

Original Article

A comparative study of *hsa-miR-15* gene expression changes in myocardial infarction patients with healthy individuals in Shahid Madani Hospital of Tabriz

Eslam Shiri¹, Saeid Ghorbian*²

Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
*Corresponding author; E-mail: ghorbian20@yahoo.com, s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir

Received: 12 May 2018 Accepted: 24 June 2018 First Published online: 26 Feb 2020
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 April- May; 42(1):73-81

Abstract

Background: miRNA is one of those biomarkers that have different types. *Hsa-miR-15* is one of the molecules, which expressed in the heart tissue. MiRNAs are small non-coding RNA that regulates complex cardiac signaling and transcription pathways in cardiac during different condition. The aim of this study was to compare *hsa-miR-15* gene expression changes in myocardial infarction patients with healthy individuals.

Methods: In this case-control study, which was included 88 patients with myocardial infarction and 19 healthy individuals who had been referred to the Shahid Madani hospital of Tabriz. After total RNA extraction and cDNA synthesis, the *hsa-miR-15* gene expression changes were assessed using Real-time PCR method. For data analysis, we have used independent t-test.

Results: The *hsa-miR-15* gene expression changes increased in the patients with myocardial infarction compared to healthy individuals. The level of *hsa-miR-15* gene expression was shown a statistically significant difference between groups ($p < 0/05$).

Conclusion: The *hsa-miR-15* gene expression increased in the patient with myocardial infarction and may be used as a biomarker in early diagnosis of myocardial infarction.

Keyword: Myocardial Infarction, miRNA, *hsa-miR-15*, Tabriz

How to cite this article: Shiri E, Ghorbian S. [A comparative study of *hsa-miR-15* gene expression changes in myocardial infarction patients with healthy individuals in Shahid Madani Hospital of Tabriz]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 April- May; 42(1):73-81. Persian.

مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه ای میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* در بیماران مبتلا به سکته قلبی با افراد سالم در بیمارستان شهید مدنی تبریز

اسلام شیری^{ID}، سعید قربیان^{ID}

گروه آموزشی ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
* نویسنده مسوول: ایمیل: s_ghorbian@iau-ahar.ac.ir, ghorbian20@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۱۲/۷
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹؛ ۴۲(۱): ۷۳-۸۱

چکیده

زمینه: miRNA ها یکی از انواع بیومارکرها به شمار می‌روند که انواع مختلفی دارند. *Hsa-miR-15* یکی از مولکول‌هایی است که در بافت قلبی بیان می‌شود. این مولکول‌های RNA کوچک غیر کد کننده، در تنظیم مسیرهای پیچیده پیام‌رسان و رونویسی در شرایط مختلف قلبی نقش مهمی بر عهده دارند. هدف از این مطالعه، بررسی مقایسه ای میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* در بیماران مبتلا به سکته قلبی با افراد سالم بود.

روش کار: این مطالعه مورد-شاهدی، بر روی ۸۸ فرد مبتلا به سکته قلبی و ۱۹ فرد سالم مراجعه کننده به بیمارستان شهید مدنی تبریز انجام شد. بعد از استخراج RNA تام و سنتز cDNA، از نظر تغییرات میزان بیان ژن *hsa-miR-15* بین دو گروه با تکنیک Real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری t مستقل استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* در بیماران مبتلا به سکته قلبی در مقایسه با افراد سالم افزایش یافته است. از لحاظ آماری تغییرات در سطح بیان ژن *hsa-miR-15* اختلاف معنی داری را بین دو گروه نشان داد ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: بررسی ما نشان داد که میزان بیان ژن *hsa-miR-15* در مبتلایان به سکته قلبی افزایش می‌یابد و ممکن است به عنوان یک بیومارکر در تشخیص زود هنگام سکته قلبی کاربرد داشته باشد.

کلید واژه‌ها: سکته قلبی، میکرو RNA، *hsa-miR-15* تبریز

نحوه استناد به این مقاله: شیری، ا.، قربیان، س. بررسی مقایسه ای میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* در بیماران مبتلا به سکته قلبی با افراد سالم در بیمارستان شهید مدنی تبریز. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۱): ۷۳-۸۱

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

کروموزوم q14۱۳ قرار گرفته است. در مطالعات پیشین، hsa-miR-15 را جزء گروهی از miRها می‌دانند، طبقه بندی شده بود (۱۰). اخیراً، بی‌نظمی در میزان بیان سطح سرمی hsa-miR-15 در بیماران مبتلا به سکته قلبی گزارش شده است (۱۱). در این یافته‌ها پیشنهاد شده است که این مولکول می‌تواند بالقوه به عنوان بیومارکری در تشخیص و پیش‌آگهی از سکته قلبی استفاده شود. از طرفی نتایج این بررسی‌ها نشان داده است که با مهار بیان ژن hsa-miR-15 نقش محافظتی در برابر خطر سکته قلبی ایجاد می‌کند (۱۰). با این حال، اهمیت عملکرد این miR، مکانیسم مولکولی و کاربردهای درمانی احتمالی آن در بیماران مبتلا به سکته قلبی به طور دقیق بررسی نشده است و نیازمند تحقیقات بیشتری در این زمینه است. با توجه به اینکه چنین مطالعاتی پیشینه تحقیقاتی در مبتلایان به سکته قلبی در ایران را ندارند، لذا هدف از این مطالعه، مقایسه میزان تغییرات بیان ژن hsa-miR-15 در بیماران مبتلا به سکته قلبی با افراد سالم در مراجعه‌کنندگان به بیمارستان شهید مدنی شهر تبریز و مقایسه سطح مارکرهای بیوشیمیایی شامل CK-MB، CPK، PT و PTT سرمی در افراد مورد بررسی بود.

روش کار

این مطالعه که در قالب یک بررسی مورد-شاهدی بر روی ۱۰۷ زن و مرد مبتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی با عارضه سکته قلبی (۸۸ فرد دچار سکته قلبی و ۱۹ فرد سالم) با تشخیص بالینی پزشک متخصص بستری در بیمارستان شهید مدنی تبریز در طی دوره شش‌ماهه از مرداد تا دی‌ماه ۱۳۹۵ و در محدوده سنی ۲۵-۸۵ سال، بودند مورد ارزیابی قرار گرفتند. حجم نمونه با استفاده از فرمول مقایسه نسبت‌ها (سطح معنی داری $\alpha > 0.05$ و توان آزمون $1-\beta = 0.80$) ۱۰۷ نفر محاسبه شد.

$$n = \frac{\left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta}\right)^2 [(P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2))]}{(d)^2}$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\beta = 20\%$$

$$N = 107.2 \# 107$$

$$n = \frac{\left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta}\right)^2 \times 2[\bar{p}(1-\bar{p})]}{d^2}$$

$$n = \frac{\left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta}\right)^2 \times 2[\bar{p}(1-\bar{p})]}{d^2}$$

بیماری‌های قلبی-عروقی علت اصلی مرگ و میر در سراسر جهان به شمار می‌روند به طوری که عامل اصلی تقریباً ۳۰ درصد از مرگ و میر جهانی را تشکیل می‌دهند (۱). در اثر اختلال در فرآیندهای اکسیژن رسانی و مواد غذایی به عضله قلب و کاردیومیوسیت که در اثر گرفتگی در عروق کرونری قلبی (CAD) ایجاد می‌شود، سکته قلبی و کاردیومیوپاتی ایسکمیک رخ می‌دهد. اصلی‌ترین علل سکته قلبی، آترواسکلروزیس و التهاب لایه اندوتلیال عروق کرونری است (۲). ناحیه شاخص درگیر در این فرآیند، زیر لایه اندوکاردیال بطن چپ قرار دارد که به دنبال مرگ میوسیت‌ها و آسیب‌های در این ناحیه، توانایی انتقال جریان الکتریکی و انقباض بطن چپ قلب مختل می‌گردد. به منظور بازسازی بافت و توانایی قلب، میوفیبروبلاست‌ها تکثیر و به ناحیه ضایعه مهاجرت می‌کنند که در نتیجه ترشح ماتریکس خارج سلولی، مانع از تخریب بطن می‌شوند (۳). به طور معمول، تست‌هایی که برای تشخیص سکته قلبی مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل، اندازه‌گیری سطح آنزیم‌های کراتین فسفوکیناز، کراتین کیناز نوع MB، تست‌های انعقادی PT و PTT است. امروزه، روش‌های درمانی تهاجمی و غیرتهاجمی بسیاری مانند تغییر شیوه زندگی، جراحی‌های قلب باز، آنژیوپلاستی، کاشت فنر، راهبردهای دارویی و گاهی از طریق پیوند قلب جهت درمان اختلالات قلبی و عروقی بکار گرفته می‌شوند (۴، ۵). در سال ۱۹۹۰ مولکول‌های RNA غیر رمز کننده کوچک (Small non-coding RNA) با طول تقریبی ۲۴-۱۸ نوکلئوتید شناسایی شدند که بیان ژن‌ها را با تخریب مولکول mRNA هدف و یا مهار آغاز فرآیند ترجمه عملکرد تنظیمی خود را در مرحله بعد از ترجمه (Post-Transcriptional) انجام می‌دهند. تاکنون بیش از ۲۵۰۰ نوع miRNA شناسایی شده‌اند که در تنظیم مکانیسم‌های سلولی، سیگنال‌های مولکولی و مسیرهای ژنی نقش تنظیم کننده دارند (۶). اکثر miRNAها در سلول‌ها و اندام‌های حیاتی بدن شناسایی شده‌اند. نقش مولکول‌های miRNA در فرآیندهای سلولی به ویژه در سیستم قلبی و عروقی مشخص شده است. در انواع سلول‌های قلبی، miRNA های متعددی وجود دارند که اختصاصی سلول‌های قلب نیستند (۷). مولکول hsa-miR-15 یکی از miRNAهایی است که در بیماری‌های قلبی و عروقی در پاسخ به سکته قلبی، در شرایط ایسکمیک قلبی حاد، در بیماران با جراحی قلب باز و در پاسخ به آپوئوتوز سلولی در میوسیت‌ها میزان بیان آن تغییرات زیادی را نشان می‌دهد (۸، ۹). Hsa-miR-15 یکی از مولکول‌های بسیار حفاظت‌شده از خانواده miRs به شمار می‌رود که از نظر جایگاه سیتوژنتیکی بر روی

نمونه ها به روش تصادفی ساده پس از تایید بیماری و در صورتی که واجد شرایط ورود به مطالعه بودند، انتخاب شدند. از تمامی شرکت کنندگان پس از توضیح کامل مطالعه، رضایت نامه کتبی گرفته اخذ شد. داده های برگرفته از گزارش نوار قلب، نتایج آزمایشگاهی و اکوکاردیوگرافی بیماران بود. معیارهای ورود به مطالعه شامل مبتلایان بستری در بیمارستان های فوق تخصص قلب شهید مدنی تبریز با تشخیص بالینی پزشک متخصص، در محدوده سنی ۳۰ الی ۶۰ و فقدان سابقه ابتلا به بیماری های مزمن دیگر بودند. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: بارداری، شیردهی، قاعدگی نامرتب، استعمال مزمن دخانیات (روزی ۳ عدد بیشتر از ۴۸ ماه) یا مصرف مشروبات الکلی، مصرف داروهای مانند تاموکسیفن، رالوکسیفن، تیبولون، درمان های جایگزین هورمونی در دو سال گذشته، مصرف مکمل های پروتئینی، فیتواستروژن ها، فولات و ویتامین ب۱۲ در فاصله زمانی ۱ ماه پیش از تشخیص بیماری، مصرف داروهای نظیر متوترکسات، سولفاسالازین، متفرمین، سیکلوزپورین، تیوفیلین، دیورتیکها، ضد تشنج و ضد بارداری در طول ۲ سال پیش از تشخیص، ابتلا به دیابت نوع ۱ با عارضه هیپرفیلتراسیون گلومرولار، بیماران کلیوی، هیپرتیروئیدیسم، داشتن التهاب مزمن (نظیر روماتیسم مفصلی، مالتیپل اسکلروزیس، التهاب پوستی و غیره) و انواع خوش خیم توده پستانی، پیروی از الگوی غذایی خاص مانند رژیم غذایی گیاه خواری، داشتن تاریخچه هر گونه بیماری تغییرات فیبروکیستیک، فیروآدنوما، آبسه های پستانی، التهاب مجاری و نکروز بافت چربی. در طی فاصله زمانی کمتر از ۱۰ ساعت بعد از تشخیص سکنه قلبی، به میزان ۲ میلی لیتر نمونه خون محیطی در ویال هایی که به صورت کد اختصاری و به صورت کاملاً محرمانه و با حفظ موازین اخلاقی شماره گذاری شده بودند دریافت و جهت بررسی سطح تغییرات میزان بیان ژن *hsa-miR-15* سرم آن ها جداسازی و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش های نگهداری شدند. علاوه بر این، از تمامی بیماران قبل از هرگونه مداخلات دارویی و آنژیوگرافی، آزمایش ها روتین بیوشیمی بخصوص CK-Mb، آزمایش های PT و PTT انجام شده بود. استخراج RNA تام با محلول Qiazol طبق پروتکل شرکت سازنده کیت انجام شد. به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific، آمریکا) و ژل الکتروفورز ۱٪ آگارز استفاده شد. سپس، RNA های استخراج شده تا قبل از سنتز cDNA در دمای ۷۰- سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور سنتز cDNA از کیت miScript II

نمونه ها به روش تصادفی ساده پس از تایید بیماری و در صورتی که واجد شرایط ورود به مطالعه بودند، انتخاب شدند. از تمامی شرکت کنندگان پس از توضیح کامل مطالعه، رضایت نامه کتبی گرفته اخذ شد. داده های برگرفته از گزارش نوار قلب، نتایج آزمایشگاهی و اکوکاردیوگرافی بیماران بود. معیارهای ورود به مطالعه شامل مبتلایان بستری در بیمارستان های فوق تخصص قلب شهید مدنی تبریز با تشخیص بالینی پزشک متخصص، در محدوده سنی ۳۰ الی ۶۰ و فقدان سابقه ابتلا به بیماری های مزمن دیگر بودند. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: بارداری، شیردهی، قاعدگی نامرتب، استعمال مزمن دخانیات (روزی ۳ عدد بیشتر از ۴۸ ماه) یا مصرف مشروبات الکلی، مصرف داروهای مانند تاموکسیفن، رالوکسیفن، تیبولون، درمان های جایگزین هورمونی در دو سال گذشته، مصرف مکمل های پروتئینی، فیتواستروژن ها، فولات و ویتامین ب۱۲ در فاصله زمانی ۱ ماه پیش از تشخیص بیماری، مصرف داروهای نظیر متوترکسات، سولفاسالازین، متفرمین، سیکلوزپورین، تیوفیلین، دیورتیکها، ضد تشنج و ضد بارداری در طول ۲ سال پیش از تشخیص، ابتلا به دیابت نوع ۱ با عارضه هیپرفیلتراسیون گلومرولار، بیماران کلیوی، هیپرتیروئیدیسم، داشتن التهاب مزمن (نظیر روماتیسم مفصلی، مالتیپل اسکلروزیس، التهاب پوستی و غیره) و انواع خوش خیم توده پستانی، پیروی از الگوی غذایی خاص مانند رژیم غذایی گیاه خواری، داشتن تاریخچه هر گونه بیماری تغییرات فیبروکیستیک، فیروآدنوما، آبسه های پستانی، التهاب مجاری و نکروز بافت چربی. در طی فاصله زمانی کمتر از ۱۰ ساعت بعد از تشخیص سکنه قلبی، به میزان ۲ میلی لیتر نمونه خون محیطی در ویال هایی که به صورت کد اختصاری و به صورت کاملاً محرمانه و با حفظ موازین اخلاقی شماره گذاری شده بودند دریافت و جهت بررسی سطح تغییرات میزان بیان ژن *hsa-miR-15* سرم آن ها جداسازی و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش های نگهداری شدند. علاوه بر این، از تمامی بیماران قبل از هرگونه مداخلات دارویی و آنژیوگرافی، آزمایش ها روتین بیوشیمی بخصوص CK-Mb، آزمایش های PT و PTT انجام شده بود. استخراج RNA تام با محلول Qiazol طبق پروتکل شرکت سازنده کیت انجام شد. به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific، آمریکا) و ژل الکتروفورز ۱٪ آگارز استفاده شد. سپس، RNA های استخراج شده تا قبل از سنتز cDNA در دمای ۷۰- سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور سنتز cDNA از کیت miScript II

جدول ۱: اجزاء و مقادیر حجمی مواد به منظور سنتز cDNA

| اجزاء واکنش | حجم |
|---|--------------|
| miScript HiSpec 5x بافر | ۴ میکرولیتر |
| miScript 10x مخلوط نوکلئوتیدها | ۲ میکرولیتر |
| RNase آب عاری از آنزیم | ۱۵ میکرولیتر |
| miScript مخلوط آنزیم رونوشت بردار معکوس | ۲ میکرولیتر |
| الگو RNA | ۳ میکرولیتر |
| حجم کل | ۲۵ میکرولیتر |

به منظور ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* از آغازگرهای اختصاصی miRNA و مخلوط واکنش در دستگاه Rottor Gene Q (Qiagen, USA) به صورت سه تایی (Triplicate) انجام شد. در این واکنش از ژن *U6* به عنوان ژن خانه پای (House Keeping Gene) در جهت نرمالیزه بیان ژن استفاده شد. سپس برای بررسی میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* مقادیر cDNA ها به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شدند. به دنبال آن، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، واکنش Real-Time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرو لیتر تهیه شد. اجزای مخلوط واکنش از ۵ میکرو لیتر Master Mix سایبر گرین، ۲ میکرو لیتر cDNA، ۰/۵ میکرو لیتر از هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن های *hsa-miR-15* و *U6* و ۱ میکرو لیتر آب مقطر تشکیل شده بود. بعد از آماده سازی محلول ها، مطابق با شرایط دمایی و زمانی به ترتیب، در واسرشت سازی اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، و در ۴۵ سیکل متوالی متشکل از، واسرشت سازی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال و تکثیر در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اقدام به بررسی میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* شد. سپس با استفاده از فرمول $\Delta\Delta CT$ میزان تغییرات بیان ژن محاسبه گردید. به منظور حصول اطمینان از سنتز cDNA ها قبل از انجام واکنش Real-Time PCR، با آغازگرهای ژن خانه پای *U6* اقدام به انجام PCR معمولی شد. علاوه بر این، بعد از واکنش Real-Time PCR به منظور تایید اختصاصیت واکنش، محصولات تکثیری بر روی ژل آگارز ۱٪ ران شدند که در تمامی نمونه ها تک باند اختصاصی مشاهده شد.

U6 و *miR-15* کارایی واکنش تکثیر را تقریباً ۱۰۰ درصد ($\text{Efficiency} = 101\%$) نشان داده بود (شکل ۱). منحنی ذوب حاصل از واکنش به صورت یک قله ای به دست آمد که اختصاصیت واکنش تکثیری را نشان می دهد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل از واکنش *Real-Time PCR* نشان داد که تغییرات سطح سرمی میزان بیان ژن *hsa-miR-15* در بیماران مبتلا به سکته قلبی نسبت به افراد سالم اختلاف معناداری دارد ($p < 0.05$) بدین صورت که میزان بیان این ژن در سرم افراد بیمار افزایش ۳ برابری را نشان داده است (نمودار ۱). علاوه بر این، سطح سرمی میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* را بر اساس شاخص توده بدنی *BMI* در بین ۷۷ فرد بیمار با *BMI* کمتر از ۳۰ ($\text{BMI} < 30$)، در ۱۱ فرد بیمار با *BMI* بالای ۳۰ ($\text{BMI} > 30$) و ۱۹ فرد سالم اندازه گیری و نشان داده شد که میزان بیان در افراد بیمار با *BMI* کمتر از ۳۰ را نسبت به دو گروه دیگر، بیشترین میزان را داشته است (جدول ۲). تمامی افراد مورد بررسی از نظر فاکتورهای بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفته بودند (جدول ۳).

$\Delta\text{CT} = \text{ct}(\text{Target}) - \text{ct}(\text{Control})$ (گروه بیمار)

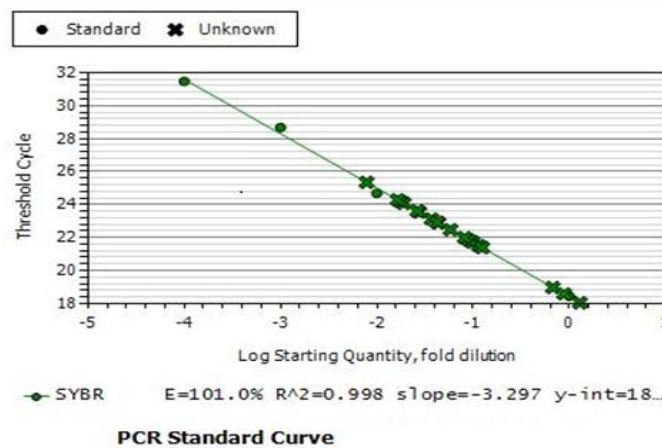
$\Delta\text{CT} = \text{ct}(\text{Target}) - \text{ct}(\text{Control})$ (گروه سالم)

$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}(\text{بیمار}) - \Delta\text{CT}(\text{گروه سالم})$

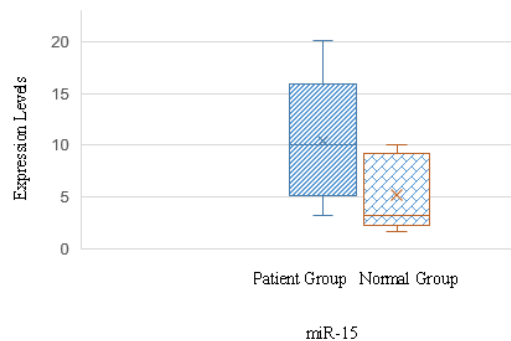
بعد از محاسبه ΔCT برای ژن ها در هر یک از دو گروه، مقادیر در فرمول $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ در هر دو گروه وارد شد تا بعد از تعیین میزان بیان دقیق ژن در هر نمونه، نتایج حاصل در دو گروه با یکدیگر از نظر آماری مقایسه شدند. کلیه داده ها بر اساس نرم افزار SPSS Version ۲۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. در تحلیل داده ها از روش آماری *t* مستقل استفاده شد. برای تمامی موارد مقدار *P* محاسبه و سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد ($p < 0.05$).

یافته ها

در بررسی حاضر، بررسی میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* با روش کمی *Real-Time PCR* با استفاده از رنگ سایر گرین انجام شد. نمودار استاندارد برای ژن های *hsa-*



شکل ۱- منحنی استاندارد ژن *hsa-miR-15*



نمودار ۱- میزان تغییرات سطح بیان *hsa-miR-15* در سرم بیماران دچار سکته قلبی در مقایسه با افراد سالم.

جدول ۲: بررسی الگوی تغییرات میزان بیان ژن *hsa-miR-15* بین گروه های سالم و بیمار با $\text{BMI} > 30$ و $\text{BMI} < 30$

| مقدار P | گروه سالم (تعداد=۱۹ نفر) | گروه بیمار BMI>30 (تعداد=۱۱ نفر) | گروه بیمار BMI<30 (تعداد=۷۷ نفر) | گروه ها |
|--|---|--|---|---------------------------------|
| ۰/۰۵< | ۰/۳±۷/۷ | ۰/۳±۱۹/۶ | ۰/۹±۲۰/۳ | میزان بیان ژن <i>hsa-miR-15</i> |
| جدول-۳. مقایسه میانگین پارامترهای بیوشیمیایی در افراد گروه بیمار و گروه سالم | | | | |
| P مقدار | میانگین و معیار انحراف در گروه بیمار | میانگین و انحراف معیار در گروه سالم | پارامترهای بالینی | |
| NS | ۹/۶±۵۹ | ۲/۲±۳۹ | سن | |
| NS | ۵۸/۱۴ | ۱۵/۷ | جنسیت (زن/مرد) | |
| ۰/۰۱P< | ۳/۰۸±۵۸/۱ | ۱/۳±۲۴/۵ | BMI (kg/m ²) شاخص توده بدنی | |
| ۰/۰۱P< | ۱۱ | ۴ | BMI>30 شاخص توده بدنی | |
| ۰/۰۰۵P< | ۱۴/۸۳±۴۸/۸۹ | ۳/۸±۲۹/۷ | PTT (ثانیه) زمان | |
| ۰/۰۰۵P< | ۷/۶±۱۳/۴ | ۱/۵±۱۳ | PT (ثانیه) زمان | |
| ۰/۰۵P< | ۱۸۶±۶۹۲/۲۵ | ۵۴±۲۳۰ | CPK (U/L) آنزیم کراتین فسفو کیناز | |
| ۰/۰۵P< | ۲۲±۱۰۹/۸۲ | ۸±۳۸/۶۶ | CK-MB (U/L) آنزیم کراتین کیناز | |

* سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵

بحث

بیان ژن *hsa-miR-15* که یک مولکول RNA غیر رمز کننده کوچک مترشح در سرم بیماران مبتلا به سکت قلبی است، مورد نظر است. به طور معمول از آزمایش کراتین کیناز نوع MB که در سلول‌های عضله قلب تا حدودی اختصاصی است، برای تشخیص سکت قلبی استفاده می‌شود. در مواردی که سلول‌های قلب دچار نکروز شوند (در اثر کمبود اکسیژن)، سطح این آنزیم در جریان خون افزایش می‌یابد. این آنزیم در مواردی همچون داشتن سابقه تزیقات عضلانی، رابدومیولیز، فعالیت‌های سنگین بدنی و بیماران دارای مشکلات کبدی نیز افزایش می‌یابد. در غیاب این موارد، افزایش سطح سرمی CKMB و بالا بودن آن در کمتر از ۴۸ ساعت می‌تواند در تشخیص سکت قلبی مفید واقع شود (۱۷). در سال‌های اخیر با یافتن مسیرهای پیام‌رسان، مولکولی‌های RNA فراوانی شناسایی شده اند که تا به کمک آنها تشخیص اختلالات سریع‌تر از قبل که بر پایه سنجش پروتئین‌ها و سطح آنزیم‌ها متمرکز بود، میسر گردد. در واقع، miRNA ها شامل گروهی از RNA های کوچک غیر رمز کننده هستند که به عنوان کلید مولکولی در تنظیم بیان ژن‌ها فعالیت دارند و به عنوان تنظیم‌کننده های مسیر پیام رسان پیچیده قلبی در زمان سلامت یا بیماری قلب شناخته می‌شوند (۱۸). این مولکول‌ها بیان ژن‌های هدف خود را با تخریب، مهار ترجمه و یا القای ترجمه mRNA های هدفشان تنظیم می‌کند (۱۹). Hullinger و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای تحت عنوان " مهار *miR-15* عامل حفاظت کننده در برابر آسیب‌های وارده در اثر

سکت قلبی، عامل عمده مرگ و میر در جهان به شمار می‌رود. عوامل خطر متعددی برای ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی از جمله سن، چاقی، سبک زندگی، کلسترول تام، تغذیه ناسالم و فشارخون بالا گزارش شده است (۱۳). آسیب به بافت قلبی ناشی از سکت قلبی منجر به افزایش ناتوانی قلبی می‌شود. بنابراین، توسعه روش‌های درمانی که باعث القاء بازسازی بافتی و پیشگیری از تخریب بافت قلبی بعد از فرآیند سکت می‌شود، از لحاظ بالینی بسیار حائز اهمیت است (۱۴). امروزه روش‌های درمانی بسیاری مانند تغییر شیوه زندگی، جراحی‌های قلب باز، آنژیوپلاستی و کاشت فنر، نمایش دارویی و در موارد خاصی پیوند قلب برای درمان بیماری‌های قلبی و عروقی بکار گرفته می‌شود (۱۵). در انواع مختلفی از سلول‌ها، miRNA های متنوعی وجود دارند که از جمله miRNA بیانی در قلب *hsa-miR-15* است که در بیماران مبتلا به سکت قلبی میزان بیان آن افزایش نشان داده است (۱۰). در این مطالعه، میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* که به‌عنوان یکی از تنظیم‌کنندگان اصلی در مسیر تمایز سلول‌های MSC (Mesenchymal Stem Cell) به سلول‌های قلبی در بیماران قبل و بعد از عمل جراحی قلب نقش دارد، مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور کلی، اگرچه بیماری‌های قلبی با گرفتن سوابق پزشکی، معاینه قلبی و ارزیابی‌های بیشتر از جمله آزمایش‌های خونی، اکوکاردیوگرام، نوار قلبی و تصویربرداری تشخیص داده می‌شوند (۱۶) ولی در این مطالعه، اساس و پایه تشخیص، بر مبنای میزان تغییرات سطح

سطح مولکول‌های *Bcl-2 mRNA* داشته باشد. پیامد حاصل از این تأثیر، مهار آزادسازی سیتوکروم c میتوکندریایی و کاهش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ خواهد بود. این احتمال وجود دارد که مولکول *miR-15b* نقش تنظیمی فرادستی را در مسیر انتقال پیام در میتوکندری در طی آپوپتوز القاء شده به واسطه کمبود اکسیژن داشته باشند (۲۲). به طور کلی نتایج حاصل از بررسی‌های متعدد نشان داده است که *hsa-miR-15* به عنوان مهارکننده تکثیر کاردیومیست‌ها عمل می‌کند و در القاء آپوپتوزی سلول‌های قلبی نقش مهمی دارد. نتیجه بررسی انجام شده در این تحقیق نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن *hsa-miR-15* در بین افراد گروه‌های بیمار و سالم وجود داشت و شاید بتوان عنوان کرد که بررسی میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* به‌عنوان یک بیومارکر در تشخیص و پیش‌آگهی در افراد مبتلا به سکته قلبی کاربرد داشته باشد. لازم به ذکر است که در جهت تأیید این چنین یافته‌هایی به انجام مطالعات بیشتر و با اندازه جامعه آماری بزرگ‌تر نیاز خواهد بود و نمی‌توان با نتایج گزارش‌های چند بررسی محدود در جمعیت‌های خاص این مولکول را به‌عنوان بیومارکر تشخیصی و پیش‌آگهی دهنده مطرح کرد.

نتیجه‌گیری

بیماری‌های قلبی مهم‌ترین عامل مرگ و میر در جهان است. و هزینه‌های بالای درمان در کنار سختی و خطرناک بودن بیماری‌های قلبی نگران‌کننده است. به طوری که همه روش‌های درمانی بیماری‌های قلبی دارای اهمیت هستند. یکی از این روش‌ها استفاده از فاکتورهای بیوشیمیایی و بیومارکرهای اسید نوکلئیکی نظیر *miRNA*ها است. از انواع *miRNA*ها، *hsa-miR-15* یکی از این مولکول‌ها است که در بافت قلبی بیان می‌شود که میزان تغییرات بیان آن در بافت آسیب دیده قلبی افزایش نشان داده است. بنابراین شاید بتوان به‌عنوان یک بیومارکر در تشخیص سکته قلبی مورد توجه قرار داد.

قدردانی

مقاله برگرفته از پایان نامه با شماره ۹۴۲۰۱۳ است که هزینه اجرای آن توسط دانشجو تأمین شده است. این تحقیق با مساعدت کارکنان محترم و آزمایشگاه بیمارستان شهید مدنی تبریز انجام گرفت که بدین وسیله از کلیه افرادی که در این مطالعه شرکت کردند و ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

ایسکمی قلبی" که بر روی بافت خوکی مورد ارزیابی قرار داده بودند، نشان دادند که با استفاده از مهارکننده‌های اسید نوکلئیکی، می‌توان بیان *hsa-miR-15* را مهار و تا حد زیادی از آسیب وارده به بافت قلبی و ایجاد سکته قلبی جلوگیری کرد (۱۰). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که در بیماران مبتلا به سکته قلبی سطح این *miR* در سرم‌شان افزایش قابل توجهی را نشان داده است. Liu و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای تحت عنوان "افزایش بیان *MicroRNA-15a/b* در آسیب‌های ناشی از ischemia/reperfusion" در مدل حیوانی موش نشان دادند که میزان بیان ژن‌های *miR-15* و *miR-15b* در پاسخ به آسیب‌های وارده از طریق ischemia/reperfusion به‌طور چشمگیری افزایش یافته و بنابراین ممکن است که از طریق کاهش بیان *miR-15a/b* بتوان از آسیب‌های وارده به سلول‌های قلبی در اثر فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی جلوگیری کرد (۲۰). Porrello و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای تحت عنوان "تنظیم بازسازی بافت قلبی نوزادان/بالغین از طریق خانواده *miR-15*" در مدل موشی نشان داده بودند که مهار بیان ژن‌های خانواده *hsa-miR-15* در ابتدای تولد و یا حتی تا سن بلوغ منجر به افزایش تکثیر میوسیت‌های قلبی می‌شود و از طرفی عملکرد سیستمولیک بطنی بعد از سکته قلبی بهبود پیدا می‌کند. نهایتاً به این نتیجه رسیدند که خانواده *hsa-miR-15* نقش مهمی در از دست دادن عملکرد سلول‌های بافت قلبی در طی فرآیند بازسازی ناشی از سکته قلبی خواهند داشت (۸). Liu و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای تحت عنوان "نقش آپوپتوزی و ضد رگ‌زایی *miR-106b* و *miR-15b* در مبتلایان به سکته قلبی" که با مبنی بر روش‌های بیوانفورماتیک به منظور درک بهتر نقش *miR*ها در فرآیند سکته قلبی انجام شده بود، نشان داده بودند که از بین هزاران مولکول *miR*، مولکول‌های *miR-106b* مانع از رگ‌زایی و *miR-15b* سلول را به سمت آپوپتوزی هدایت می‌کنند و از این طریق ممکن است که این دو مولکول نقش بسیار مهمی در فرآیند آسیب‌زایی برای سکته قلبی ایفا کنند (۲۱). در مطالعه دیگری که توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۴ که تحت عنوان "*miR-15b* نقش تسهیل‌کننده در فرآیند آپوپتوزی القاء شده به واسطه کمبود اکسیژن در کاردیومیست‌ها در مسیر میتوکندریایی" انجام شده بود، نشان دادند که با افزایش بیان *miR-15b* فرآیند آپوپتوزی سلولی افزایش یافته و با از دست دادن توانایی غشاء میتوکندریایی همراه شده است. این در حالی است که با کاهش بیان آن، نقش محافظت‌کنندگی برای سلول را در پی دارد. مهار بیان ژن *miR-15b* منجر به افزایش سطح پروتئین *Bcl-2* می‌شود بدون اینکه تأثیری بر روی

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز استان آذربایجان شرقی به شماره مرجع IR.TBZMED.REC.1395.1219 به تایید رسیده است.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

مؤلف اظهار می دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

س ق طراحی، اش اجرا و س ق تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشت. همچنین اش مقاله را تالیف نموده و س ق نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده است.

References

- Lopez A D, Mathers C D, Ezzati M, Jamison D T, Murray C J. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet* 2006; **367** (9524): 1747-1457. doi: 10.1016/s0140-6736(06) 68770-9
- Choi J H, Chang S A, Choi J O, Song Y B, Hahn J Y, Choi SH, et al. Frequency of myocardial infarction and its relationship to angiographic collateral flow in territories supplied by chronically occluded coronary arteries. *Circulation* 2012; **127**(6): 703-709. doi: 10.1161/circulationaha.112.092353
- Wang W, Schulze C J, Suarez-Pinzon W L, Dyck J R, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002; **106** (12): 1543-1549. doi: 10.1161/01.CIR.0000028818.33488.7B
- Mythili S, Malathi N. Diagnostic markers of acute myocardial infarction. *Biomed Rep* 2015; **3**(6): 743-748. doi: 10.3892/br.2015.500
- Sarkisian L, Saaby L, Poulsen T S, Gerke O, Jangaard N, Hosbond S, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with myocardial infarction, myocardial injury, and nonelevated troponins. *Am J Med* 2016; **129**(4): 445-446. doi: 10.1016/j.amjmed.2015.11.006
- Skommer J, Rana I, Marques F Z, Zhu W, Du Z, Charchar F J. Small molecules, big effects: the role of microRNAs in regulation of cardiomyocyte death. *Cell Death Dis* 2014; **5**(7): e1325. doi: 10.1038/cddis.2014.287
- Kränkel N, Blankenberg S, Zeller T. Early detection of myocardial infarction—microRNAs right at the time? *Ann Transl Med* 2016; **4**(24): doi: 10.21037/atm.2016.12.12
- Porrello E R, Johnson B A, Aurora A B, Simpson E, Nam Y J, Matkovich S J, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res* 2011; **109**(6): 670-679 doi: 10.1161/circresaha.111.248880
- Boon R A, Dimmeler S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol* 2015; **12**(3): 135. doi: 10.1038/nrcardio.2014.207
- Hullinger T G, Montgomery R L, Seto A G, Dickinson B A, Semus H M, Lynch J M, et al. Inhibition of miR-15 Protects Against Cardiac Ischemic Injury Novelty and Significance. *Circ Res* 2012; **110**(1): 71-81. doi: 10.1161/circresaha.111.244442
- Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(24): 15524-15529. doi: 10.1073/pnas.2426 06799
- Meyer S U, Stoecker K, Sass S, Theis F J, Pfaffl M W. Posttranscriptional regulatory networks: from expression profiling to integrative analysis of mRNA and microRNA data. *Quantitative Real-Time PCR: Springer* 2014; **5**: 165-188. doi: 10.1007/978-1-4939-0733-5_15
- Rørholm Pedersen L, Frestad D, Mide Michelsen M, Dam Mygind N, Rasmusen H, Elena Suhrs H, et al. Risk factors for myocardial infarction in women and men: a review of the current literature. *Curr Pharm Des* 2016; **22**(25): 3835-3852. doi: 10.2174/13816128226661603091153 18
- Karantalis V, Balkan W, Schulman I H, Hatzistergos K E, Hare J M. Cell-based therapy for prevention and reversal of myocardial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; **303**(3): H256-270. doi: 10.1152/ajpheart.00221.2012
- Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes M J, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2018; **39**(2): 119-177. doi: 10.1016/j.rec.2017.11.010

16. Hahn J Y, Cho H J, Kang H J, Kim T S, Kim M H, Chung J H, et al. Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2008; **51**(9): 933-943. doi: 10.1016/j.jacc.2007.11.040
17. Al-Hadi H A, Fox K A. Cardiac markers in the early diagnosis and management of patients with acute coronary syndrome. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2009; **9**(3): 231. doi: 10.1155/2013/914 748
18. Tan K S, Armugam A, Sepramaniam S, Lim K Y, Setyowati K D, Wang C W, et al. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients. *PLoS One* 2009; **4**(11): e7689. doi: 10.1371/journal.pone.0007689
19. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; **11**(9): 597. doi: 10.1038/nrg2843
20. Liu L F, Liang Z, Lv Z R, Liu X H, Bai J, Chen J, et al. MicroRNA-15a/b are up-regulated in response to myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Geriatr Cardiol* 2012; **9**(1): 28. doi: 10.3724/sp.j.1263.2012.00028
21. Liu Z, Yang D, Xie P, Ren G, Sun G, Zeng X, et al. MiR-106b and MiR-15b modulate apoptosis and angiogenesis in myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem* 2012; **29**(5-6): 851-862. doi: 10.1159/000258197
22. Lifeng L, Guoming Zh, Liang Z, Xiuhua L, Tiande L, Jiao F, et al. MicroRNA-15b enhances hypoxia/deoxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes via a mitochondrial apoptotic pathway. *Apoptosis* 2014; **19**(1): 19-29. doi: 10.1007/s10495-013-0899-2