ORIGINAL ARTICLE

The -T786C Polymorphism in the 5' Flanking Region of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene as a Biomarker in Iranian Population with Coronary Artery Disease

Shokoufeh Mehrtashfar[1],
Aria Esmaeli Khatir[2-3],
Mahdi Safarpour[4],
Mohammad Moghadam[5],
Ahmad Ebrahimi[6]

[1] MSc in Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2] Cardiology Specialist, Iranian Research Center of Endovascular Intervention, Tehran, Iran
[3] Cardiology Specialist, Iranian Society of Atherosclerosis, Tehran, Iran
[4] MSc in Biotechnology, Cellular and Molecular Research Center, Obesity Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] MSc in Molecular and Cell Biology, Department of Cellular and Molecular biology, Hematology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[6] Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received March 2, 2015 ; Accepted July 27, 2015)

Abstract

Background and purpose: Endothelial-derived nitric oxide (NO) is a major contributor in regulating myocardial function and has been implicated in development of coronary artery disease (CAD) as the most common type of cardiovascular disease. It is synthesized in the human body from L-arginine by constitutive endothelial NOS (eNOS) as one out of three known isoforms of NO synthase (NOS) involved in this process. Based on recent studies, single nucleotide polymorphisms (SNPs) of some genes, such as eNOS, appear to be genetic risk factors for CAD; however, the results are inconsistent across different ethnic populations. Therefore, the current study was carried out to assess the association between -786T/C polymorphism (rs2070744) and susceptibility to CAD risk in Iranian population.

Materials and methods: The study included 50 patients with angiographically confirmed CAD (≥50% stenosis in at least one coronary vessel) and 100 aged-matched individuals without cardiovascular background, hypertension, diabetes, or any other specific illness. The genomic DNA was extracted from peripheral blood cells and genotyping was performed using amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR).

Results: The frequency of risk allele (C) was significantly higher in case group compared to control group (P= 0.04). According to the findings, the presence of the C allele was associated with 1.67-fold increased risk of CAD compared with individulas lacking the risk allele (95% CI= 1.01-2.73, P= 0.04).

Conclusion: Several studies revealed association of -T786C polymorphism with coronary spasm, myocardial infarction, hypertension, and multivessel CAD in different populations. In current study, a possible association was found between -T786C polymorphism and risk of CAD, which is in line with previous findings. These results suggest this variation as a predictor marker for estimating the risk of CAD in Iranian population.

Keywords: Coronary artery disease, Polymorphism, eNOS, rs 2070744

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(127): 1-9 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۷ مرداد سال ۱۳۹۴ (۹-۱)

پلی مورفیسم T786C- در ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی [eNOS] به عنوان یک فاکتور خطرگویا در بیماران ایرانی مبتلا به اختلالات عروق کرونری

شکوفه مهرتاش فر[۱]
آریا اسماعیلی خطیر[۲،۳]
مهدی صفرپور[۴]
محمد مقدم[۵]
احمد ابراهیمی[۶]

چکیده

سابقه و هدف: بیماری عروق کرونر به عنوان رایج ترین فرم بیماری‌های قلبی و عروقی، یک بیماری چند فاکتوری با اتیولوژی پیچیده بوده که مجموعه‌ای از فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در بروز آن تاثیر گذار می‌باشد. از جمله مهم‌ترین ژن‌های شناخته شده مرتبط با بیماری‌های قلبی می‌توان به ژن نیتریک اکسید سنتاز ۳ (NOS3) اشاره نمود.از آن‌جایی که نیتریک اکسید یک مولکول کلیدی تنظیمی با تاثیرات گسترده متابولیک، عروقی و سلولی است، کاهش سنتز آن می تواند در روند ایجاد آترواسکلروز کرونری موثر باشد. از این رو می‌توان پلی‌مورفیسم‌های ژن NOS3 را با افزایش استعداد ابتلا به بیماری عروق کرونر مرتبط دانست.

مواد و روش‌ها: مطالعه مورد- شاهدی حاضر از شهریور الی اسفند سال ۱۳۹۲ بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به بیماری عروق کرونر (تایید شده بر مبنای نتایج آنژوگرافی) و ۱۰۰ فرد سالم در مرکز ژنتیک پارسه انجام گرفت. DNA ژنومیک از لکوسیت‌های خون محیطی به روش Salting out استخراج و پلی‌مورفیسم T786C- به‌وسیله تکنیک ARMS-PCR تعیین ژنوتیپ شد.

یافته ها: فراوانی آلل C واریانت T786C- در بیماران به میزان قابل توجهی بیشتر از گروه کنترل بود (p=۰/۰۴). بر این اساس حضور آلل C (آلل موتانت) شانس ابتلا به بیماری را به میزان ۱/۶۷ برابر افزایش می داد (OR=1.67, 95% CI= 1.01-2.73 p=۰/۰۴۱).

استنتاج: یافته‌های بررسی حاضر نشاندهنده ارتباط معنی‌دار میان تغییرات ژنتیکی ژن eNOS با خطرابتلا به بیماری عروق کرونر می باشد. از این رو می‌توان پلی مورفیسم T786C- را به عنوان یک مارکر پیش بینی‌کننده خطر ابتلاء به بیماری عروق کرونر در جمعیت ایرانی معرفی کرد.

واژه های کلیدی: بیماری عروق کرونر، پلی مورفیسم،eNOS، rs2070744

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان به شمار می‌روند. متأسفانه بیماری‌های قلبی عروقی در سال‌های اخیر روند رو به گسترشی خصوصاً در کشورهای در حال توسعه داشته‌اند به‌طوری‌که

مولف مسئول: احمد ابراهیمی – تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم
E-mail: ae35m@yahoo.com

۱. کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲. پزشک متخصص قلب و عروق، مرکز تحقیقات اندوواسکولار اینترونشن ایران، تهران، ایران
۳. پزشک متخصص قلب و عروق، انجمن آترواسکلروز ایران، تهران، ایران
۴. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵. کارشناس ارشد سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۶. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۲/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۲/۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۵/۵

هم‌اکنون به عنوان یکی از مهمترین چالش های بهداشت جهانی محسوب می‌شوند(۱). بر مبنای مطالعات انجام شده تخمین زده می‌شود که بیماری‌های قلبی عروقی سالانه در حدود یک سوم مرگ و میر جهانی را به خود اختصاص می‌دهند(۲). بیماری‌های قلبی عروقی انواع مختلفی دارند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به بیماری عروق کرونر اشاره کرد. این بیماری یکی از شایع‌ترین انواع بیماری‌های قلبی عروقی و یکی از علل عمده‌ی حمله‌های قلبی است که در اثر ایجاد پلاک‌هایی در طول دیواره داخلی عروق کرونر قلب به وجود می‌آید. ایجاد این پلاک‌ها عروق را باریک و خون رسانی به عضله قلب را محدود می‌کند(۱). این فرآیند آترواسکلروز نام دارد که از سنین جوانی آغاز شده و تا سنین میانسالی ادامه می‌یابد(۵-۳).

بیماری عروق کرونر یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر در جهان و علی الخصوص در ایران به شمار می‌رود. ابتلاء بیش از ۳۰ میلیون نفر در جهان و مرگ و میر ۱۷ میلیون نفر در سال این بیماری را به عنوان یکی از عمده‌ترین علل مرگ و میر در دنیا مطرح می‌سازد(۶). در ایران نیز بیماری‌های قلبی دارای شیوع ۳۹ درصدی بوده و از نخستین علل مرگ و میر به شمار می‌آیند. از این سو پیشگیری و کاهش میزان مرگ و میر ناشی از بیماری عروق کرونر به عنوان یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های بهداشت عمومی در سراسر جهان به شمار می‌رود که جست و جو برای یافتن مارکرهای زیستی به منظور شناسایی اوّلیه‌ی افراد مستعد ابتلا به عروق کرونر به امری مهم مبدل کرده است(۸،۷). علائم و نشانه‌های بیماری عروق کرونر عموماً در حالت‌های پیشرفته بیماری بروز می‌کنند و بیشتر افراد مبتلا هیچ علامتی از بیماری را برای چندین دهه و پیش از شروع اوّلیه نشانه‌ها از خود بروز نمی‌دهند. هم‌چنان که بیماری پیشرفت می‌کند، ممکن است انسداد تقریباً کاملی در لومن عروق کرونر رخ دهد که به شدت جریان خون حامل اکسیژن به میوکاردیوم (عضله قلب) را محدود می‌کند. افرادی با چنین درجه‌ای از بیماری معمولاً از یک یا تعداد بیش‌تری از حملات قلبی رنج می‌برند(۹،۳). در طول دو دهه‌ی گذشته، عملکرد اندوتلیوم عروقی و اختلالات لیپیدی به عنوان یک مارکر قدرتمند برای بررسی سلامت قلب و عروق مطرح شده است. بر این اساس، نارسایی عملکرد اندوتلیال ابتدایی‌ترین واقعه‌ای است که در روند ایجاد و توسعه این بیماری رخ می‌دهد. نارسایی عملکرد اندوتلیال به میزان قابل توجهی با تمامی فاکتورهای خطر رایج بیماری‌های قلبی و عروقی شامل چاقی، افزایش فشارخون، افزایش کلسترول خون، دیابت، استعمال دخانیات و بی‌تحرکی فیزیکی که زمینه ساز آترواسکلروز هستند، مرتبط می‌باشد(۱۰،۷) به‌طور کلی، بیماری‌های عروق کرونراساس پلی ژنیک داشته و شناسایی مجموعه ژن‌های مرتبط در هر جمعیت می‌تواند منجر به ایجاد و گسترش درمان‌های جدید و افزایش پیش‌بینی خطر ابتلا به بیماری شود(۱۱). مطالعات گسترده ژنومی که تاکنون صورت گرفته اند حدود ۳۴ جایگاه ژنی متمایز را در ارتباط با بیماری عروق کرونر شناسایی کرده‌اند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ژن کدکننده‌ی نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیایی (eNOS) اشاره کرد که یکی از مهم‌ترین ژن‌های کاندید در پیش بینی ابتلاءبه بیماری عروق کرونر می‌باشد(۱۲،۱). آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیایی (eNOS) در انسان توسط خانواده ژنی NOS کد می‌گردد. فرم اندوتلیالی این پروتئین توسط زیر واحد NOS3 بیان می‌شود که بر روی کروموزوم ۷ قرار داشته و شامل ۲۶ اگزون و به طول تقریبی ۲۱ kb می‌باشد(۱۵-۱۳). خانواده ژنی NOS مسئول تولید نیتریک اکساید (NO) در حضور L-آرژنین در بافت‌های مختلف است. نیتریک اکساید یک مولکول زیستی تنظیمی و سیگنال درون سلولی در سیستم‌های عصبی، ایمنی و قلبی عروقی است. نتایج تحقیقات انجام یافته حاکی از آنست که تولید مداوم NO باعث حفظ حجم و عملکرد عروق می‌گردد(۱۷،۱۶،۱۴).

بر مبنای مطالعات انجام شده پلی‌مورفیسم‌های ژنی

در برخی از موارد می‌توانند منجر به تغییر فعالیت آنزیم مربوطه شوند. از این رو مطالعات متعدد و گسترده‌ای در جوامع مختلف به منظور بررسی ارتباط میان خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی به ویژه عروق کرونری و پلی‌مورفیسم‌های شناخته شده ژن NOS3 هم‌چون تنوع‌های آللی T786C – در انتهای '5 ژن eNOS و تکرار CA در اینترون ۱۳ انجام گرفته است(۲۰-۱۸). علی‌رغم نتایج ارزشمند به دست آمده در زمینه شناسایی ژن‌ها و تغییرات ژنتیکی مرتبط با بیماری‌های قلبی و عروقی در یک دهه گذشته، عدم همخوانی و تکرارپذیری نتایج حاصله در جمعیت‌های مختلف یکی از چالش‌های پیش‌رو در این زمینه بوده است. از این رو بررسی مجدد یافته‌های به دست آمده از مطالعات همبستگی گسترده‌ی ژنوم در جمعیت های بومی به منظور دستیابی به یک جمع‌بندی مستدل ضروری است. از سوی دیگر تا کنون مطالعات چندانی به منظور بررسی پلی‌مرفیسم‌های شایع مرتبط با بیماری عروق کرونر در جمعیت ایران انجام نپذیرفته است. بنابراین، از نتایج چنین پژوهش‌هایی می‌توان به عنوان مقدمه‌ای برای انجام تحقیقات گسترده‌تر در آینده استفاده نمود. با توجه به مطالب ذکر شده مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر پلی‌مورفیسم T786C– از ژن eNOS و نقش آن درافزایش خطر ابتلا به بیماری عروق کرونری در جمعیت بیماران ایرانی انجام گرفته است.

مواد و روش ها

در این مطالعه مورد- شاهدی تعداد نمونه با توجه به مشکلات نمونه‌گیری و با هدف گویا بودن نمونه ۱۵۰ نفر (حداقل ۵۰ بیمار مبتلا به بیماری عروق کرونر و ۱۰۰ فرد سالم) محاسبه گردید. پس از ارزیابی و مشخص کردن بیماران کاندید آنژیوگرافی (۱۸ زن و ۳۲ مرد) به دلیل گرفتگی عروق قلبی توسط متخصص قلب و عروق، این افراد جهت انجام مشاوره و ترسیم شجره و گرفتن اطلاعات فردی و بالینی در بازه زمانی شش ماهه (شهریور ۱۳۹۲ تا اسفند ۱۳۹۲) به مرکز پارسه معرفی شدند. مشارکت کلیه افراد در تحقیق حاضر با کسب رضایت آگاهانه از آن‌ها صورت گرفت. پس از انجام مشاوره و ثبت اطلاعات در قالب پرسشنامه‌ای تدوین شده و با کسب رضایت از خانواده بیمار، نمونه خون از فرد بیمار بر اساس شجره به منظور استخراج DNA تهیه و نگهداری گردید. گروه کنترل نیز شامل ۱۰۰ فرد سالم (۱۵ زن و ۸۵ مرد) در سنین مشابه با افراد شرکت کننده در گروه مورد بود. افراد گروه کنترل همگی تحت آزمایشات لازم و معاینات کامل قرار گرفتند و پس از تایید سالم بودن آن‌ها، نمونه‌های خون این افراد در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های خون گروه کنترل با حجم ۵ سی‌سی در لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ذخیره و تا زمان استخراج در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از افراد پروباند نمونه خون تام تهیه و DNA ژنومی به روش نمک اشباع استخراج گردید. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت ژنوتیپ هر یک از افراد شرکت‌کننده در مطالعه با استفاده از تکنیک ARMS-PCR و به کارگیری پرایمرهای اختصاصی تعیین شد. به منظور تکثیر قطعه‌ی ۲۸۹ bp پلی‌مورفیسم T786C–، برمبنای توالی و خصوصیات ناحیه موردنظر،پرایمرهای مناسب توسط نرم‌افزار Gene Runner طراحی شدند. سپس ساختار هر یک از پرایمرهای طراحی شده به منظور اطمینان از اختصاصی بودن آن‌ها مورد بررسی مجدد قرار گرفت. بدین ترتیب از پرایمرهای

FC: 5'- CCTCTCCCAGTCTCTCAGCT-3'
(20bp, Tm= 60/03),
RN: 5'-TAGGGCTGAGGCAGGG TC ATCCG-3'
(23bp, Tm= (67/76),
RM: 5'- TAGGGCTGAGGCAGGGTCATCCA -3'
(23bp, Tm= 66/96)

در مطالعه حاضر استفاده شد. شرایط انجام واکنش تکثیر شامل مرحله واسرشت اوّلیه در دمای ۹۵ درجه

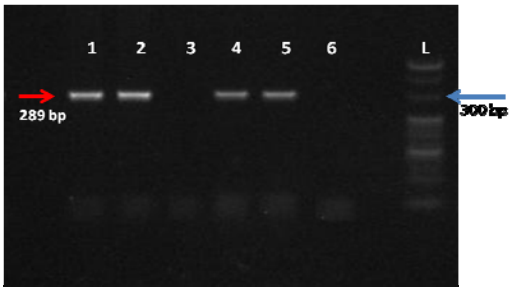
سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه بود. در نهایت الکتروفورز محصولات PCR به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد انجام گرفت. مقایسه فراوانی آللی و ژنوتیپی در دو گروه مورد و شاهد و هم‌چنین بررسی تعادل هاردی- واینبرگ برای فراوانی ژنوتیپ‌ها به وسیله آنالیز مجذور خی بررسی شد. آنالیزهای آماری به کمک نسخه ۲۰ نرم‌افزار SPSS انجام و سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

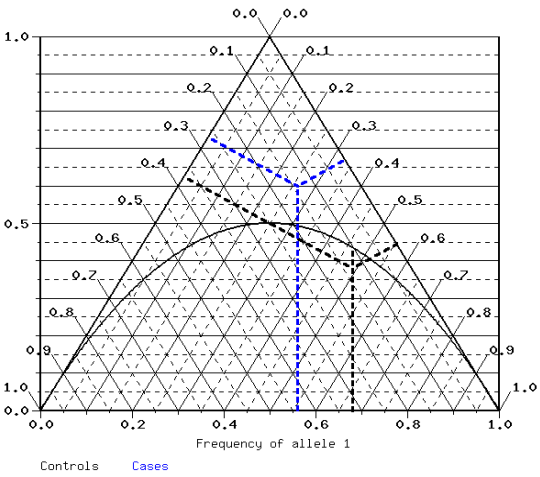
پس از انجام PCR به روش ARMS، مشاهده قطعه‌ای به طول ۲۸۹ جفت باز بیانگر حضور آلل C و T بود که بر مبنای آن ژنوتیپ هر فرد تعیین شد (تصویر شماره ۱).

با توجه به یافته‌های به دست آمده در این مطالعه، توزیع ژنوتیپی پلی‌مورفیسم T786C - در هر دو گروه مورد (p=۰/۱۲۴، f=۰/۲۱۷) وشاهد (p=۰/۲۰۴، p=۰/۱۲۶) از تعادل هاردی- واینبرگ تبعیت می‌کرد (تصویر شماره۲) که بیانگر مناسب بودن انتخاب و نمونه‌گیری اوّلیه در این طرح می‌باشد.

بررسی توزیع فراوانی آللی در هر دو گروه مورد و شاهد نشان داد که آلل T دارای بیش‌ترین فراوانی در هر دو گروه بیماران (۵۶ درصد) و گروه شاهد (۶۸ درصد) می‌باشد (جدول شماره ۱). از سوی دیگر، نتایج به دست آمده نشان داد که فراوانی آللی در دو گروه مورد و شاهد دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد (p=۰/۰۴۱). با توجه به یافته‌های موجود، شانس مشاهده آلل C به عنوان آلل موتانت نسبت به مشاهده آلل T در گروه بیماران به میزان ۱/۶۷ برابر بیش‌تر از شانس حضور آلل C در گروه افراد سالم است. از این رو می‌توان حضور آلل C را به عنوان عامل افزایش خطر ابتلاء به بیماری عروق کرونر در نظر گرفت (CI:۱/۰۱-۲/۷۳, p=۰/۰۴۱ OR= ۱/۶۷,).بر مبنای یافته‌های به دست آمده فراوانی ژنوتیپ‌های TT، TC و CC در گروه مورد به ترتیب ۲۶ درصد، ۶۰ درصد و ۱۴ درصد و در گروه شاهد به ترتیب ۴۹ درصد، ۳۸ درصد و ۱۳ درصد می‌باشد. تفاوت



تصویر شماره ۱: تصویر مربوط به الکتروفورز محصولات ARMS-PCR با طول قطعه ۲۸۹ جفت باز حاصل تکثیر اختصاصی پلی مورفیسم T786C- بر روی ژل آگارز ۲ درصد ردیف ۱و۲: فرد هتروزیگوس. ردیف ۳و۴: فرد هموزیگوس موتانت. ردیف ۵و۶: فرد همزیگوس نرمال. L: مارکر ۲۰ جفت بازی



تصویر شماره ۲: مقایسه فراوانی ژنوتیپی و تعادل هاردی -واینبرگ در دو گروه مورد و شاهد

جدول شماره ۱: فراوانی آللی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی T786C- ژن eNOS در دو گروه بیمار و سالم

آلل	گروه تحت مطالعه: بیمار تعداد (درصد)	کنترل تعداد (درصد)	کل	OR	95% CI	سطح معنی داری
T	(۵۶/۰)۵۶	(۶۸/۰) ۱۳۶	۱۹۲	رفرانس		

C	(۴۴/۰) ۴۴	(۳۲/۲) ۶۴	۱۰۸	۱/۶۷	۱/۰۱-۲/۷۳	۰/۰۴۱
	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰			

داده‌های جدول بر اساس تعداد (درصد) گزارش شده اند.

مشاهده شده در فراوانی ژنوتیپی میان گروه مورد و شاهد بر اساس نتایج حاصل از بررسی مدل رگرسیون لجستیک نشاندهنده وجود ارتباط معنی‌دار (p =۰/۰۰۵) میان حضور ژنوتیپ TC و خطر ابتلا به بیماری عروق کرونر می‌باشد. بنابراین، بخت مشاهده ژنوتیپ TC نسبت به مشاهده ژنوتیپ TT در گروه بیماران 2/97 برابر بخت مشاهده ژنوتیپ TC در گروه افراد سالم می‌باشد. از این‌رو می‌توان ژنوتیپ TC را به عنوان یک فاکتور خطر در بروز بیماری عروق کرونر در نظرگرفت (p=۰/۰۰۵, CI:۱/۳۷-۶/۴۶ OR= ۲/۹۷,). این در حالی است که ارتباط معنی‌داری برای حضور ژنوتیپ CC و ابتلاء به بیماری عروق کرونر مشاهده نشد (p =۰/۲۰۴) (جدول شماره ۲).

جدول شماره۲: فراوانی ژنوتیپ‌هایT786C- در دوگروه بیمار و کنترل

	گروه تحت مطالعه					
ژنوتیپ	بیمار تعداد (درصد)	کنترل تعداد (درصد)	کل	OR	95% CI	سطح معنی داری
TT	(۲۶/۰) ۱۳	(۴۹/۰) ۴۹	۶۲	رفرانس		
TC	(۶۰/۰)۳۰	(۳۸/۰)۳۸	۶۸	۲/۹۷	۱/۳۷-۶/۴۶	۰/۰۰۵
CC	(۱۴/۰)۷	(۱۳/۰) ۱۳	۲۰	۲/۰۳	۰/۶۷-۶/۱۲	۰/۲۰۴
	۵۰	۱۰۰	۱۵۰			

داده‌های جدول بر اساس تعداد (درصد) گزارش شده اند.

بحث

در طول دهه گذشته شواهد قابل توجهی مبنی بر نقشاساسی NO در بروز بیماری عروق کرونر به دست آمده است. درسیستم قلبی وعروقی مولکول سیگنالی NO که توسط آنزیم NO سنتاز اندوتلیالی تولید می‌گردد، ممکن است مراحل کلیدی مختلفی را در فرایند آترواسکلروز مهار کرده و نقش حیاتی در حفظ عملکرد عروق ایفا کند(۲۱،۱۴،۱۳) این تحقیقات بیانگر این نکته‌اند که آلل‌های متفاوت ژن eNOS ممکن است با بروز بیماری عروق کرونر مرتبط باشند(۲۲). تا کنون واریانت‌های متعددی از ژن eNOS شناسایی شده‌اند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به واریانت T786C – اشاره نمود. با توجه به موقعیت T>C 786- در ناحیه پروموتر NOS3، مطالعات مربوط به بررسی عملکرد این پلی‌مورفیسم بیش‌تر بر روی سطوح بیان eNOS متمرکز شده‌اند. نتایج تحقیقات انجام شده در این زمینه حاکی از سطوح پایین‌تر mRNAی eNOS و نیتریت/ نیترات سرمی در افرادی با واریانت 786C- است. این درحالی است که سنجش ژن‌های گزارشگر چنین نقشی را تایید می‌کند(۲۳،۳).

برخی از مطالعات نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم T786C– ممکن است باعث کاهش چشمگیری در فعالیت پروموتر ژن NOS3 شود که به کاهش بیان eNOS و در نهایت کاهش تولید NO منجر می‌گردد(۲۵،۲۴) هم‌چنین مطالعات in vitro نشان داده‌اند که جایگزینی تیمین توسط سیتوزین در موقعیت ۷۸۶- منجر به کاهش ۵۰ درصدی فعالیت رونویسی می‌شود که احتمالاً این امر به دلیل اتصال هر چه بیش‌تر RPA1 (پروتئین تکثیری A1) می‌باشد که به عنوان یک پروتئین سرکوبگر ژنی در افراد دارای آلل موتانت عمل می‌کند(۲۶).

مطالعات زیادی ارتباط میان پلی‌مورفیسم‌های ژن eNOS و بیماری عروق کرونر را بررسی کرده‌اند که به نتایج متناقضی دست یافته‌اند. برخی از مطالعات عدم وجود ارتباط میان پلی‌مورفیسم‌های ژن eNOS و بیماری عروق کرونر را در جمعیت‌های قفقازی و آسیایی گزارش کرده‌اند(۴). به عنوان مثال، مطالعه Kim و همکارانش (۲۰۰۷) بر روی ۱۴۷ بیمار مبتلا به بیماری عروق کرونر با استفاده از تکنیک RFLP به منظور تعیین ژنوتیپ بیماران حاکی از عدم وجود ارتباط میان eNOS G894T و خطر ابتلا به بیماری عروق کرونر بود(۲۷). سایر مطالعات وجود ارتباط میان این پلی‌مورفیسم و خطر ابتلا به بیماری عروق کرونر را نشان می‌دهند. برای مثال، Colombo و همکارانش (۲۰۰۳) با مطالعه روی ۴۱۵ بیماری که تحت آنژیوگرافی قرار گرفته بودند و با استفاده از روش PCR نشان دادند که پلی‌مورفیسم‌های G894T و T786C– ژن eNOS می‌توانند شانس ابتلا به

بیماری عروق کرونر در جمعیت ایتالیایی را به میزان چشمگیری افزایش دهند (OR =۲/۵ ،p <۰/۰۱) (۲۸).

هم‌چنین مطالعه سلیمی و همکاران (۲۰۱۲) روی روی ۲۴۱ بیمار مبتلا به بیماری عروق کرونر دارای آنژیوگرام کرونری مثبت نشان داد که غلظت‌های NO_x در افراد مبتلا به بیماری عروق کرونر به میزان قابل توجهی بالاتر از افراد گروه کنترل می‌باشد. هم‌چنین در مطالعه سلیمی و همکاران، غلظت‌های پلاسمایی NO در ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم T786C- در جمعیت کل به میزان چمشگیری متفاوت بود. در مطالعه فوق غلظت‌های NO پلاسمایی در افراد هموزیگوت برای آلل C در گروه بیماران و در گروه کنترل (در جمعیت کلی) به میزان قابل توجهی بالاتر بود(۳۰).

مشابه مطالعات اخیر، در این مطالعه نیز ارتباط معنی‌داری میان حاملین آلل C و بروز بیماری عروق کرونر در جمعیت ایرانی مشاهده گردید. بر مبنای این نتایج، حضور آلل C شانس ابتلا به بیماری عروق کرونر را به میزان ۱/۶۷ برابر در افراد حامل این آلل افزایش می‌دهد. چنین ارتباطی با در نظرگیری نقش eNOS قابل پیش‌بینی بود. این ارتباط معنی‌دار، آلل C را به عنوان یک فاکتور خطر در بروز بیماری عروق کرونر پیشنهاد می‌کند (OR =۱/۶۷ ،p =۰/۰۴۱). فرکانس SNPهای ژن eNOS در میان گروه‌های نژادی، تفاوت بین نژادی را در وازودیلاتاسیون به واسطه نیتریک اکسید مطرح می‌کند(۲۹،۳۰). عدم انطباق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با برخی مطالعات انجام شده را می‌توان به تفاوت در پیش‌زمینه‌های قومی و نژادی افراد شرکت‌کننده در این مطالعه با سایر جمعیت‌ها نسبت داد. علاوه بر این، عوامل محیطی و میانکنش میان ژن و محیط نیز می‌تواند در بروز این تفاوت‌ها موثر باشد. بروز ژنوتیپ‌های متفاوت در جمعیت‌های مختلف ممکن است با پیش‌زمینه‌های قومی و نژادی آن جمعیت مرتبط باشد. علاوه بر دو مورد فوق، فاکتورهای محیطی نیز ممکن است نقش مهمی در پاتوژنز بیماری عروق کرونر ایفا کنند. میانکنش‌های بین دو ژن نیز ممکن است به تفاوت در جمعیت‌های مختلف و یا میان افراد یک گروه نژادی کمک کند. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که وجود پلی‌مورفیسم rs2070744 ژن eNOS شانس ایجاد بیماری عروق کرونر در جمعیت بیماران ایرانی را به صورت معناداری افزایش می‌دهد. لذا پلی مورفیسم مورد مطالعه می‌تواند به عنوان یک مارکر در تشخیص زود هنگام ابتلاء به بیماری عروق کرونر و شناسایی افراد مستعد در جمعیت‌های در معرض خطر در کنار سایر پلی‌مورفیسم‌های موجود پیشنهاد شود.

از جمله محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به حجم نمونه مورد بررسی اشاره نمود. از این رو مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم rs2070744 ژن eNOS با بیماری عروق کرونر در نمونه‌های با حجم بزرگ‌تر و در جمعیت‌های گوناگون به منظور تائید یافته‌های مطالعه حاضر ضروری به نظر می‌رسد. از سوی دیگر، با توجه به اهمیت نقش تغییرات ژنتیکی این ژن در بروز بیماری عروق کرونر، بررسی سایر پلی‌مورفیسم‌های آن پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک بوده و با حمایت دانشگاه گیلان صورت گرفته است.از اساتید گرانقدر، پرسنل زحمتکش آزمایشگاه تشخیص طبی پارسه و تمام بیمارانی که در اجرای این پژوهش شرکت نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Abolhalaj M, Amoli MM, Amiri P. eNOS Gene Variant in Patients with Coronary Artery Disease. Journal of Biomarkers 2013.
2. Fauci AS, Braunwald E, Kasper D, Hauser S,

Longo D, Jameson J, et al. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2008.
3. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. Am J Epidemiol 2006; 164(10): 921-935.
4. Ragia G, Nikolaidis E, Tavridou A, Arvanitidis KI, Kanoni S, Dedoussis GV, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms-786T> C and 894G> T in coronary artery bypass graft surgery patients. Hum Genomics 2010; 4(6): 375-383.
5. Hixson JE. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Arterioscler Thromb 1991; 11(5): 1237-1244.
6. Mendis S, Puska P, and Norrving B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. WHO; World Heart Federation; World Stroke Organization. 2011.
7. Syed R, Biyabani MU, Prasad S, Deeba F, Jamil K. Correlation and Identification of Variable number of Tandem repeats of eNOS Gene in Coronary artery disease (CAD). Saudi J Biol Sci 2010; 17(3): 209-213.
8. Khosravi A, Rao C, Naghavi M, Taylor R, Jafari N, Lopez AD. Impact of misclassification on measures of cardiovascular disease mortality in the Islamic Republic of Iran: a cross-sectional study. Bull World Health Organ 2008; 86(9): 688-696.
9. Libby P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. American J Cardiol 2003; 91(3A): 3A-6A.
10. Agarwal DP. Genetic predisposition to cardiovascular diseases. Int J Hum Genet 2001; 1(4): 233-241.
11. Nanni L, Romualdi C, Maseri A, and Lanfranchi G. Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases. J Mol Cell Cardiol 2006; 41(6): 934-948.
12. Peden JF, Farrall M. Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. Hum Mol Genet 2011; 20(R2): R198-R205.
13. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988; 333(6174): 664-666.
14. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. J Biol Chem 1993; 268(23): 17478-17488.
15. Rai H, Parveen F, Kumar S, Kapoor A, Sinha N. Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms with Coronary Artery Disease: An Updated Meta-Analysis and Systematic Review. PLoS One 2014; 9(11): e113363.
16. Wu H, Jin Y, Arias J, Bassuk J, Uryash A, Kurlansky P, et al. In vivo upregulation of nitric oxide synthases in healthy rats. Nitric Oxide 2009; 21(1): 63-68.
17. Ben Ali M, Messaoudi S, Ezzine H, Mahjoub T. Contribution of eNOS Variants to the Genetic Susceptibility of Coronary Artery Disease in a Tunisian Population. Genet Test Mol Biomarkers 2015; 19(4): 203-208.
18. Stangl K, Cascorbi I, Laule M, Klein T, Stangl V, Rost S, et al. High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. Pharmacogenetics 2000; 10(2): 133-140.

19. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786--> C and missense Glu298Asp variants. J Investig Med 2000; 48(5): 367-374.
20. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. Human Genet 1998; 103(1): 65-69.
21. Nishevitha NS, Angeline T, Jeyaraj N. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) Glu298→Asp polymorphism (G894T) among south Indians. Indian J Med Res 2009; 129(1): 68-71.
22. Stehbens WE. The epidemiological relationship of hypercholesterolemia, hypertension, diabetes mellitus and obesity to coronary heart disease and atherogenesis. J Clin Epidemiol 1990; 43(8): 733-741.
23. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease meta-Analysis of 26 studies involving 23028 subjects. Circulation 2004; 109(11): 1359-1365.
24. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Miyamoto Y. T− 786→ C mutation in the 5′-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. Circulation 1999; 99(22): 2864-2870.
25. Salimi S, Naghavi A, Firoozrai M, Zand H, Tavilani H, Nakhaee A, et al. Association of plasma nitric oxide concentration and endothelial nitric oxide synthase T-786C gene polymorphism in coronary artery disease. Pathophysiology 2012; 19(3): 157-162.
26. Silva PS, Lacchini R, Gomes VdA, Tanus-Santos JE. Pharmacogenetic implications of the eNOS polymorphisms for cardiovascular action drugs. Arq Bras Cardiol 2011; 96(2): e27-e34.
27. Kim HS, Bae S-C, Kim T-H, Kim S-Y. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus. Int Orthop 2013; 37(11): 2289-2296.
28. Colombo MG, Paradossi U, Andreassi MG, Botto N, Manfredi S, Masetti S, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. Clin Chem 2003; 49(3): 389-395.
29. Benjamin IJ, Arnett DK, Loscalzo J. Discovering the Full Spectrum of Cardiovascular Disease Minority Health Summit 2003: Report of the Basic Science Writing Group. Circulation 2005; 111(10): e120-e123.
30. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. Pharmacogenetics 2001; 11(8): 719-725.