلستریل استر ترانسفر پروتئین (CETP) و هپاتیک لیپاز (HL) پروتئین های کلیدی در متابولیسم HDL-C می باشند و کاهش فعالیت آنها باعث افزایش غلظت HDL-C می گردد. مطالعات نشان داده پلی مورفیسم 629C/A در پروموتر ژن CETP و پلی مورفیسم 514C/T در پروموتر ژن هپاتیک لیپاز (LIPC) با کاهش فعالیت و غلظت پروتئین های مربوطه همراه می باشد. هدف این مطالعه بررسی ارتباط این دو پلی مورفیسم با بیماری عروق کرونر با توجه به سطح HDL-C پلاسما می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی ۳۲۱ بیمار آنژیوگرافی شده و بر اساس نتایج آنژیوگرام در دو گروه تقسیم شدند (۱۳۵ نفر بدون گرفتگی عروق کرونر به عنوان گروه کنترل و ۱۸۶ نفر با حداقل یک رگ گرفتگی بالای ۵۰٪ در عروق کرونر). برای هر دو گروه اندازه گیری پروفایل لیپیدی به روش استاندارد انجام گردید و پلی مورفیسم های ذکر شده به روش چند شکلی طول قطعه محدود (PCR-RFLP) تعیین ژنوتیپ شدند.

یافته ها: فراوانی ژنوتیپ برای CETP در بیماران ۵۹/۱٪ (۱۱۰ نفر)، ۲۸/۵٪ (۵۳ نفر) و ۱۲/۴٪ (۲۳ نفر) و در کنترل ۴۵/۲٪ (۶۱ نفر)، ۴۱/۵٪ (۵۶ نفر) و ۱۳/۳٪ (۱۸ نفر) به ترتیب برای AA، CA و CC و فراوانی ژنوتیپ برای LIPC در بیماران ۶۱/۶٪ (۱۱۴ نفر)، ۳۳/۵٪ (۶۳ نفر) و ۴/۹٪ (۹ نفر) و در کنترل ۶۵/۹٪ (۸۹ نفر)، ۲۷/۴٪ (۳۷ نفر) و ۶/۷٪ (۹ نفر) به ترتیب برای CC، CT و TT می باشد. در گروه کنترل غلظت HDL-C در ژنوتیپ AA نسبت به CC و در ژنوتیپ TT نسبت به CC در پلی مورفیسم های مربوطه افزایش داشت (P<۰/۰۱)، اما فراوانی آلل A در تمام بیماران و T در گروه زنان بر خلاف انتظار بیشتر بود (P<۰/۰۱). افزایش نسبی در غلظت HDL-C (۱۰mg/dl) در افرادی که ژنوتیپ CETP-AA/LIPC-TT و CETP-CA/LIPC-TT داشتند نسبت به افرادی که CETP-CC/LIPC-CC داشتند دیده شد (P<۰/۰۰۱)، اما فراوانی بیماری قلبی در افراد با ژنوتیپ فوق تفاوتی نداشت.

نتیجه گیری: آلل A از 629C/A و T از 514C/T - علیرغم افزایش غلظت HDL-C، در بیماران با گرفتگی عروق کرونر، فراوانی بیشتری نسبت به افراد بدون گرفتگی عروق کرونر دارند. لذا بنظر می رسد کاهش فعالیت CETP و HL که منجر به افزایش HDL-C گردیده، نتوانسته اثر محافظتی بر عروق کرونر داشته باشد.

واژه های کلیدی: آنزیم محدود کننده، کلسترول استر ترانسفر پروتئین، بیماری عروق کرونر، لیپوپروتئین با دانسیته بالا، هپاتیک لیپاز.

مقدمه:

آترواسکلروزیس علت بسیاری از مرگ و میرها در جهان می باشد و در میان ریسک فاکتورهای شناخته شده، کاهش سطح لیپوپروتئین ها با دانسیته بالا (HDL-C) اهمیت بیشتری نسبت به بقیه تغییرات لیپیدی دارد (۱). انتقال معکوس کلسترول (RCT) مسیر دفع کلسترول انباشته شده از طریق کبد می باشد.

(LIPC) مسئول ۲۵ درصد تغییرات غلظت HDL-C پلاسما است (۷). LIPC روی کروموزوم شماره ۱۵ قرار دارد. اندازه آن ۳۵ کیلوباز بوده و دارای ۹ اگزون می باشد. جایگزینی T به جای C در نقطه ۵۱۴ قبل از شروع کدون ترجمه این ژن (514C/T-) باعث ۳۰ درصد کاهش فعالیت هپاتیک لیپاز در پلاسما می گردد که منجر به افزایش سطح HDL-C پلاسما و همچنین افزایش LDL-C با اندازه های بزرگ می گردد (۸).

HL و CETP هر دو در تغییر شکل زیر گروه های HDL-C نقش دارند و CETP با تعویض کلاسترول استر در HDL-C با تری گلیسریدها سوپسترای HL را افزایش داده و باعث فعال تر شدن HL می گردد (۹).

مطالعات متعددی در ارتباط با فعالیت هپاتیک لیپاز و تاثیر آن بر روی لیپوپروتئین های پلاسما انجام شده اما نتایج مطالعات در ارتباط با تاثیر تغییر ژنی 514C/T- در بروز آترواسکلروزیس ضد و نقیض می باشد (۱۰). هدف از انجام این مطالعه تعیین تقریبی شیوع این دو پلی مورفیسیم در جامعه مورد مطالعه و بررسی تاثیر همزمان آنها بر روی HDL پلاسما و همچنین ارتباط این دو پلی مورفیسیم با گرفتگی عروق کرونر می باشد.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی پس از موافقت کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ۳۲۱ نفر از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام رضا و شهید مدنی تبریز که علایم بیماری عروق کرونر را داشته و آنژیوگرافی شده بودند با داشتن سن زیر ۸۰ سال و عدم مصرف داروهای درمان کننده هایپرلیپیدمی وارد مطالعه شدند. افرادی که مورد جراحی قلب قرار گرفته یا آنژیوپلاستی گردیده اند همچنین افراد دیابتیک (داشتن قند خون بالای ۱۲۰ mg/dl)، بیماران با اختلالات کلیوی (کراتینین بالای ۲ mg/dl)، افراد با نارسایی کبد، هیپرتیروئیدیسیم و بیماران مبتلا به نئوپلازی از مطالعه حذف شدند.

این مسیر به تخلیه کلاسترول از عروق کمک کرده و با دفع کلاسترول مازاد از طریق صفرا باعث جلوگیری از آترواسکلروزیس می گردد (۲). مهمترین عوامل درگیر در مسیر انتقال معکوس کلاسترول، (HDL-C)، آپولیپوپروتئین A1 (Apo A1)، پروتئین انتقال دهنده کلاستریل استر (CETP)، هپاتیک لیپاز (HL) و پروتئین انتقال دهنده فسفولیپید (PLTP) می باشند.

CETP یک گلیکوپروتئین موجود در بدن بوده که در کبد سنتز می گردد و نقش آن تعویض کلاسترول استر (CE) با تری گلیسرید (TG) بین HDL-C و لیوپروتئین های دیگر می باشد که منجر به برداشت کلاسترول استر توسط کبد بواسطه این لیوپروتئین ها می گردد (۳).

مهار CETP یا تغییرات ژنتیکی که منجر به کاهش فعالیت این پروتئین گردد، همراه با افزایش HDL در خون بوده است. ژن این پروتئین بر روی کروموزوم ۱۶ قرار دارد و دارای ۱۶ اگزون می باشد. تغییرات این ژن بسیار زیاد بوده و پلی مورفیسیم های نقطه ای (SNP) فراوانی در آن دیده می شود که منجر به کاهش فعالیت یا تغییر غلظت پروتئین CETP در پلاسما می گردد (۴) از آن جمله می توان به پلی مورفیسیم 629C/A- اشاره کرد که با غلظت و فعالیت CETP در پلاسما در ارتباط می باشد (۵).

629C/A- یک جایجایی تک نوکلئوتیدی است که در ۶۲۹ باز قبل از شروع کدون ترجمه ژن CETP اتفاق می افتد. وجود آلل A در این ناحیه منجر به ۵۰ درصد کاهش رونویسی ژن CETP می گردد. مطالعات روی این پلی مورفیسیم زیاد نبوده و اطلاعات محدودی در باره فراوانی و تغییرات آن در جوامع مختلف وجود دارد (۶).

هپاتیک لیپاز توسط کبد سنتز و ترشح می گردد و نقش عمده ای در تنظیم لیپیدهای پلاسما دارد که شامل هیدرولیز تری گلیسریدها، تغییر شکل در ذرات لیوپروتئین های با دانسیته پایین (LDL-C) و کاتابولیسم HDL-C می باشد. تغییرات آلی در ژن هپاتیک لیپاز

514C/T- از ژن هپاتیک لیپاز بر روی DNA نمونه ها به روش PCR-RFLP با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ASTEC (PC 818-JAPAN) به ترتیب زیر تعیین شدند:

(۱) یک قطعه از DNA در ناحیه پروموتور ژن هپاتیک لیپاز شامل ۷۱۱ جفت باز به روش PCR توسط پرایمرهای F: 5'-GGATCACCTCTCAATGGGTC-3' و R: 5'-ACCTGGTTTCAGGCTTGTGTC-3' تکثیر گردید (۱۵). هر نمونه به مقدار ۲۵ میکرولیتر شامل: MgCl₂(5mM)، بافر PCR 1X، dNTP (0.2μM)، از پرایمرهای F و R هر کدام 0.2μM، آنزیم Taq DNA Polymerase (0.5 U) و DNA ژنومی در حدود ۱۰۰ نانوگرم تهیه گردید. شرایط دمایی ترموسایکلر پس از بهینه سازی شامل این موارد بود: مرحله واسرشت اولیه (Pre denaturation) ۹۶ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۶ سیکل شامل ۹۵ درجه (Denaturation) به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه (Annealing) به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه (Extension) به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت طولی سازی نهایی (Terminal extension) در ۷۲ درجه بمدت ۸ دقیقه.

به منظور انجام PCR- RFLP ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR تحت تاثیر ۵ واحد آنزیم محدود کننده Nla III (تهیه شده از Fermentase Canada) به مدت یک شب (Over night) در ۳۷°C قرار گرفت. پس از برش آنزیم، قطعاتی به طول ۵۰۶، ۴۴۰، ۲۰۵ و ۶۶ جفت باز حاصل گردید که در نهایت محصول هضم شده با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد (نسبت ۱:۲۹ بیس اکریل آمید / اکریل آمید) به مدت یک ساعت با ولتاژ ۲۰۰V الکتروفورز شده و ژل بدست آمده با نیترات نقره رنگ آمیزی گردید.

(۲) در ناحیه پروموتور ژن CETP قطعه ۱۲۷ جفت بازی توسط پرایمرهای:

F:5'AGAATTGAAATGCCACAGACATCC3' و R:5'CCTTGATATGCATAAAATAACTCTCG3' تکثیر گردید (۶). هر نمونه به مقدار ۲۵ میکرولیتر شامل: MgCl₂(4mM)، بافر 1X، dNTP mix (0.2mM)، از پرایمرهای F و R هر کدام 0.2μM آنزیم

بیماران بر اساس نتایج آنژیوگرافی به دو دسته شامل بیماران با آنژیوگرام طبیعی (گروه non CAD) به عنوان گروه کنترل و بیماران با گرفتگی بالای ۵۰ درصد عروق تقسیم گردیدند. بیمارانی که گرفتگی عروق زیر ۵۰ درصد داشته از مطالعه حذف شدند. بیماران بیش از ۵۰ درصد گرفتگی عروق به سه گروه IVD (گرفتگی یک رگ)، 2VD (گرفتگی دو رگ) و 3VD (گرفتگی سه رگ) تقسیم شدند. اطلاعات مربوط به فشار خون، مصرف سیگار، وزن و قد بیماران از طریق پرسشنامه های مربوطه جمع آوری گردید.

نمونه گیری و آزمایشات بیوشیمیایی:

از تمام افراد مورد مطالعه ۷ میلی لیتر خون ناشتا گرفته شد. ۲ میلی لیتر از خون جهت آزمایشات مولکولی به لوله مخصوص، حاوی EDTA و ۵ میلی لیتر خون جهت آزمایشات بیوشیمیایی به لوله شیشه ای منتقل گردید.

گلوکز، کلسترول تام و تری گلیسرید به روش آنزیمی، HDL-C و LDL-C به روش مستقیم ایمونیوشیمی، آپولیپوپروتئین A₁ (ApoA₁) و آپولیپوپروتئین B (Apo B) به روش ایمونوتوربیدومتری (Immunoturbidometric) تعیین مقدار گردیدند. همچنین کراتینین به روش ژافه، جهت حذف بیماران کلیوی از مطالعه انجام گردید. آزمایشات فوق با استفاده از کیت های شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالیز BT 3000 (فرانسه) انجام گردیدند. فاکتور آتروژنیک (Atherogenic index plasma=AIP) به عنوان یک عامل جهت مشخص کردن ریسک آترو اسکروزیس با استفاده از رابطه log (TG/HDL-C) محاسبه شد (۱۱-۱۳).

آزمایشات مولکولی:

DNA تمام نمونه ها پس از لیز شدن گلبول های سفید خون با بافر مناسب، به روش استاندارد فنل-کلروفرم استخراج گردید (۱۴) و سپس با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Unico 2100 USA) مقدار و کیفیت DNA تخمین زده شد.

پلی مورفیسم های 629C/A- از ژن CETP و

۱۰۰ در حدود DNA و Taq DNA polymerase (0.5 U) نانوگرم تهیه گردید.

شرایط دمایی ترموسایکلر پس از بهینه سازی شامل این موارد بود: مرحله واسرشت اولیه (Pre denaturation) ۹۶ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۶ سیکل شامل ۹۵ درجه (Denaturation) به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه (Annealing) به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه (Extension) به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طولی سازی نهایی (Terminal extension) در ۷۲ درجه بمدت ۶ دقیقه.

محصول بدست آمده توسط ۵ واحد (5 unit) آنزیم محدود کننده Ava I (تهیه شده از Fermentase Canada) به مدت یک شب (Over night) در ۳۷°C هضم گردید. پس از برش آنزیم، قطعاتی به طول ۱۰۰ و ۲۷ جفت باز حاصل گردید که بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد به مدت یک ساعت با ولتاژ ۲۰۰۷ الکتروفورز شده و ژل بدست آمده با نیترا نقره

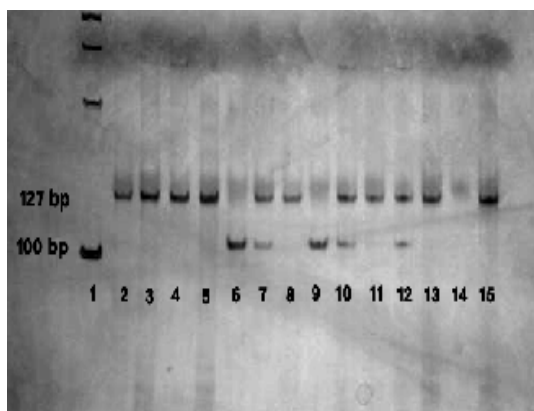
رنگ آمیزی گردید.

ژنوتیپ های تعیین شده با استفاده از آزمون آماری کای دو با هم مقایسه گردید. جهت مقایسه نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمی از آزمون آماری ANOVA و بدنبال آن تست Tukey استفاده گردید و جهت مقایسه دو گروه با هم آزمون t-test استفاده شد.

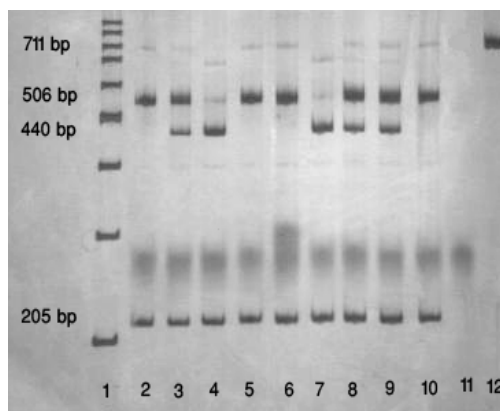
یافته ها:

محصولات PCR پس از انجام RFLP بر روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز گردیده و با نیترا نقره رنگ آمیزی شدند. پس از برش در ژن HL قطعاتی به طول ۵۰۶، ۴۴۰، ۲۰۵ و ۶۶ جفت باز و در ژن CETP قطعاتی به طول ۱۰۰ و ۲۷ جفت باز حاصل گردید (تصویر شماره ۱).

(ب)



(الف)



تصویر شماره ۱: محصولات PCR-RFLP پلی مورفیسم های *514C/T* و *629C/A* بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد. **الف:** مربوط به پلی مورفیسم *514C/T* - ردیف ۱ به مارکر DNA، ردیف های ۲، ۵، ۶، ۱۰ ژنوتیپ *CC* ردیف های ۳، ۸، ۹ ژنوتیپ *CT* و ردیف های ۴ و ۷ نشان دهنده ژنوتیپ *TT*، ۱۱ کنترل منفی (بدون DNA) و ۱۲ کنترل DNA (بدون آنزیم) می باشند. **ب:** مربوط به پلی مورفیسم *629C/A* - ردیف ۱ مارکر DNA، ردیف های ۲ تا ۱۱، ۵، ۱۳ ژنوتیپ *AA* ردیف های ۷، ۱۰ و ۱۲ ژنوتیپ *CA* و ردیف های ۶ و ۹ نشان دهنده ژنوتیپ *CC*، ۱۴ کنترل منفی (بدون DNA) و ۱۵ کنترل DNA (بدون آنزیم) می باشند.

جدول شماره ۱: مقایسه ویژگی های دو گروه تحت مطالعه

متغیر	گروه کنترل (۱۳۵ نفر)	گروه بیمار (۱۸۶ نفر)
سن (سال)	۵۲/۸±۱۱/۱	۵۴/۶±۹/۷
نمای توده بدنی BMI (kg/m ²)	۲۶/۹±۴/۰	۲۷/۱±۴/۱
غیر سیگاری / سیگاری *	۳۴/۱۰۱	۸۲/۱۰۴
فشار خون (بلی/خیر) *	۳۳/۱۰۲	۶۴/۱۲۲
کلسترول I	۱۷۲±۴۲/۰	۱۷۷±۴۶/۷
تری گلیسرید I	۱۸۵±۱۱۸/۴	۱۹۱±۱۰۱/۸
لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL-C) I	۳۸/۹±۱۱/۴	۳۶/۷±۹/۹
لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL-C) I	۹۶/۷±۳۵/۵	۱۰۱/۶±۴۱/۲
آپولیپوپروتئین A (ApoA) I	۱۲۵/۹±۲۱/۴	۱۲۰/۵±۱۹/۵
آپولیپوپروتئین B (ApoB) I	۱۰۲/۷±۲۶/۳	۱۰۴/۳±۳۰/۰
فاکتور آتروژنیک [(log(TG/HDL)]	۰/۶۳±۰/۲۹	۰/۶۸±۰/۲۷

* $P < 0.05$ و در سایر متغیرها بین دو گروه $P > 0.05$ - به جز متغیر فشارخون و سیگاری بودن سایر متغیرها بر اساس "انحراف معیار میانگین" می باشد. 1: غلظت ها بر اساس میلی گرم بر دسی لیتر (mg/dl) می باشد.

کنترل به ترتیب ۰/۲۱۴ و ۰/۲۴۱ بود ($P > 0.05$). اما در زنان فراوانی آلل T در بیماران با گرفتگی عروق کرونر بیشتر از گروه کنترل بوده است ($P < 0.01$) (جدول شماره ۳).

همچنین فراوانی آلل A از پلی مورفیسم 629C/A- در ژن CETP نشان می دهد این فراوانی در مردان در دو گروه بیمار و کنترل به ترتیب ۰/۶۹۹ و ۰/۶۶۰ ($P < 0.05$) و در زنان ۰/۸۰۲ و ۰/۶۵۸ بوده است ($P < 0.01$) (جدول شماره ۳).

وقتی دو گروه تحت مطالعه بر اساس ژنوتیپ تقسیم بندی شده و پروفایل لیپیدی در آنها بررسی گردید، در ژنوتیپ های پلی مورفیسم 514C/T- در کل افراد مورد مطالعه تنها در میزان HDL-C اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < 0.01$) اما وقتی مقایسه در داخل هر گروه بر اساس ژنوتیپ انجام شد در گروه کنترل (nonCAD) اختلاف معنی دار در تری گلیسرید ($P < 0.05$)، HDL ($P < 0.01$) و در عامل آتروژنیک ($P < 0.01$) مشاهده گردید که در گروه بیمار (CAD)

در این مطالعه ۳۲۱ نفر در دو گروه غیر بیمار (۱۳۵ نفر) با میانگین سنی ۵۲/۸±۱۱/۱ و گروه بیمار (۱۸۶ نفر) با میانگین سنی ۵۴/۶±۹/۷ با هم مقایسه شده است. دو گروه به جز در میانگین فشار خون و نسبت افراد سیگاری، در سایر متغیرها اختلاف معنی داری نداشتند (جدول شماره ۱).

گروه بیمار بر اساس تعداد عروق درگیر دارای گرفتگی بیش از ۵۰ درصد به سه گروه 1VD، 2VD و 3VD تقسیم شدند. فراوانی پلی مورفیسم های مورد مطالعه به همراه تعداد عروق درگیر و ژنوتیپ دو پلی مورفیسم نشان می دهد فراوانی آلل T از پلی مورفیسم 514C/T- در گروه کنترل ۰/۲۰۴ و در گروه بیمار ۰/۲۱۶ بود ($P > 0.05$). فراوانی آلل A در پلی مورفیسم 629C/A- در گروه کنترل ۰/۶۵۸ می باشد که وقتی با میانگین فراوانی گروه بیمار (۰/۷۳۲) مقایسه شود اختلاف در فراوانی آلل A در بین دو گروه دیده می شود ($P < 0.01$) (جدول شماره ۲).

فراوانی آلل T در مردان در دو گروه بیمار و

جدول شماره ۲: فراوانی آلل ها بر حسب ژنوتیپ و تعداد عروق درگیر در دو گروه تحت مطالعه

ژنوتیپ	گروه	گروه کنترل		گروه بیمار			جمع				
		تعداد	درصد	1VD	2VD	3VD					
-514C/T	CC	۸۹	۶۵/۵	۳۶	۵۷/۱	۳۸	۶۲/۳	۴۰	۶۴/۵	۱۱۴	۶۱/۳
	CT	۳۷	۲۷/۴	۲۵	۳۹/۷	۲۱	۳۴/۴	۱۷	۲۷/۴	۶۳	۳۳/۹
	TT	۹	۶/۷	۲	۳/۲	۲	۳/۳	۵	۸/۱	۹	۶/۷
	جمع	۱۳۵	۱۰۰	۶۳	۱۰۰	۶۱	۱۰۰	۶۲	۱۰۰	۱۸۶	۱۰۰
	آلل T		۰/۲۰۴	۰/۲۳۰	۰/۲۰۵	۰/۲۱۸	۰/۲۱۷				
-629C/A	AA	۶۱	۴۵/۲	۳۶	۵۷/۲	۳۷	۶۰/۷	۳۷	۵۹/۷	۱۱۰	۵۹/۱
	CA	۵۶	۴۱/۵	۲۰	۳۱/۷	۱۷	۲۷/۹	۱۶	۲۵/۸	۵۳	۲۸/۵
	CC	۱۸	۱۳/۳	۷	۱۱/۱	۷	۱۱/۴	۹	۱۴/۵	۲۳	۱۲/۴
	جمع	۱۳۵	۱۰۰	۶۳	۱۰۰	۶۱	۱۰۰	۶۲	۱۰۰	۱۸۶	۱۰۰
	آلل A		۰/۶۵۸	۰/۷۳۰	۰/۷۴۶	۰/۷۲۶	۰/۷۳۲				

گروه کنترل: افرادی که در آنژیوگرافی انجام شده گرفتگی عروق نداشتند. گروه بیمار: افرادی که در آنژیوگرافی انجام شده حداقل یک رگ گرفتگی بیش از ۵۰٪ داشتند. IVD = بیماران با گرفتگی یک رگ. 2VD = بیماران با گرفتگی دو رگ. 3VD = بیماران با گرفتگی سه رگ. - P < ۰/۰۱ / اختلاف فراوانی آلل A در پلی مورفیسم -629C/A بین دو گروه. - P > ۰/۰۵ / اختلاف فراوانی T در پلی مورفیسم -514C/T

دیده نشد (P > ۰/۰۵). مقایسه سه ژنوتیپ -629C/A از ژن CETP در کل افراد تحت مطالعه نشان می دهد که تنها HDL-C (P < ۰/۰۱) و عامل آتروژنیک (P < ۰/۰۵) دارای اختلاف می باشند. وقتی مقایسه در داخل هر گروه بر اساس ژنوتیپ انجام شد، در افراد کنترل (nonCAD) تفاوت تنها در HDL-C (P < ۰/۰۱) وجود داشت که در گروه بیمار (CAD) دیده نشد (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۳: فراوانی آلل ها بر حسب جنس در دو گروه تحت مطالعه

ژنوتیپ	گروه	گروه کنترل		گروه بیمار		جمع
		1VD	2VD	3VD	جمع	
-514C/T	مرد	۰/۲۴۱	۰/۲۱۷	۰/۲۰۰	۰/۲۲۵	۰/۲۱۴
	زن*	۰/۱۴۳	۰/۲۴۹	۰/۲۵۳	۰/۲۷۷	۰/۲۶۷
-629C/A	مرد**	۰/۶۶۰	۰/۶۹۲	۰/۷۴۰	۰/۷۲۵	۰/۶۹۹
	زن*	۰/۶۵۸	۰/۸۷۵	۰/۷۷۲	۰/۷۲۷	۰/۸۰۲

گروه کنترل: افرادی که در آنژیوگرافی انجام شده گرفتگی عروق نداشتند. گروه بیمار: افرادی که در آنژیوگرافی انجام شده حداقل یک رگ گرفتگی بیش از ۵۰٪ داشتند. IVD = بیماران با گرفتگی یک رگ. 2VD = بیماران با گرفتگی دو رگ. 3VD = بیماران با گرفتگی سه رگ. - داده ها بر اساس درصد می باشد. * P < ۰/۰۱ بین دو گروه کنترل و بیمار. ** P < ۰/۰۵ بین دو گروه کنترل و بیمار.

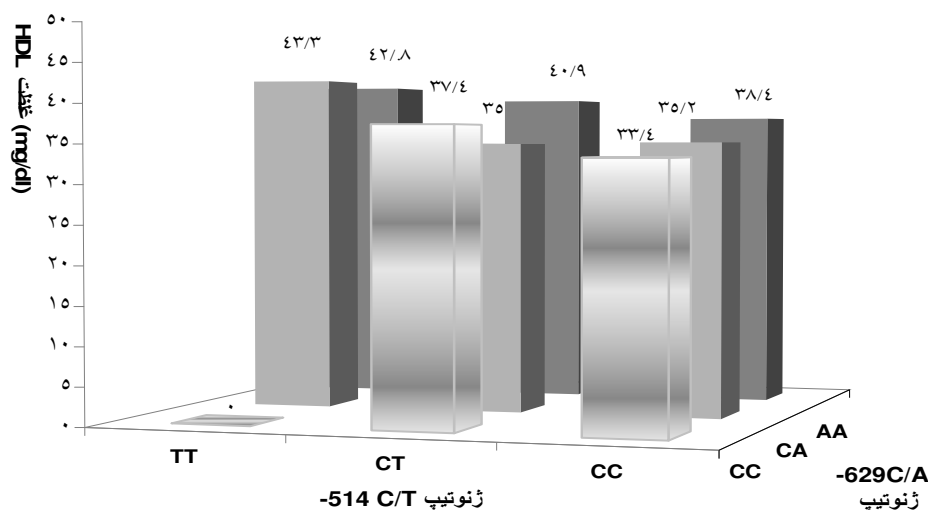
جدول شماره ۴: تاثیر ژنوتیپ های مختلف بر روی لیپیدها و لیپوپروتئین ها در دو گروه تحت بررسی

گروه با گرفتگی عروق کرونر			گروه بدون گرفتگی عروق کرونر			متغیر
TT	CT	CC	TT	CT	CC	LIPC(-514C/T)
۵۹/۷±۷/۴	۵۵/۸±۱۰/۷	۵۵/۷±۹/۶	۵۳±۹/۹	۵۲/۸±۸/۸	۵۲/۴±۱۱/۲	سن (سال)
۲۶/۵±۲/۹	۲۷/۱±۴/۱	۲۶/۹±۳/۷	۲۵/۳±۴/۴	۲۶/۸±۵/۳	۲۶/۷±۴/۳	نمای توده بدنی BMI (kg/m ²)
۱۸۸±۴۰/۲	۱۷۹±۵۵/۷	۱۷۴±۴۱/۵	۱۵۷±۲۷/۸	۱۷۳±۴۳/۴	۱۷۳±۴۲/۱	کلسترول
۱۶۹±۷۲/۳	۱۹۲±۱۱۲/۹	۱۹۳±۹۸/۵	۱۲۴±۳۱/۹	۱۶۱±۸۰/۴	۱۹۲±۹۳/۸	تری گلیسرید *
۳۹/۱±۱۰/۶	۳۷/۱±۱۱	۳۶/۱±۸/۸	۴۸/۶±۱۰/۷	۴۰/۲±۱۳/۷	۳۶/۹±۹/۵	لیپوپروتئین با دانسیته بالا HDL-C ¹ **
۱۱۵/۷±۳۶/۱	۱۰۴/۳±۴۶/۸	۹۹/۲±۳۸/۶	۸۳/۹±۲۰/۷	۹۶/۱±۳۶/۱	۹۷/۸±۳۴/۵	لیپوپروتئین با دانسیته پایین LDL-C
۱۱۲/۸±۱۲/۷	۱۲۰/۹±۲۰/۲	۱۲۱/۷±۱۹/۲	۱۳۴±۲۱/۴	۱۲۶/۵±۲۴/۲	۱۲۳/۸±۱۹/۳	آپولیپوپروتئین ApoA1 ¹
۱۰۰/۹±۱۹/۲	۱۰۷/۵±۳۴/۴	۱۰۳/۴±۲۵/۹	۹۰/۴±۲۹/۷	۹۹/۱±۲۹/۴	۱۰۵/۱±۲۵/۷	آپولیپوپروتئین ApoB B
۰/۶۱±۰/۲۶	۰/۶۷±۰/۲۹	۰/۷۰±۰/۲۶	۰/۴۰±۰/۲۹	۰/۵۷±۰/۲۷	۰/۶۸±۰/۲۹	فاکتور آتروژنیک (log(TG/HDL)) ² **
CC	CA	AA	CC	CA	AA	CETP(-629C/A)
۵۷/۰±۹/۶	۵۵/۸±۹/۵	۵۵/۸±۹/۹	۵۳/۷±۱۰/۷	۵۲/۲±۱۰/۳	۵۲/۴±۱۲/۶	سن (سال)
۲۶/۸±۳/۵	۲۷/۰±۳/۷	۲۷/۱±۴/۵	۲۷/۸±۴/۴	۲۷/۲±۳/۷	۲۶/۴±۴/۱	نمای توده بدنی BMI (kg/m ²)
۱۸۰±۴۵/۵	۱۷۳±۴۲/۳	۱۷۸±۴۹/۰	۱۷۶±۲۹/۳	۱۷۰±۵۰/۱	۱۷۰±۳۵/۷	کلسترول
۱۹۵±۶۱/۱	۱۹۴±۹۶/۶	۱۸۸±۱۱۱/۳	۲۲۳±۱۳۳/۷	۱۸۲±۹۰/۴	۱۶۴±۶۸/۴	تری گلیسرید
۳۴/۹±۱۱/۰	۳۴/۸±۸/۶	۳۸/۱±۹/۹	۳۵/۱±۸/۷	۳۶/۶±۱۰/۴	۴۱/۹±۱۲/۴	لیپوپروتئین با دانسیته بالا HDL-C ¹ **
۱۰۵/۸±۳۹/۹	۹۹/۵±۳۶/۳	۱۰۱/۸±۴۳/۹	۹۶/۵±۲۷/۰	۹۷/۲±۴۰	۹۵/۷±۳۰/۶	لیپوپروتئین با دانسیته پایین LDL-C
۱۲۳/۸±۲۳/۵	۱۱۴/۸±۱۷/۴	۱۲۲/۷±۱۹/۳	۱۲۶/۴±۱۶/۷	۱۲۱/۱±۱۸/۲	۱۲۹/۹±۲۴/۸	آپولیپوپروتئین ApoA1 ^{***}
۱۰۳/۷±۲۶/۹	۱۰۶/۶±۳۴/۸	۱۰۳/۴±۲۸/۲	۱۱۰/۵±۲۲/۴	۱۰۳/۹±۲۹/۲	۹۹/۸±۲۴/۱	آپولیپوپروتئین (ApoB) B
۰/۷۴±۰/۲۳	۰/۷۱±۰/۲۷	۰/۶۶±۰/۲۸	۰/۷۰±۰/۳۲	۰/۶۵±۰/۲۷	۰/۵۷±۰/۲۸	فاکتور آتروژنیک (log(TG/HDL)) ²

داده ها به صورت "انحراف معیار تخمیانگین" می باشد. $P < ۰/۰۵$ * $P < ۰/۰۱$ ** بین متغیرهای مورد بررسی در گروه بدون گرفتگی عروق کرونر. $P < ۰/۰۵$ *** بین متغیر مورد بررسی در گروه با گرفتگی عروق کرونر. - بین همه متغیرهای مورد بررسی اختلاف آماری معنی داری مشاهده نگردید. $P < ۰/۰۱$:1 در کل افراد مورد مطالعه. $P < ۰/۰۵$:2 در کل افراد مورد مطالعه. - به جز متغیرهای سن، نمای توده بدنی و فاکتور آتروژنیک غلظت ها بر حسب میلی گرم بر دسی لیتر (mg/dl) می باشد.

نتایج حاصل از بررسی نشان داد در افراد با ژنوتیپ CETP-CA/LIPC-TT و CETP-AA/LIPC-TT نسبت به افراد با ژنوتیپ CETP-CC/LIPC-CC سطح HDL-C حدود ۱۰ mg/dl افزایش داشته است (نمودار شماره ۱).

در تاثیر همزمان ژنوتیپ های مختلف در هر دو پلی مورفیسم، بر متغیرهای مورد مطالعه فقط HDL-C در بین گروهها تفاوت داشته است ($P < ۰/۰۰۱$) و اختلاف در متغیرهای دیگر دیده نشد.



نمودار شماره ۱: تاثیر توام ژنوتیپ های بررسی شده بر سطح لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL-C)

بحث:

است. در این مطالعه ارتباط دو پلی مورفیسم از دو ژن متفاوت که تاثیر عمده بر روی سطح HDL-C پلاسما دارند و در تاثیر بر HDL-C مشترک هستند در بیماران قلبی و عروقی بررسی گردیده تا تاثیر تغییرات در ژن این دو پروتئین بر سطح HDL-C و همچنین فراوانی بیماری قلبی عروقی در ژنوتیپ های مختلف جداگانه یا توام بررسی شود.

جایگزینی آلل T در نقطه ۵۱۴- ژن هپاتیک لیپاز (rs 1800588) و آلل A به جای C در ۶۲۹- ژن CETP (rs1800775) منجر به کاهش فعالیت این دو ژن و در نتیجه کاهش سطح پلاسمایی این دو پروتئین و بدنبال آن افزایش سطح HDL-C پلاسما می گردد (۲۵).

بررسی حاضر نشان داده است که فراوانی آلل T در ۵۱۴C/T- از ژن LIPC در گروه کنترل (۱۳۵ نفر) و بیماران با گرفتگی عروق (۱۸۶ نفر) به ترتیب ۰/۲۰۴ و ۰/۲۱۶ بوده است که با فراوانی این آلل در سفیدپوستان تطابق دارد (۲۴،۲۶).

فراوانی آلل T در زنان و مردان کنترل به ترتیب

بیماری های قلبی عروقی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در جمعیت های مختلف بویژه در جوامع صنعتی می باشد (۱۶). در کشور ما بیماری قلبی عروقی در بیشتر مناطق بویژه شهرهای بزرگ سهم عمده ای از علل مرگ و میر را به خود اختصاص می دهد. بنابراین مطالعه بر روی عوامل محیطی و ژنتیکی تاثیر گذار بر روی بیماری قلبی و عروقی به کاهش بروز این بیماری و افزایش سطح سلامت جامعه کمک می نماید.

لیپوپروتئین های پلاسما به ویژه LDL-C و HDL-C در بیماری قلبی و عروقی همواره یک نقش تعیین کننده داشته اند (۱۹-۱۷). کاهش سطح HDL-C با افزایش بیماری قلبی عروقی همراه بوده است و غلظت HDL-C در پلاسما تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی و ژنتیکی تغییر می کند. از عوامل ژنتیکی موثر بر سطح HDL-C پلاسما تغییر فعالیت هپاتیک لیپاز و CETP بوده است (۲۰).

در کشور ما تعداد معدودی مطالعه بر روی ژن CETP (۲۴-۲۱) و ژن هپاتیک لیپاز (۲۴) انجام شده

آترواسکلروزیس باعث گردیده آلل T در بیماران نتوانسته عامل آتروژنیک را تحت تاثیر قرار دهد. فراوانی آلل A از پلی مورفیسم 629C/A- در گروه سالم ۰/۶۵۸ بوده که از فراوانی گزارش شده در آسیا بیشتر می باشد (۶). از طرفی بین فراوانی آلل A در گروه سالم و بیمار اختلاف وجود دارد که این تفاوت هم در زنان و هم در مردان دیده می شود. سطح HDL-C در افراد با ژنوتیپ AA و CA در گروه کنترل نسبت به CC افزایش مقدار داشته است. این مطلب در مطالعات بسیاری با تکیه بر کاهش فعالیت CETP ناشی از وجود آلل A گزارش گردیده است (۳۳-۳۱). در بیماران، سطح غلظت HDL-C در سه ژنوتیپ تغییرات چندانی نشان نداده است. ولی Apo A1 در ژنوتیپ AA کاهش دارد. این نتایج نشان می دهد افزایش در HDL-C مربوط به قسمت لیپیدی این لیپوپروتئین بوده و نتوانسته قدرت محافظتی HDL-C را برای عروق افزایش دهد. کاهش نیافتن CAD علیرغم افزایش HDL-C ممکن است به این علت باشد که زیر واحدهای HDL-C اثرات محافظتی مختلفی دارند (۳۴،۳۵). نبودن اختلاف در عامل آتروژنیک در گروه بیمار و کنترل در هر سه ژنوتیپ به نقش فیزیولوژیک CETP مربوط می گردد که کمتر بر تری گلیسرید پلاسما موثر می باشد. در هر دو پلی مورفیسم در زنان رابطه بین تعداد عروق در گیر و فراوانی آلل ها مشاهده گردید. با افزایش تعداد عروق در گیر فراوانی آلل T افزایش و آلل A کاهش می یافت. با مطالعه اثر مشترک هر دو تغییر ژنی مشاهده شد افراد با ژنوتیپ CETP-CC/LIPC-CC نسبت به CETP-AA/LIPC-TT و CETP-CA/LIPC-TT غلظت HDL-C کمتری دارند. نسبت ژنوتیپ های CETP-AA/LIPC-TT و CETP-CA/LIPC-TT به CETP-CC/LIPC-CC در دو گروه کنترل و بیمار تفاوتی نشان نداد پس وجود هر دو آلل T و A در افراد با افزایش قابل توجهی در غلظت HDL-C بوده ولی باعث کاهش CAD نشده است. یکی از محدودیت های این مطالعه استفاده از تنگی

۰/۱۴۳ و ۰/۲۴۱ می باشد. نکته مشخص در مطالعه حاضر، تفاوت در فراوانی آلل T در زنان بیمار و کنترل است (۰/۲۶۷ و ۰/۱۴۳). این در حالی است که تفاوت در مردان دیده نمی شود. مطالعات انجام شده قبلی بر روی CETP و HL تفاوت ژنتیکی مرد و زن را نشان داده است. بنظر می رسد فعالیت و غلظت این دو پروتئین تحت تاثیر هورمون های جنسی تغییر می نماید (۲۷). وجود آلل T با کاهش فعالیت هپاتیک لیپاز همراه است (۸) ولی تاخیر در شروع CAD به دنبال افزایش فعالیت هپاتیک لیپاز در بیماران با کلسترول بالا در مطالعات قبلی نشان داده شده است و ثابت شده غلظت تری گلیسرید نیز بر فعالیت هپاتیک لیپاز موثر است (۲۸). مهار HL در اثر آلل T باعث افزایش آتروم در عروق می گردد (۲۹). فراوان تر بودن این آلل در زنان بیمار نسبت به سالم کاهش فعالیت هپاتیک لیپاز باعث افزایش CAD در زنان بوده است. غلظت HDL-C پلاسما در گروه کنترل در سه ژنوتیپ CC، CT و TT متفاوت بود. ولی در گروه بیمار تفاوت در غلظت کمی HDL-C در افراد TT نسبت به CC دیده نشد. سطح HDL-C تحت تاثیر عوامل مختلف از جمله ورزش، تغذیه و مصرف سیگار و همچنین عوامل ژنتیکی قرار می گیرد. در گروه بیمار با وجود فراوان تر بودن آلل T سطح HDL-C در ژنوتیپ TT نسبت به ژنوتیپ CC افزایش نداشته و تحت تاثیر شرایط محیطی یا دیگر عوامل ژنتیکی قرار گرفته است. به عبارت دیگر در این مطالعه نشان داده شده که تنها وجود آلل T نمی تواند تعیین کننده سطح HDL-C در پلاسما باشد. این در حالی است که در اکثر مطالعات گزارش شده وجود آلل T (ژنوتیپ TT و CT) با افزایش غلظت HDL-C پلاسما همراه بوده (۳۰،۳۱) و وجود این آلل با کاهش ریسک آترواسکلروزیس گزارش گردیده است (۲۶). وجود آلل T سطح HDL-C پلاسما را در گروه کنترل افزایش و تری گلیسرید را کاهش داده است در نتیجه فاکتور آتروژنیک در ژنوتیپ های TT و CT نسبت به ژنوتیپ CC کاهش داشته است که در گروه بیمار دیده نمی شود. به نظر می رسد چند علتی بودن

است و آلل T تنها در زنان بیمار بالاتر بوده و در گروه کنترل HDL-C را بالا برده است. علیرغم افزایش HDL-C در ژنوتیپ های مختلف هر دو آلل، کاهش CAD دیده نشد. با بررسی دو آلل به نظر می رسد افزایش HDL-C در حالی که فعالیت HL و CETP کاهش یافته نمی تواند اثر محافظتی بر عروق کرونر داشته باشد. لذا بنظر می رسد با توجه به نتیجه این مطالعه، مهار CETP و یا هپاتیک لیپاز توسط دارو که امروزه بسیار تحت بررسی است (۳۷،۳۶) نیاز به بازبینی مجدد دارد زیرا مهار صورت گرفته توسط پلی مورفیسیم های ذکر شده تاثیر مثبتی بر بیماری قلبی عروقی نداشته و حتی نتیجه در بعضی موارد خلاف انتظار بوده است.

تشکر و قدردانی:

از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که هزینه طرح را تقبل نموده اند و همچنین از کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

عروق به عنوان معیار آترواسکلروزیس در آنژیوگرافی بوده است این در حالی است که بعضی مواقع افراد با آنژیوگرام طبیعی با استفاده از امواج اولتراسوند، آتروم داخل عروق را نشان می دهند. بنابراین پیشنهاد می گردد در مطالعات آینده در صورت امکان از تکنیک اولترا سوند به جای آنژیو گرافی استفاده شود.

با توجه به اینکه در این مطالعه نشان داده شد آلل T در نقطه ۵۱۴- ژن HL و آلل A در نقطه ۶۲۹- ژن CETP شیوع بیشتری در بیماران با گرفتگی عروق کرونر دارند، پیشنهاد می گردد تعدادی فرد سالم با میانگین سنی این مطالعه از جامعه، تعیین ژنوتیپ گردیده و در قالب یک مطالعه کوهورت در طی چند سال شیوع انفارکتوس قلبی و دیگر بیماری های قلبی عروقی در آنها پیگیری گردد تا نقش پلی مورفیسیم های ذکر شده بر بروز بیماری قلبی عروقی دقیقاً مشخص گردد.

نتیجه گیری:

آلل A در بیماران فراوانی بیشتری دارد و در هر دو گروه کنترل و بیمار غلظت HDL-C را افزایش داده

منابع:

1. National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). (Third Report) *Circulation*. 2002 Dec; 106(25): 3143-421.
2. Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM*. 2005 Dec; 98(12): 845-56.
3. Ruggeri RB. Cholesteryl ester transfer protein: pharmacological inhibition for the modulation of plasma cholesterol levels and promising target for the prevention of atherosclerosis. *Curr Top Med Chem*. 2005; 5(3): 257-64.
4. Thompson JF, Durham LK, Lira ME, Shear C, Milos PM. CETP polymorphisms associated with HDL cholesterol may differ from those associated with cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2005 Jul; 181(1): 45-53.
5. Lloyd DB, Lira ME, Wood LS, Durham LK, Freeman TB, Preston GM, et al. Cholesteryl ester transfer protein variants have differential stability but uniform inhibition by torcetrapib. *J Biol Chem*. 2005 Apr; 280(15): 14918-22.
6. Padmaja N, Ravindra Kumar M, Soya SS, Adithan C. Common variants of cholesteryl ester transfer protein gene and their association with lipid parameters in healthy volunteers of tamilian population. *Clin Chim Acta*. 2007 Jan; 375(1-2): 140-6.

7. Gomez P, Miranda JL, Marin C, Bellido C, Moreno JA, Moreno R, et al. Influence of the -514C/T polymorphism in the promoter of the hepatic lipase gene on postprandial lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis*. 2004 May; 174(1): 73-9.
8. Carr MC, Brunzell JD, Deeb SS. Ethnic differences in hepatic lipase and HDL in Japanese, black, and white Americans: role of central obesity and LIPC polymorphisms. *J Lipid Res*. 2004 Mar; 45(3): 466-73.
9. Schaefer EJ, Asztalos BF. Cholesteryl ester transfer protein inhibition, high-density lipoprotein metabolism and heart disease risk reduction. *Curr Opin Lipidol*. 2006 Aug; 17(4): 394-8.
10. Jansen H, Verhoeven AJ, Sijbrands EJ. Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein? *J Lipid Res*. 2002 Sep; 43(9): 1352-62.
11. Dobiasova M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER (HDL)). *Clin Biochem*. 2001 Oct; 34(7): 583-8.
12. Monsalve MV, Thommasen HV, Pachev G, Frohlich J. Differences in cardiovascular risks in the aboriginal and non-aboriginal people living in Bella Coola, British Columbia. *Med Sci Monit*. 2005 Jan; 11(1): CR21-8.
13. Yang B, Tian H, Ren Y, Tong N, Yu H, Han L, et al. The change of atherogenic index of plasma (AIP) level in type 2 diabetic pedigrees and the response of AIP to acarbose or glimepiride in therapy of type 2 diabetes mellitus. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2005 Jun; 22(3): 560-4.
14. Dale JW, Schantz MV. Purification and separation of nucleic acid In: *From Genes to genomes*. University of Surrey. UK: John Wiley; 2002. p: 31-3.
15. van't Hooft FM, Lundahl B, Ragogna F, Karpe F, Olivecrona G, Hamsten A. Functional characterization of 4 polymorphisms in promoter region of hepatic lipase gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May; 20(5): 1335-9.
16. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet*. 2008 Feb; 40(2): 161-9.
17. Benn M, Nordestgaard BG, Jensen JS, Grande P, Sillesen H, Tybjaerg-Hansen A. Polymorphism in APOB associated with increased low-density lipoprotein levels in both genders in the general population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Oct; 90(10): 5797-803.
18. Kotowski IK, Pertsemlidis A, Luke A, Cooper RS, Vega GL, Cohen JC, et al. A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet*. 2006 Mar; 78(3): 410-22.
19. Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet*. 2008 Feb; 40(2): 189-97.
20. Nettleton JA, Steffen LM, Ballantyne CM, Boerwinkle E, Folsom AR. Associations between HDL-cholesterol and polymorphisms in hepatic lipase and lipoprotein lipase genes are modified by dietary fat intake in African American and White adults. *Atherosclerosis*. 2007 Oct; 194(2): e131-40.
21. Danesh Pour MS, Hedayati M, Azari F, Ghasemi F, Azizi F. [Association between the Cholesteryl Ester transfer protein-TaqI polymorphism and low HDL-C concentration in Tehran population. *Iranian J Endocr & Metab*. 2004; 5: 355-61.] Persian
22. Danesh Pour MS, Hedayati M, Azari F, Ghasemi F, Azizi F. [Association between B2 allele frequency in CETP gene with low level of HDL-C in Tehran. *J Iranian Univ Med Sci*. 2005; 43(11): 757-64.] Persian

23. Daneshpour MS, Hedayati M, Azizi F. [TaqI B1/B2 and -629A/C cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene polymorphisms and their association with CETP activity and high-density lipoprotein cholesterol levels in a Tehranian population. Part of the Tehran Lipid and Glucose Study (TLGS). Obesity Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shaheed, Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran. <http://www.erc.ac.ir/tlgs/>.]Persian
24. Danesh Pour MS, Hedayati M, Azizi F. [Hepatic Lipase C-514T polymorphism and its association with HDL-C level in Tehran. *Kowsar Med J*. 2005; 2(10): 135-42.]Persian
25. Kathiresan S, Melander O, Anevski D, Guiducci C, Burt NP, Roos C, et al. Polymorphisms associated with cholesterol and risk of cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2008 Mar; 358(12): 1240-9.
26. Ji J, Herbison CE, Mamotte CD, Burke V, Taylor RR, van Bockxmeer FM. Hepatic lipase gene -514 C/T polymorphism and premature coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk*. 2002 Apr; 9(2): 105-13.
27. Redberg RF. Gender differences in acute coronary syndrome: invasive versus conservative approach. *Cardiol Rev*. 2006 Nov-Dec; 14(6): 299-302.
28. Cucuianu M, Coca M, Hancu N. Reverse cholesterol transport and atherosclerosis: a mini review. *Rom J Int Med*. 2007; 45(1): 17-27.
29. Gonzalez-Navarro H, Nong Z, Amar MJ, Shamburek RD, Najib-Fruchart J. The ligand-binding function of hepatic lipase modulates the development of atherosclerosis in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2004 Oct; 279(44): 45312-21.
30. Zhang C, Lopez-Ridaura R, Rimm EB, Rifa Ni, Hunter DJ, Hu FB. Interactions between the -514C3T polymorphism of the hepatic lipase gene and lifestyle factors in relation to HDL concentrations among US diabetic men1-3. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81: 1429-35.
31. Lahoz C, Pena R, Mostaza JM, Laguna F, Garcia-Iglesias MF, Taboada M, et al. RAP Study Group. The -514C/T polymorphism of the hepatic lipase gene significantly modulates the HDL-cholesterol response to statin treatment. *Atherosclerosis*. 2005 Sep; 182(1): 129-34.
32. Dullaart RP, Borggreve SE, Hillege HL, Dallinga-Thie GM. The association of HDL cholesterol concentration with the -629C>A CETP promoter polymorphism is not fully explained by its relationship with plasma cholesteryl ester transfer. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008; 68(2): 99-105.
33. Frisdal E, Klerkx AH, Le Goff W, Tanck MW, Lagarde JP, Jukema JW, et al. Functional interaction between -629C/A, -971G/A and -1337C/T polymorphisms in the CETP gene is a major determinant of promoter activity and plasma CETP concentration in the REGRESS Study. *Hum Mol Genet*. 2005 Sep; 14(18): 2607-18.
34. Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Bloomfield HE, et al. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Oct; 25(10): 2185-91.
35. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fogelman AM. Mechanisms of disease: proatherogenic HDL-an evolving field. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006 Sep; 2(9): 504-11.
36. Prediman KS. Inhibition of CETP as a novel therapeutic strategy for reducing the risk of atherosclerotic disease. *Eur Heart J*. 2007; 28: 5-12.
37. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007 Nov; 357(21): 2109-22.

