

RUJUKAN 1090

PERPUSTAKAAN KAMPUS KESIHATAN
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

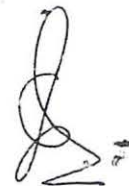
USM J/P-06

Semua laporan kemajuan dan laporan akhir yang dikemukakan kepada Bahagian Penyelidikan dan Pembangunan perlu terlebih dahulu disampaikan untuk penelitian dan perakuan Jawatankuasa Penyelidikan di pusat pengajian

**BAHAGIAN PENYELIDIKAN DAN PEMBANGUNAN
CANSELORI
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA**

Laporan Akhir Projek Penyelidikan Jangka Pendek

- 1) **Nama Penyelidik:** Prof. Madya Dr. Faridah Abdul Rashid
- Nama Penyelidik-Penyelidik Lain (Jika berkaitan):**
1. Dr. Ibrahim Abdullah (Jab Perubatan)
 2. En. Mohd. Rafi Mustapha (calon MSc.)
- 2) **Pusat Pengajian/Pusat/Unit:** Sains Perubatan
- 3) **Tajuk Projek:** Kesan Variasi Genotip Apolipoprotein E Ke Atas Risiko Penyakit 'Premature Ischaemic Heart Disease'



T/TANGAN PENERUSI
J/K PENYELIDIKAN
PUSAT PENGAJIAN

4) (a) **Penemuan Projek/Abstrak**

(Perlu disediakan makluman di antara 100 - 200 perkataan di dalam Bahasa Malaysia dan Bahasa Inggeris. Ini kemudiannya akan dimuatkan ke dalam Laporan Tahunan Bahagian Penyelidikan & Pembangunan sebagai satu cara untuk menyampaikan dapatan projek tuan/puan kepada pihak Universiti).

Kesan Variasi Genotip Apolipoprotein E Ke Atas Risiko Penyakit 'Premature Ischaemic Heart Disease'

Faridah Abdul Rashid, Mohd. Rafi Mustapha. Pusat Pengajian Sains Perubatan. USM.

Apolipoprotein E dihasilkan oleh 3 allel gen, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$, yang terdapat pada Kromosom 19. Isoform ApoE boleh dikenalpasti oleh asid amino yang ada pada posisi 112 and 158. Kami menganalisis darah daripada seramai 83 pelajar perubatan tahun 1 untuk ujian: Jumlah kolesterol dan trigliserida, HDLC (high density lipoprotein cholesterol), LDLC (low density lipoprotein cholesterol), aras ApoA-I and B. Untuk genotip ApoE, DNA diekstrak daripada lapisan putih, digandakan menerusi PCR, ditindak oleh endonuklease, dielektroforesis ke atas gel poliakrilamida dan dilihat setelah diwarnakan dengan etidium bromida. Genotip yang diperolehi ialah: E-3/3 (64%), E-4/3 (27%), E-3/2 (5%), and E-4/2 (4%), and frequencies gen ialah: $\epsilon 2$ (0.04), $\epsilon 3$ (0.80), $\epsilon 4$ (0.16). Genotip E-3/3 menyumbang kepada hiperkolesterolemia, HDLC rendah, LDLC tinggi, ApoB tinggi. Genotip E-4/2 memberi kesan sebalik E-3/3. Genotip E-4/3 menunjukkan hipertriglyceridemia, LDLC rendah dan ApoB rendah. Genotip E-3/2 memmanifestasikan normotriglyceridemia, HDLC tinggi, ApoA-I rendah and nisbah A/B rendah. Kami berpendapat bahawa genotip E-3/3 meningkatkan risiko untuk mendapat penyakit jantung lebih awal. Genotip lain (E-4/3, E-4/2 and E-3/2) mengurangkan risiko terhadap penyakit jantung.

Effect of Apolipoprotein E Genotype Variation on the Risk of Premature Ischaemic Heart Disease

Faridah Abdul Rashid, Mohd. Rafi Mustapha. School of Medical Sciences. USM.

Apolipoprotein E is expressed by 3 allelic genes, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$, on Chromosome 19. ApoE isoforms are distinguished by residues at positions 112 and 158. We analysed blood from 83 first year medical students for: Total cholesterol and triglycerides, HDLC, LDLC, ApoA-I and B levels. For ApoE genotypes, DNA were extracted from buffy coat, amplified by PCR, restricted by endonuclease, electrophoresed on polyacrylamide gel and visualised by ethidium bromide staining. The genotypes obtained were: E-3/3 (64%), E-4/3 (27%), E-3/2 (5%), and E-4/2 (4%), and gene frequencies were: $\epsilon 2$ (0.04), $\epsilon 3$ (0.80), $\epsilon 4$ (0.16). The E-3/3 genotype contributed to hypercholesterolemia, low HDLC, high LDLC, high ApoB. The E-4/2 genotype gave the opposite effect of E-3/3. The E-4/3 genotype exhibited hypertriglyceridemia, low LDLC and low ApoB. The E-3/2 genotype manifested normotriglyceridemia, high HDLC, low ApoA-I and low A/B ratio. We conclude that the E-3/3 genotype had the highest risk for premature heart disease. Those with the other genotypes (E-4/3, E-4/2 and E-3/2) had lower risk of premature heart disease.

(b) **Senaraikan Kata Kunci yang digunakan di dalam abstrak:**

	Bahasa Malaysia	Bahasa Inggeris
1.	Lipoprotein	Lipoprotein
2.	Penyakit jantung	Heart disease
3.	Apolipoprotein E	Apolipoprotein E
4.	Genotip	Genotypes
5.	PCR	Polymerase chain reaction (PCR)
6.	Etidium bromida	Ethidium bromide
7.	Frekuensi gen	Gene frequency
8.	Hiperkolesterolemia	Hypercholesterolemia
9.	Normotrigliseridemia	Normotriglyceridemia
10.	Awal	Premature

5) **Output Dan Faedah Projek**

(a) **Penerbitan (termasuk laporan/kertas seminar)**

(Sila nyatakan jenis, tajuk, pengarang, tahun terbitan dan di mana telah diterbit/dibentangkan).

Apolipoprotein E Genotypes of First Year Malaysian Medical Students Obtained Using Polymerase Chain Reaction (PCR) - Faridah Abdul Rashid, Mohd. Rafi Mustapha. Pembentangan poster dalam Fourth National Conference on Medical Sciences, 8-9 June 1998, USM Kubang Kerian.

(b) **Faedah-Faedah Lain Seperti Perkembangan Produk, Prospek Komersialisasi Dan Pendaftaran Paten.**

(Jika ada dan jika perlu, sila gunakan kertas berasingan)

1. Reagen pengekstraktan DNA direka khas untuk projek ini melalui kaedah trial and error dan akhirnya berjaya mendapatkan satu resipi yang robust untuk membolehkan DNA dari pelbagai sumber diekstrak. Contohnya, DNA dari tiub darah mengandungi heparin, sitrat dan juga klot darah. Pada masa ini, reagen ini disediakan secara pukal (bulk) dan disimpan dalam peti sejuk. Untuk penggunaan, aliquot yang diperlukan diambil dan selebihnya disimpan untuk tempoh yang ditetapkan (tidak melebihi tarikh luput). Walaupun penyediaan reagen ini memerlukan lebih perhatian supaya bacteria-free, pada pendapat kami, ini wajar memandangkan reagen ini boleh digunakan ke atas pelbagai sumber yang menjadi punca DNA genomik.
2. Hingga setakat ini bahan penulisan penyelidikan ini dibuat dalam bentuk abstrak. Penerbitan terdahulu telah difokuskan tentang aspek kaedah. Maka dalam penerbitan yang akan datang, bagi aspek kaedah, kami hanya perlu rujuk pada kertas penerbitan kami yang lepas. Namun terdapat pelbagai teknik-teknik baru dan pengubahsuaian yang telah kami jalankan untuk membangunkan projek ini. Perkara-perkara ini kami rasa lebih sesuai ditletakkan dalam bentuk laman Web untuk dikongsi guna sama oleh penyelidik lain yang berminat. Bahan penulisan penyelidikan yang akan dibangunkan dalam bentuk laman Web juga akan dipindahkan ke bentuk CD-ROM untuk penggunaan standalone bagi kumpulan penyelidikan yang tidak mempunyai akses Internet. Jika boleh kami ingin mengadakan ruang advertisement supaya pembiaya dan pembekal peralatan serta reagen boleh berbuat demikian dalam laman Web kami dan membayar kadar sewa apabila USM menetapkan syarat kelak. Laman Web ini juga akan dimuatkan kebolehan pengendalian maklumbalas supaya penyelidik lain dapat berhubung terus tentang sesuatu permasalahan penyelidikan yang timbul. Pembangunan laman Web ini akan dimohon sebagai projek penyelidikan baru.
3. Jika keseluruhan penulisan penyelidikan ini dapat dibangunkan seperti diterangkan dalam perenggan 2 di atas, kami akan cuba mendapatkan bantuan Biro COMBITS-IT Centre, USM P. Pinang untuk reka-letak bahan dalam CD-ROM dan reka kulit CD jewel case. Kami rasa ini perlu supaya kandungan yang kami bangunkan dalam bentuk CD-ROM boleh dikompreskan untuk penggunaan ke atas platform Windows dan juga Mac. Kami rasa dalam hal ini, mereka lebih arif dan mempunyai sofwer yang diperlukan. Jika PPSP berjaya mempunyai CD writer yang sesuai, kami akan melakukannya di PPSP sahaja dan hanya mendapatkan bantuan dari Biro COMBITS-ITC secara e-mail.
4. Apabila siap, CD-ROM ini akan dipasarkan sendiri oleh kumpulan penyelidikan kami dan juga Jabatan jika diizinkan, di pameran dan persidangan penyelidikan di masa depan. Jika kami dapat membangunkan CD-ROM bersama kit reagen, maka kami akan mempunyai 2 pilihan untuk memasarkan produk kami, iaitu sama ada bersama atau berasingan dengan kit. Dari tinjauan harga semasa CD, kami berpendapat harga patut CD yang akan diterbitkan ialah RM50.00 setiap satu. Kami akan cuba hubungi PIP untuk penetapan harga CD dan kit.
5. Untuk meneruskan usaha pengumpulan maklumat tentang penyelidikan lipid dan menambahkan maklumat sedia ada untuk disuapkan ke laman Web, kami rasa simpanan maklumat dalam bentuk interaktif database adalah yang paling efektif dan memudahkan kami melakukan update, mantau dan mencari maklumat. Bahan penyelidikan ini boleh disimpan untuk rujukan penyelidik USM yang berminat.

(c) **Latihan Gunatenaga Manusia**

i) *Pelajar Siswazah:* En. Mohd. Rafi Mustapha (calon MSc.)

ii) *Pelajar Prasiswazah:* Pelajar DTMP Tahun 3:
1. Kasturi Nair Tangaraju
2. Ruwaidah Saidin
3. Hamid Jan bin Jan Mohamed

iii) *Lain-Lain:* Kerjasama dari:
1. Dr. Frank van Bockxmeer,
DNA Lab, Dept. of Biochemistry,
Royal Perth Hospital
2. Pelajar Perubatan Tahun 1, 1997
3. Teknologis Makmal Patologi Kimia:
• En. Zakaria Abu Samah
• En. Bashir Abdullah
• En. Ezam Zainan
4. Dr. Cheng Hwee Ming
Dept. of Physiology, University Malaya
50603 Kuala Lumpur

(c) Latihan Gunatenaga Manusia

Projek ini telah dimulakan pada Jun 1996 dengan memberi peluang kepada seorang calon MSc iaitu En. Mohd. Rafi Mustapha untuk melakukan sebahagian projek ini sebagai projek MSc beliau. Beliau ditugaskan untuk membangunkan kaedah Genotip Apo E dengan melakukan pengubahsuaian teknik semasa supaya menepati saiz sampel yang kecil iaitu 10 ml darah yang mana hanya 5 µl genomik DNA digunakan. Beliau juga telah berpeluang mencuba reagen untuk pengekstraktan DNA ke atas pelbagai spesimen berdarah. Beliau juga dipertanggungjawabkan untuk mengambil darah pesakit dari ICU dan klinik untuk dianalisis. Setakat ini 16 genomik DNA pesakit jantung telah diperolehi tetapi tidak dapat dianalisis apabila projek kehabisan wang Vot 27. Sampel DNA ini masih disimpan untuk dianalisis kelak jika kewangan mengizinkan.

Oleh kerana penyelidik bersama tidak lagi bersama kumpulan penyelidikan kami, kami mengalami sedikit masalah untuk mendapatkan sampel darah dari pesakit jantung yang muda seperti dikehendaki dalam projek ini. Jururawat ICU terlalu sibuk dan pesakit terlalu tenat maka kami tidak mendapat darah secukupnya untuk menganalisis genotip apoE pesakit berkenaan. Kami berpendapat, jika pesakit datang semula ke klinik untuk rawatan lanjut, maka kami akan berpeluang mendapatkan darah secukupnya untuk analisis.

Rancangan untuk saringan risiko penyakit jantung telah dilakukan oleh pelajar DTMP. Mereka telah melakukan penilaian kualiti ke atas mesin penganalisa untuk menentukan keputusan penyelidikan tepat dan jitu walaupun terpaksa dijalankan ke atas pelbagai mesin. Pertukaran mesin ditetapkan apabila mesin penganalisa utama mengalami kerosakan dan projek perlu diteruskan. Bagi tujuan percubaan ini, sampel dari penderma darah telah digunakan.

Dr. Frank van Bockxmeer telah bertindak sebagai penasihat projek ini memandangkan beliau telah pun diiktirafkan sebagai penyelidik genotip apoE di seluruh dunia. Kami amat berbesar hati kerana Dr. Bockxmeer sanggup membantu projek kami dari aspek membekalkan piawai dan protokol untuk genotip apo E yang dibangunkan oleh makmal beliau.

Untuk mendapatkan sumber genomik DNA 'normal' kami telah berpeluang mendapatkan kerjasama 83 orang pelajar Kursus Perubatan Tahun 1. Mereka telah diberi kuliah dan taklimat sebelum membuat pilihan sendiri untuk menderma darah bagi projek penyelidikan ini. Keputusan makmal dimaklumkan terus kepada mereka sebagai tanda terima kasih. Bayaran diberi kepada penderma darah dari kalangan staf USM sebanyak RM5.00 untuk 10 ml darah.

Untuk membantu kami mendapatkan darah melalui teknik venepuncture, kami telah mendapatkan khidmat daripada 3 orang teknologis terlatih yang berpengalaman dari Jabatan. Dari pengalaman kami, pengambilan darah yang dijalankan oleh doktor menimbulkan banyak rasa sakit di kalangan pelajar. Oleh itu, untuk tujuan pengambilan darah kali ini, kami telah mendapatkan bantuan teknologis dari Jabatan sendiri. Dari sesi pengambilan ini kami dapati pelajar lebih berpuas hati.

Dr. Cheng Hwee Ming dari UM telah menunjukkan minat terhadap teknik genotip apoE yang kami lakukan di PPSP dengan menggunakan reagen kami sendiri. Beliau telah meminta kami maklumat lanjut tentang kaedah yang kami gunakan dan pelbagai lagi. Beliau sendiri menjalankan penyelidikan tentang oxidised LDL. Kami rasa penyelidikan beliau juga akan menambahkan pengetahuan kami tentang lipid. Maka kami akan terus berhubung dengan beliau.

6. Peralatan Yang Telah Dibeli:

Tiada peralatan baru dibeli.

UNTUK KEGUNAAN JAWATANKUASA PENYELIDIKAN UNIVERSITI

**T/TANGAN PENERUSI
J/K PENYELIDIKAN
PUSAT PENGAJIAN**

7. Masalah Yang Timbul Semasa Penyelidikan

Alat utama yang kami gunakan dalam projek penyelidikan ini ialah thermal cycler. Projek ini telah tergendala sebanyak 2 kali berikutan kerosakan pada alat thermal cycler. Kerosakan pertama berlaku apabila pekerja dari projek penyelidikan lain menggunakan thermal cycler projek ini. Setelah pembaikan dilakukan, pekerja yang sama datang pula untuk menggunakan thermal cycler dan merosakkannya buat kali ke-2. Hingga tarikh tamat projek penyelidikan ini kami dapati thermal cycler ini masih tidak dapat dibaik-pulih.

Mesin penganalisa kimia dalam Makmal Routin juga mengalami kerosakan, maka projek banyak kali tergendala akibatnya. Kami rasa Pejabat Timbalan Dekan, Bahagian Penyelidikan & Pengajian Siswazah jika boleh, menyediakan peralatan baru memandangkan alat penganalisa yang ada sekarang amat usang dan menyukarkan kami melakukan penyelidikan yang baik.

Masalah kami yang paling ketara ialah peruntukan penyelidikan telah habis sebelum sampai tempoh tamat projek. Ini berekoran harga barangan penyelidikan yang menjulang tidak menentu. Kami amat kesal perkara ini berlaku kerana kami tidak menduganya sama sekali. Kami terpaksa meminta bantuan rakan kami dalam penyelidikan lain untuk bekalan asas seperti pipet tip, gauze dan test tubes supaya boleh sampai ke penghujung projek. Dalam hal ini, saya amat berharap supaya di masa akan datang Pejabat Timbalan Naib Canselor, Bahagian Penyelidikan boleh membantu dari segi memberi geran yang lebih-bagi projek penyelidikan berasaskan sains asasi yang mana banyak bergantung kepada kit reagen dari luar negara dan menetapkan ceiling yang lebih tinggi daripada RM20,000 yang ada sekarang. Pada hemah saya, akibat kegawatan ekonomi, RM20,000 hanya mampu menyara setengah daripada projek penyelidikan yang pernah dijalankan di masa lampau.

Akibat kegawatan ekonomi, kami dapati banyak syarikat yang pada mulanya membekalkan kit reagen untuk projek penyelidikan ini telah terpaksa ditutup. Berikutan ini kami terpaksa mencari protokol lain untuk menjalankan sesetengah ujian dan menyingkirkan sesetengah spesimen yang diterima. Kami berharap di masa depan Pejabat Timbalan Naib Canselor, Bahagian Penyelidikan dapat membantu kami dari segi pembelian kit terus daripada pembekal prinsipal di Eropah.

Dari segi kepenggunaan peralatan penyelidikan, saya sebagai ketua projek berasa, sudah sampai masanya semua peralatan penyelidikan dan servis USM disenaraikan dalam database yang boleh dicapai oleh semua penyelidik USM dari ketiga-tiga kampus. Senarai ini juga perlu mengandungi perlatan yang telah dilupuskan kerana spare part boleh diambil untuk membaiki peralatan lain.

Saya juga berpendapat, penyelidik bersama terutamanya clinicians, perlu lebih bertanggungjawab dan tidak memandang remeh usaha penyelidikan kami ini yang berupa sains asasi. Kami amat memerlukan bantuan mereka dalam aspek klinikal namun mereka sering lari dan meninggalkan projek kami tanpa khabar. Perbuatan mereka seperti ini sebenarnya menimbulkan banyak rasa tidak puas hati di kalangan pekerja lain dalam projek yang telah lama membantu projek penyelidikan ini dari sejak awal ia dijalankan di PPSP pada tahun 1989. Saya amat berharap supaya clinicians lebih prihatin tentang peranan mereka ini jika mereka benar-benar ingin menceburi penyelidikan kami ini.

Apolipoprotein E genotypes of 1st. year Malaysian medical students obtained using polymerase chain reaction (PCR)

Faridah Abdul Rashid,
Mohd. Rafi Mustapha

Dept. of Chemical Pathology,
School of Medical Sciences,
Universiti Sains Malaysia,
16150 Kubang Kerian,
Kelantan, Malaysia

e-mail:
faridah@kb.usm.my
mohdrafi@kb.usm.my

Apolipoprotein E, a single polypeptide of 299 amino acids and molecular weight of 34 000-39 000, forms 10-20% of VLDL (very low density lipoproteins) protein. Its synthesis in the liver is directed by a gene on Chromosome 19. Its levels are higher in women than in men. Its isoforms, designated apolipoprotein E-2, E-3 and E-4, are determined by three allelic genes, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$. Its isoforms are distinguished on the basis of cysteine and arginine residues at positions 112 and 158. Chylomicrons and VLDL are metabolised intravascularly by extrahepatic lipoprotein lipase, to form chylomicron remnants and VLDL remnants. Apolipoprotein E is important for remnant-hepatic receptor interactions for removal. Isoforms E-3 and E-4 caused normal clearance from circulation. Isoform E-2 is recognised as abnormal and the associated lipoprotein remnants are not catabolised normally. Thus these remnants accumulate in the plasma as beta-VLDL. Apolipoprotein disorders may be due to presence of apolipoprotein E variants or its absence. It is known that alleles $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ contribute to hyperlipidemia. The gene $\epsilon 2$ expresses apolipoprotein E-2 which has markedly reduced binding activity to lipoprotein receptors. The aim of this study was to determine the distribution of apolipoprotein E genotypes in young donors (83 first year medical students). Anthropometric measurements (height and weight) taken were for calculating body mass index (BMI). Ten ml blood was collected by venepuncture from each student and placed into two 2.5 ml EDTA tubes plus one 5 ml plain tube. Plasma and serum were separated by centrifugation and stored at 4°C prior to analysis. Total cholesterol and triglycerides were performed using bio-Merieux kits on Hitachi 705. HDL (high density lipoproteins) were separated by chemical precipitation (Boehringer reagent) and HDL cholesterol analysed as for total cholesterol. LDL (low density lipoproteins) cholesterol was calculated using Friedewald formula. VLDL cholesterol was obtained by difference of cholesterol. Apolipoprotein A-I and B levels were obtained using Bayer Sera-Pak kits, using half the amount of reagents stated. For analysis of apolipoprotein E genotypes, DNA were extracted from buffy coat, amplified by PCR using two primers, restricted by endonuclease, electrophoresed on polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide according to established methods. None of the samples contained E-4/4 nor E-2/2 genotypes. The E genotypes could not be obtained in 6 samples. The genotypes obtained were: E-3/3 (64%), E-4/3 (27%), E-3/2 (5%), and E-4/2 (4%). The gene frequencies were: $\epsilon 2$ (0.04), $\epsilon 3$ (0.80), $\epsilon 4$ (0.16). The E-3/3 genotype showed hypercholesterolemia, low HDL cholesterol (HDLc), low VLDL cholesterol (VLDLc), high LDL cholesterol (LDLc), high apolipoprotein A-I and B, and high A/B ratio. The E-4/2 genotype was opposite of E-3/3 and showed hypocholesterolemia, high VLDLc, low LDLc and low apolipoprotein B. The E-4/3 genotype has hypertriglyceridemia, high VLDLc, low LDLc and low apolipoprotein B. The E-3/2 genotype manifested normotriglyceridemia, high HDLc, low VLDLc, low apolipoprotein A-I and low A/B ratio.

We conclude that the E-3/3 genotype had the highest risk for premature heart disease. Those with the other genotypes (E-4/3, E-4/2 and E-3/2) were spared and had lower risk of premature heart disease.