Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 37, No. 1, Apr. – May. 2015, Pages: 54-61

Serum Levels of Antioxidant Enzymes, MDA and Its Relation to T-786C Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism in Patients with Coronary Artery Diseases (CAD)

Ali Reza Yaghoubi[1], Fatemeh Khaki Khatibi[2]*

[1]Cardiovascular Research Center, Shahid Madani Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Department of Biochemistry, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 21 Oct, 2014 Accepted: 23 Nov, 2014

Abstract

Background and Objectives: Various mutations on endothelial Nitric Oxide synthase (eNOs) gene can cause reduced production of NO and may accelerate the process of atherosclerosis. The study was designed to investigate the frequency of T-786C gene polymorphism in a group of patients suffering from CAD in North West of Iran, The association of the polymorphism with other risk factors including: Antioxidant activity indices, Lipid Peroxidation and MDA were also determined.

Material and Methods: One hundred twenty subjects including 60 patients with angiographically diagnosed CAD and 60 age and sex matched normal control were studied. Exclusion criteria were; diabetes melitus smoking, preexisting malignancies and liver disease. The activities of SOD, GPX and TAC enzymes in the blood samples were determined in both groups using Randox Kits in an automated chemical analyzer (Abbott, model Alcyon 300, USA). The concentration of MDA in the serum samples were assayed by spectrophotometerically using Thiobarbitoric acid reaction. The genotype studies were also carried out concomitantly using allele specific PCR.

Results: Erythrocyte SOD, GPX activities and blood TAC level were reduced significantly in patients with CAD ($P<0.05$ in all cases). The levels of serum MDA in CAD patients were significantly higher than controls ($P<0.05$). The significantly higher frequency of eNOs -786C genotype was detected in CAD patients that indicate the significant association of C allels with CAD.

Conclusion: The association between oxidative stress parameters and decrease Antioxidant activity may suggest their involvement in the pathogenesis of atherosclerosis. Increased frequency of T-786C polymorphism might be another risk factor in the progression of coronary artery disease.

Keywords: Oxidative Stress, Coronary Artery Disease, Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene, T-786C Polymorphism**,** Enzymatic Antioxidant

***Correspondingauthor:**
E-mail: fatemeh.khakikhatibi@yahoo.com

مقاله پژوهشی

بررسی سطوح سرمی آنزیم های آنتی اکسیدانت، مالون دی آلدئید (MDA) و ارتباط آن با پلی مورفیسم T-786C ژن NO سنتاز در بیماری عروق کرونر قلبی غیرسیگاری و غیردیابتی

علیرضا یعقوبی[۱]، فاطمه خاکی خطیبی[۲*]

[۱]مرکز تحقیقات قلبی عروقی، شهید مدنی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲]گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

دریافت: ۹۳/۷/۲۹ پذیرش: ۹۳/۹/۲

چکیده

مقدمه: موتاسیون های متعددی در ژن نیتریک اکساید سنتاز نوع اندوتلیالی (eNOS) باعث کاهش یافتن تولید نیتریک اکساید (NO) است. که می تواند سبب تشدید آترواسکلروز شود. این مطالعه بررسی فراوانی پلی مورفیسم T-786C ژن را در بیمارانی که در قسمت شمال غرب ایران از وجود CAD رنج می برند، بررسی نمود، همچنین ارتباط پلی مورفیسم با ریسک فاکتورهای CAD که شامل مارکرهای آنتی اکسیدانت، پراکسیداسیون لیپید و مالون دی آلدئید MDA می باشد، نیز تعیین شد.

مواد و روش ها: ۱۲۰ نفر شامل ۶۰ بیمار با آنژیوگرافی تشخیص داده شده از نوع CAD و ۶۰ نفر با سن و جنس همسان شده و بدون CAD به عنوان کنترل، مورد مطالعه قرار گرفتند. فاکتورهایی چون دیابت، سیگار، بدخیمی ها و بیماری کبد ملاک خروج از مطالعه بودند. فعالیت آنزیم های SOD، GPX و TAC در نمونه ها با استفاده از کیت راندوکس و با دستگاه اتوآنالایزور (Abbott, model Alcyon 300, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت MDA در نمونه های سرم با روش اسپکتروفتومتریک و بر اساس واکنش تیوباربیتوریک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعات ژنوتیپ توسط روش Allel Specific PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: فعالیت آنزیمی SOD و GPX اریتروسیت و سطوح TAC در بیماران بطور معنی داری کاهش یافته بود (P‹۰/۰۵) درکل موردها. سطوح MDA سرم در بیماران CAD در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری افزایش یافته بود (P<۰/۰۵). فراوانی ژنوتیپ 786C- ژن eNOS در گروه CAD بطور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود که نشان می دهد الل C ارتباط معنی داری با بیماری CAD دارد.

نتیجه گیری: ارتباط بین پارامترهای استرس اکسیداتیو و کمبود آنتی اکسیدانت ها ممکن است پیشنهاد کند که این عوامل در ایجاد و پیشرفت آترواسکلروزیس سهیم هستند. افزایش فراوانی پلی مورفیسم T-786C ممکن است یک ریسک فاکتور دیگری در پیشرفت بیماری عروق کرونر در بیماران مورد مطالعه باشد.

کلید واژه ها: استرس اکسیداتیو، بیماری عروق کرونری، ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی، پلی مورفیسم T-786C، آنتی اکسیدانتهای آنزیماتیکی

*ایمیل نویسنده رابط: fatemeh.khakikhatibi@yahoo.com

مقدمه

پیشگیری ازبیماری عروق کرونر وکاهش میزان مرگ ومیر ناشی ازآن در کشورهای در حال توسعه به عنوان یک مشکل اساسی مطرح است. بیماری عروق کرونردراثرآترواسکلروزیس به وجود می آید. آترواسکلروزیس منجربه گرفتگی عروق میشود و علل مختلفی دارد (۱). یکی از علت های مهم در CAD عملکرد غیرطبیعی اندوتلیال عروق کرونر است که موجب یک عده فرایندهای متوالی و توسعه پلاک میگردد. این فرایندها شامل انقباض عروقی، التهاب، اکسیداسیون، پرولیفراسیون و ترومبوز

میباشند (۲). نقش عروق کرونر رساندن خون به ماهیچه های قلب است وقتی که این عروق در شخص مبتلا به CAD منقبض بشود یک درد در ناحیه قلب ایجاد میشود(۳). همچنین ریسک فاکتورهای مربوط به CAD نیزارتباط تنگاتنگی با اختلال عملکرد اندوتلیالی دارند (۴). این ریسک فاکتورها شامل انواع رادیکالهای آزاداکسیژن، سوپراکسید، پراکسیداسیون لیپید، hs-CRP و عوامل دیگر میباشد که افزایش این رادیکالهاارتباط زیادی بااختلال در عملکرد اندوتلیالی در نوع حیوانی دارد همچنین مدارک زیادی از یک ارتباط بین استرس اکسیداتیو واختلال درعملکرداندوتلیالی درانسانها به دست آمده است (۷-۵). فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت ازقبیل سوپراکسید دیس موتاز(SOD) ، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز(GPX) در اریتروسیتها و آنتی اکسیدانتهای غیرآنزیماتیک به همراه توتال آنتی اکسیدانت (TAC) نیز نقش مهمی در CAD دارند به این صورت که کاهش این آنزیم ها زمینه را برای ایجاد بیماری فراهم میکند (۸و۱). مالون دی آلدئید (MDA) یک گروه کربونیل تولیدشده درطی پراکسیداسیون لیپید به طور زیادی در تشخیص استرس اکسیداتیو بکار گرفته می شود (۹).

از طرف دیگر بیماری آترواسکلروز ناشی از یک تقابل پیچیده بین ژنتیک و عوامل محیطی میباشد (۲). اخیرا" نقص آنزیم NO ستاز اندوتلیالی (eNOS) بطور وسیعی برای پلی مورفیسم های ژنی جهت توضیح نقش ژنتیک در بیماریهای عروقی مورد مطالعه قرارگرفته است (۱۰). در پلی مورفیسم T-786C سنتز NO پایین بوده و به نظر میرسد در این افراد زمینه برای شروع و یا ایجاد آترواسکلروز مساعد باشد (۱۱). از بین بسیاری از پلی مورفیسم هائی که از ژن eNOS گزارش شده است،786C -T ارتباط زیادی با CAD دارد (۱۲). مطالعات و بررسیهای بعمل آمده نشان میدهد که این پلی مورفیسم ارتباط متقابلی بین انواع ریسک فاکتورها دارد (۲).

در این تحقیق برای اولین بار در آذربایجان شرقی (شهرتبریز) فراوانی پلی مورفیسم T-786C در ژن eNOS دربیماران مبتلا به CAD مورد مطالعه قرار میگیرد .جهت پی بردن به ارتباط پلی مورفیسمT-786C در ژن eNOS با فراوانی این پلی مورفیسم در بیماران CAD تعیین و با گروه کنترل مقایسه میگردد. در همه گروهها سطح سرمی آنتی اکسیدانت ها (TAC,GPX,SOD) و پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) اندازه گیری و با گروه شاهد، مقایسه وارتباط پلی مورفیسم T-786C در ژن eNOS با هر کدام از عوامل خطر فوق الذکر تعیین میگردد. لازم به ذکر میباشد در این مطالعه، افراد با بیماریهای زمینه ای حذف شده اند و افراد مورد مطالعه فقط بیماری CAD داشتند و غیرسیگاری و غیردیابتی بودند.

مواد و روش ها

این مطالعه ازنوع توصیفی-مقایسه ای بوده و توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز تصویب گردیده است. دراین مطالعه ۶۰ نفرازبیماران مبتلا به CAD مراجعه کننده به مرکز آموزشی درمانی شهید مدنی تبریز به صورت تصادفی انتخاب شدند. به همین تعداد افراد سالم که نتایج آنژیوگرافی نرمال داشتند و به این مرکز مراجعه نموده بودند به صورت تصادفی در قالب گروه شاهد انتخاب شدند. مدت زمان خونگیری از بیماران حدود ۴ ماه طول کشید. افرادی به این مطالعه واردشدند که علائم بیماری عروق کرونرا داشته و بیماری آنها بوسیله آنژیوگرافی توسط متخصص قلب تایید شده بود. داشتن سن ۷۰-۴۰ و عدم مصرف داروهای درمان کننده هایپرلیپیدمی و عدم مصرف سیگار و عدم وجود دیابت (قند خون بالای mg/dl ۱۴۰) درافراد CAD جزو شرایط ورود به مطالعه بوده است. بیماران با اختلالات کلیوی (کراتین بالای mg/dl ۲)، افراد با نارسایی کبد، هیپرتیروئیدیسم، بیماران مبتلا به نئوپلازی، افراد با سابقه MI و بیماریهای دیگر از مطالعه حذف شدند، همچنین افراد سیگاری، دیابتی از مطالعه حذف شدند جهت اطمینان از عدم دیابت، از گروه بیمار و سالم آزمایش قند خون ناشتا بعمل آمد. بیماران بر اساس نتایج آنژیوگرافی به دو دسته شامل بیماران با آنژیوگرام طبیعی (گروه Non CAD) بعنوان گروه شاهد و بیماران با گرفتگی عروق بعنوان گروه بیمار تقسیم شدند. داده های مربوط به فشارخون، وزن، قد، سابقه فامیلی، هیپرلیپیدمی، سن و جنس افراد بیمار از طریق چک لیست های مربوطه جمع آوری گردید.

از تمام افراد مورد مطالعه ۱۰ میلی لیتر خون در حالت ناشتا گرفته شد. ۵ میلی لیتر در لوله مخصوص جهت PCR (حاوی EDTA) و ۵ میلی لیتر دیگر به ترتیب ۱ میلی لیتر برای خون تام جهت اندازه گیری SOD، GPX و Hb و از باقی خون، در کمتر از نیم ساعت سرم نمونه ها از قسمت لخته جدا گردید و سرم ها در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد و خون تام در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان مناسب نگهداری شدند.

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) گلبولهای قرمز بروش کلریمتری (اسپکتروفوتومتری) و با استفاده از کیت RANSOD ساخت شرکت RANDOX انگلستان در طول موج ۵۰۵ نانومتر توسط دستگاه اتوآنالایزر (Abbott, model Alcyon 300, USA) اندازه گیری شد. اساس آزمایش بدین شرح می باشد **که** نقش SOD تسریع دیسموتاسیون رادیکال ($O_2^{\cdot-}$) و تبدیل آن به H_2O_2 و O_2 است. در این روش جهت اندازه گیری فعالیت SOD از گزانتین و آنزیم گزانتین اکسیداز (XOD) استفاده می شود و رادیکال های $O_2^{\cdot-}$ تولید شده قادرند با ۲-(۴- یدوفنیل) -۳-(۴- نیتروفنل)- ۵- فنیل تترازولیوم کلراید (I.N.T) وارد واکنش شده و تولید فرمازان قرمز رنگ بکند. فعالیت SOD بوسیله میزان مهار این واکنش (مهارتولید رنگ قرمز) اندازه گیری می شود (۱۳).

اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) گلبولهای قرمز بروش کلریمتری (اسپکتروفوتومتری) و با استفاده از کیت RANSEL ساخت شرکت RANDOX انگلستان صورت گرفت. اساس آزمایش بدین شرح میباشد: GPX، اکسیداسیون گلوتاتیون(GSH) را بوسیله کومن هیدروپراکسید کاتالیزمی کند. در حضور گلوتاتیون ردوکتاز(GR) و NADPH، گلوتاتیون اکسیدشده

(GSSG) فورا" به شکل احیا در می آید و این واکنش همراه با اکسید شدن NADPH و تبدیل آن به $NADP^+$ انجام می گیرد (۱۴).

در پایان اندازه گیری جذب نور توسط دستگاه اتوآنالایزر (Abbott, model Alcyon 300, USA) در ۳۴۰ نانومتر و در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ صورت گرفت. اندازه گیری ظرفیت توتال آنتی اکسیدانت پلاسما (TAC) بروش کلریمتری (اسپکتروفوتومتری) با استفاده از کیت RANDOX صورت گرفت. اساس آزمایش بدین شرح میباشد: ابتدا ترکیب ABTS (۲،۲- آزینو- دی- [۳- اتیل بنزتیازولین سولفات]) با یک پراکسیداز (مت میوگلوبین) و H_2O_2 جهت سنتز رادیکال کاتیون $ABTS^+$ انکوبه می گردد. این ماده رنگ آبی – سبز نسبتا" پایداری دارد که در طول موج ۶۰۰ نانومتر قابل اندازه گیری است. آنتی اکسیدانت های موجود در نمونه ها موجب کاهش تولید این رنگ می گردند، بطوری که درجه ی کاهش رنگ با میزان غلظت آنتی اکسیدانت متناسب است (۱۵). در انتها جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اتوآنالایزر اندازه گیری گردید. اساس روش اندازه گیری MDA سرمی بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBA) ، استخراج با بوتانل نرمال ، اندازه گیری جذب با روش اسپکتروفتومتری و مقایسه جذب با منحنی استاندارد می باشد (۱۷و۱۶).

روش های مختلفی جهت استخراج DNA از خون وجود دارد که در آزمایش های بیولوژی مولکولی بکار می رود. در این تحقیق استخراج DNA بر اساس حلالیت متفاوت (استفاده از حلال های آلی) انجام گردید. لازمه یک PCR موفق، داشتن DNA خالص به مقدار معین است. جهت بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده می توان از دو روش معمولی اسپکتروفتومتری و الکتروفورز استفاده کرد که در این مطالعه از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. آزمایش PCR بر روی کلیه نمونه ها برای پلی مورفیسم T-786C از ژن eNOs انجام گردید. پرایمرهای موردنیاز برای انجام PCR، توسط نرم افزار Primer-3 طراحی شدند و بعد از طراحی با استفاده از Primer-Blast، اختصاصیت آن برای ژن مورد نظر تایید شد. توالی پرایمرهای Forward و Reverse مورد نیاز جهت تکثیر قسمتی از پروموتور ژن eNOS جهت بررسی پلی مورفیسم T-786C بصورت زیر می باشد:

C0: TTT CTC CAG CCC CTC AGA TG
۲۶۸۴C: GGC AGA GGC AGG GTC AGA CG
2684T: CAT CAA GCT CTT CCC TGT CT
T0: AGG CCC AGC AAG GAT GTA GT

برای ژنوتایپینگ eNOS ابتدا DNA از نمونه های خون محیطی (لنفوسیت) با استفاده از کیت استخراج DNA پرومگا استخراج گردید. برای ژنوتایپینگ اللهای TوC در ژن eNOS از روش Allele-specific PCR استفاده شد.به این ترتیب که دو جفت پرایمر برای تکثیر DNA طراحی گردید که در جفت اول، پرایمر Revers حامل الل C بود. الل T در پرایمر Forward معرفی شد. جهت کنترل PCR، پرایمر C0 و T0 که ناحیه ای بطول bp ۳۸۷ را فاصله گذاری می کند، بکار برده شده است. محصولات PCR با روش الکتروفورزیز آنالیز شدند. محصولات PCR، بسته به نوع ژنوتیپ، سایزهای متفاوتی داشتند. الل C و T به ترتیب محصولات bp۱۷۶ و bp۲۵۰ تولید نمود.

داده های به دست آمده ازمطالعه بوسیله روش های آماری توصیفی آزمون تفاوت میانگین (آزمون t) برای گروههای مستقل و آزمون رابطه مجذور کای (کای اسکوئر) جهت مقایسه متغیرهای کیفی و کمی در دو گروه مورد مطالعه و آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و تحلیل واریانس دو عامله جهت بررسی اثر هر یک از متغیرها بر روی شاخص های آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه کلیه آنالیزها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-15 مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت. در این مطالعه مقدار P< ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد. نرمال بودن توزیع داده ها بوسیله آزمون کالموگروف–اسمیرنوف و نمودار Q-Q مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها

مطالعه ما بر روی ۱۲۰ نفر (۶۰ نفر بیمار و ۶۰ نفر شاهد) انجام گردید و نتایج حاصل در بیماران با نتایج افراد سالم مقایسه شد. میانگین سن در گروه بیمار ۹ ± ۵۸ سال و در گروه شاهد ۱۱ ± ۵۷ سال بود. برخی مشخصات افراد مورد مطالعه در قالب گروه های بیمار و شاهد در جدول ۱ نشان داده شده است. اختلاف معنی دار بین دو گروه در سن، جنس و سابقه فامیلی وجود نداشت اما در فشارخون اختلاف معنی دار بین دو گروه وجود داشت. میانگین سطح گلوکز در بیماران ۴/۱ ± ۱۰۵/۸۵ و میانگین سطح گلوکز در گروه شاهد mg/dl ۱۹/۸۱ ± ۹۸/۱۳ بود.

میانگین SOD در گروه بیمار U/gHb ۲۱۶/۹۶ ± ۹۷۲/۴۹ و در گروه کنترل U/gHb ۲۷۳/۷۸ ± ۱۳۱۷/۳۲ بود. بررسی نتایج آزمون t (t-test) برای گروه های مستقل نشان داد که تفاوت میانگین SOD در دو گروه از لحاظ آماری معنی دارمی باشد (p<۰/۰۰۱).

میانگین GPX در گروه بیمار U/gHb ۱۰/۰۹ ± ۴۰/۶۱ و در گروه کنترل U/gHb ۸/۸۵ ± ۴۸/۲۳ بود. بررسی نتایج آزمون t (t-test) برای گروه های مستقل نشان داد که تفاوت میانگین GPX در دو گروه از لحاظ آماری معنی دار می باشد (p< ۰/۰۰۱).

میانگین ظرفیت توتال آنتی اکسیدانت (TAC) در بیماران مورد مطالعه mmol/l ۰/۲۲ ± ۰/۸۸ و در گروه کنترل mmol/l ۰/۱۶ ± ۱/۱۴ بود. بررسی نتایج آزمون تفاوت میانگین برای گروه های مستقل نشان داد که تفاوت میانگین سطح TAC در دو گروه از لحاظ آماری معنی دار می باشد (p<۰/۰۰۱)، یعنی در حالت کل فعالیت آنزیمی SOD ، GPX و TAC در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری کاهش یافته بود (جدول۲).

میانگین MDA در گروه بیمار nmol/ml ۱/۱۹ ± ۳/۳۹ و در گروه کنترل mol/ml ۱/۱۷ ± ۱/۵۶ بود. بررسی نتایج آزمون t (t-test) برای گروه های مستقل نشان داد که تفاوت میانگین MDA در دو

گروه از لحاظ آماری معنی دار می باشد (p<۰/۰۰۱) یعنی سطوح MDA سرم در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری افزایش یافته بود (جدول۲).

در آزمایش مولکولی پس از استخراج DNA بر روی کلیه نمونه ها، آزمایش PCR انجام گرفت و پس از آنکه وجود محصولات PCR بر روی ژل آگاروز تایید شد، نتیجه نمونه ها بدست آمد. نتیجه آزمایش مولکولی به شرح زیر می باشد:
محصولات PCR پلی مورفیسم T-786C ، قطعه الل C با اندازه ۱۷۶ جفت باز، قطعه الل T با اندازه ۲۵۰ جفت باز و کل قطعه با اندازه ۳۸۷ به دست آمد. وجود باند در محل ۱۷۶ و ۳۸۷ در ژل، بیانگر ژنوتیپ CC و وجود باند در محل ۲۵۰ و ۳۸۷، بیانگر ژنوتیپ TT و نمونه هایی که ژنوتیپ TC داشتند در سه محل ۱۷۶، ۲۵۰ و ۳۸۷ دارای باند الکتروفورزی بودند. همان طوری که در جدول ۳ نشان داده شده است بررسی نتایج آزمون رابطه مجذور کای نشان داد که اختلاف توزیع فراوانی ژنوتیپ های TT/TC/CCدر دو گروه مورد مطالعه از لحاظ آماری معنی دار می باشد (p =۰/۰۳).

بررسی نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عامله نشان داد که تفاوت میانگین SOD در ژنوتیپ های مختلف از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد (p =۰/۸۶)، همچنین بررسی اثرات تعاملی ژنوتیپ در دو گروه نیزاز لحاظ آماری معنی دارنیست (p>۰/۰۵) (جدول۴).
بررسی نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عامله نشان داد که تفاوت میانگین GPX در ژنوتیپ های مختلف از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد (p =۰/۵۳)، همچنین بررسی اثرات تعاملی ژنوتیپ در دو گروه نیزاز لحاظ آماری معنی دارنیست (p>۰/۰۵) (جدول۴).
بررسی نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عامله نشان داد که تفاوت میانگین MDA در ژنوتیپ های مختلف از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد (p =۰/۶۵)، همچنین بررسی اثرات تعاملی ژنوتیپ در دو گروه نیزاز لحاظ آماری معنی دارنیست (p>۰/۰۵) (جدول۴).

جدول۱: داده های بالینی گروه های بیمار و کنترل

مشخصات	بیماران(تعداد=۶۰) میانگین ± انحراف معیار	کنترل(تعداد=۶۰) میانگین ± انحراف معیار	P Value
(مونث و مذکر) تعداد	۳۰/۳۰	۳۰/۳۰	غیرمعنی دار
(سن) سال	۵۸±۹	۵۷±۱۱	غیرمعنی دار
** فشارخون،تعداد (٪)	۳۳(۵۵%)	۲۲(۳۶/۷٪)	P=۰/۰۴*
سابقه فامیلی، تعداد(٪)	۲۵(۴۱/۷٪)	۱۹(۳۱/۷٪)	غیرمعنی دار

* P<۰/۰۵ معنی دار می باشد.
** واحد فشارخون = mmHg

جدول۲: پارامترهای سطوح آنتی اکسیدانت ها و اکسیدانت ها در دو گروه بیمار و کنترل

پارامترها	بیماران(تعداد=۶۰) میانگین ± انحراف معیار	کنترل(تعداد=۶۰) میانگین ± انحراف معیار	P value*
SOD(U/gHb)	۹۷۲/۴۹±۲۱۶/۹۶	۱۳۱۷/۳۲±۲۷۳/۷۸	P ‹۰/۰۰۱
GPX(U/gHb)	۴۰/۶۱±۱۰/۰۹	۴۸/۲۳±۸/۸۵	P ‹۰/۰۰۱
TAC(mmol/L)	۰/۸۸±۰/۲۲	۱/۱۴±۰/۱۶	P ‹۰/۰۰۱
MDA(nmol/ml)	۳/۳۹±۱/۱۹	۱/۵۶±۰/۱۷	P ‹۰/۰۰۱

* P<۰/۰۵ معنی دار می باشد.

جدول۳: ارتباط بین ژنوتیپ های TT/TC/CC با دو گروه بیمار و کنترل

گروه ها	ژنوتیپ(TT)	ژنوتیپ(TC)	ژنوتیپ(CC)
گروه بیمار	۲۳	۲۸	۹
(درصد) تعداد	(۳۸/۳ ٪)	(۴۶/۷ ٪)	(۱۵ ٪)
گروه کنترل	۳۷	۱۸	۵
(درصد) تعداد	(۶۱/۷ ٪)	(۳۰ ٪)	(۸/۳ ٪)

جدول۴: آمار توصیفی مربوط به میانگین SOD, GPX و MDA در دو گروه و ژنوتیپ های مختلف

SOD(U/gHb)	**TT**	**TC**	**CC**
گروه بیمار	۹۷۷/۶۷±۲۱۰/۷۴	۹۷۰/۳۸±۲۰۰/۸۹	۹۶۵/۸۴±۲۹۷/۷۷
گروه کنترل	۱۳۲۹/۶۴±۲۴۳/۳۶	۱۲۸۴/۸۸±۳۵۵/۳۹	۱۳۴۲/۹۲±۱۶۹/۷۵
GPX(U/gHb)	**TT**	**TC**	**CC**
گروه بیمار	۴۲/۳۴±۹/۵۵	۴۰/۱۰±۱۰/۳۴	۳۷/۷۷±۱۰/۹۶
گروه کنترل	۴۸/۴۵±۸/۶۷	۴۸/۱۶±۹/۵۲	۴۶/۸۰±۹/۵۷
MDA(nmol/ml)	**TT**	**TC**	**CC**
گروه بیمار	۳/۲۶±۱/۱۰	۳/۳۹±۱/۲۲	۳/۷۰±۱/۴۰
گروه کنترل	۱/۵۲±۰/۲۵	۱/۵۸±۰/۲۰	۱/۷۵±۰/۸۲

بحث

امروزه بیماری عروق کرونر بعنوان یک مشکل اساسی در جهان مطرح می باشد. تحقیقات بسیاری در جهت پیشگیری از آن در حال انجام می باشد تا بتوان با کمترین خسارت در جهت رفع این مشکل اقدام نمود. عواملی از جمله عمل جراحی عروق، وجود کافی آنزیم های آنتی اکسیدانت از قبیل SOD و کاتالاز باعث می شود که عملکرد اندوتلیال اصلاح گردد (۱۸). بعضی مطالعات نشان می دهد که آنتی اکسیدانت ها توسط دو مکانیسم مهم اثرات دفاعی بر علیه CAD دارند. اولین مکانیسم، فعالیت آنتی اکسیدانتی LDL می باشد. برای مثال حمایت LDL از آنتی اکسیدانت ها بر علیه تغییرات اکسیداتیو در مایعات اکستراسلولار فضای زیر اندوتلیال می باشد. دومین مکانیسم، فعالیت سلول یا بافت بخصوصی در جهت حمایت از آنتی اکسیدانت ها است برای مثال افزایش برداشت آنتی اکسیدانت ها توسط سلول های عروقی و در نتیجه افزایش آنتی اکسیدانت ها در درون سلول های عروقی. نتیجه این افزایش در سلول های عروقی، کاهش تولید ROS است که در نتیجه منجر به کاهش اکسیداسیون LDL سلولی شده و در نتیجه LDL مصون می ماند و به سلول آسیب کمی وارد می شود، علاوه بر اینها آنتی اکسیدانت های سلولی ممکن است مقاومت سلول های عروقی را نسبت به اثرات زیان آور LDL اکسیده افزایش دهد. هر دو مکانیسم ذکر شده فوق همچنین ممکن است به کاهش چسبندگی ملکولی و بیان MCP-I (Monocyte Chemotactic Protein-I) منتهی شود، در نتیجه کاهش تشکیل Foam cell و افزایش فعالیت NO اندوتلیالی به وجود آمده و فعالیت آتروژنزیس کاهش می یابد. (۱۹).

مطالعات زیادی در طی سالها از استرس اکسیداتیو و مواد دفاعی بر علیه آن (دفاع آنتی اکسیدانت ها) بدست آمده است. اندازه گیری آنزیم های آنتی اکسیدانت شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون رداکتاز (GR)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، سرولوپلاسمین و پروتئین ها از قبیل متالوتیونین در آزمایشگاههای تحقیقاتی کاربرد دارد (۲۰).

NO یک تحریک کننده قوی برای بیان SOD می باشد. SOD یک آنزیم آنتی اکسیدانت مهم می باشد که دارای یک اثر آنتی توکسیک بر علیه آنیون سوپراکسید است. بیان بالای SOD ممکن است یک پاسخ سازشی باشد و در نتیجه منجر به افزایش دیسموتاسیون سوپر اکسید به پراکسید هیدروژن گردد. در طی مطالعاتی در بیماران CAD سطوح کاهش یافته ای از SOD مشاهده شد که می تواند نتیجه ای از کاهش تولید مقادیر SOD باشد زیرا در طی افزایش تولید مواد اکسیدانت که همراه با مصرف زیاد آنتی اکسیدانت ها می باشد در نتیجه کاهش SOD، GPX و TAC را خواهیم داشت، دلیل دیگر جهت کاهش GPX این می باشد که ممکن است نتیجه ای از کاهش سطوح سلنیوم باشد (۱۹).

GPX یک آنزیم حاوی سلنیوم و آنتی اکسیدانت مهم اریتروسیت ها می باشد. GPX یک نقش مهمی در مکانیسم جمع آوری پراکسیل و در غشای سلول نقش محافظتی غشای سلول را بر عهده دارد (۲۱).

تحقیق ما یک کاهش معنی داری در فعالیت های SOD و GPX در بیماران CAD نشان می دهد. نتایج این تحقیق با گزارشات Kayyum و همکاران (۲۲) مطابقت دارد. SOD یک آنزیم آنتی اکسیدانت کلیدی می باشد که بطور منظمی بین اندوتلیوم و سلول های ماهیچه ای صاف عروق در قسمتی از دیواره آرتریال قرار گرفته است. وجود زیاد رادیکال های آزاد از قبیل $O2^{\cdot-}$ منجر به مصرف بیشتر SOD در غشا گردیده و در نتیجه منتهی به کاهش SOD درخارج سلولی می گردد. از طرفی وجود رادیکال های آزاد در آترواسکلروزیز و کاهش NO می تواند با کاهش SOD خارج سلولی ارتباط داشته باشد.

در اوایل ۱۹۹۰، Miller و همکاران ، یک تست جدیدی را جهت اندازه گیری توتال آنتی اکسیدانت ها تحت عنوان TAC (Total Antioxidant Capacity) طراحی نمودند. از مزیت های مهم این تست، اندازه گیری کل آنتی اکسیدانت ها در یک نمونه بیولوژیک می باشد همچنین TAC بعنوان یک بیومارکری برای تشخیص، پیش آگهی و جلوگیری از بیماری می باشد (۲۰). بیماران آترواسکلروزیز کاهش گلوتاتیون اریتروسیت، ویتامین C سرم، TAC و افزایش غلظت MDA را نشان داده اند. تحقیقات، افزایش آسیب های فراوان DNA در هسته های سلول های کرونری و کاهش TAC پلاسما در بیماران CAD را نشان می دهد (۲۳).

در مطالعه ای که توسط Kayyum و همکاران انجام شده است، در بیماران CAD، سطوح TAC بطور معنی داری پایین تر بوده است و ارتباطی نیز بین مقادیر TAC و شدت بیماری مشاهده گردید (۲۲).

Fazendas و همکاران (۲۴) گزارش نمودند که سطوح TAC در افرادی که MI حاد داشتند، کاهش یافته بود. Yegin و همکاران (۲۵)، همچنین کاهشی در سطح TAC در سرم نشان دادند.

یافته های ما نیز مطالعات دیگران را تایید می نماید. این کاهش سطح TAC ممکن است با یک مکانیسم حمایتی ارتباط داشته باشد زیرا در CAD به علت وجود استرس اکسیداتیو و وجود مواد اکسیدانت کاهشی را در TAC، SOD و GPX به وجود خواهد آورد. در بیماری CAD انواع رادیکال های آزاد، گونه های مختلف اکسیژن، نیتروژن افزایش نشان می دهد. امروزه بیشتر از ۷۰ نوع بیماری بطور زیادی با استرس اکسیداتیو در ارتباط است. مارکرهای استرس اکسیداتیو شامل پراکسیداسیون لیپیدها (مالون آلدئید، MDA و ۴ hydroxy nonenal-)، پروتئین ها (قسمت کربونیل)، نوکلئیک اسید (DNA اکسیده) و کربوهیدرات ها (محصولات گلیکوزیلاسیون) می باشد. ایجاد استرس اکسیداتیو بدین صورت می باشد که حالت غیرتعادلی بین رهایی گونه های اکسیژن، نیتروژن و تولید مواد دفاعی بدن از قبیل آنتی اکسیدانت ها وجود دارد و افزایش گونه های اکسیژن منجر به استرس اکسیداتیو می شود. نتیجه استرس اکسیداتیو، شامل آسیبی است که به DNA

وارد می شود و موتاسیون رخ می دهد همچنین منجر به مرگ سلولی (آپوپتوزیز) و نکروز می شود (۲۰).

نقش استرس اکسیداتیو در پیشرفت CAD به خوبی شناخته شده است. گونه های واکنشی اکسیژن (رادیکال های آزاد) می توانند به تمام انواع بیومولکول ها شامل: لیپیدها، پروتئین ها و DNA زیان برسانند. بدن توسط مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانت ها که شامل نوع آنزیمی و غیر آنزیمی می باشد، می توانند انواع رادیکال های آزاد را غیرفعال نمایند (۲۱). Kostner و همکاران سطوح MDA بالایی را در بیماران CAD گزارش کرده اند (۲۶). در یک مطالعه از Cavalca و همکاران، MDA توتال و آزاد سرم بطور همزمان اندازه گیری شد، در این اندازه گیری سطوح MDA در گروه CAD در مقایسه با گروه سالم بطور معنی داری بالاتر بود (۲۷).

در مطالعه ما بیماران CAD در سطوح MDA سرم یک افزایش معنی داری را نشان دادند. این یافته بر طبق یافته Kostner و همکاران می باشد. افزایش MDA در بیماران ممکن است ناشی از افزایش لیپید پراکسیداسیون باشد که افزایش لیپید پراکسیداسیون خود در نتیجه افزایش در سطوح استرس اکسیداتیو می باشد.

MDA، یک گروه کربونیل که در طی واکنش لیپید پراکسیداسیون تولید می شود، بطور وسیعی در تشخیص استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار می گیرد. در مطالعات بالینی متعددی در بیماران CAD سطوح MDA سرم به مقدار زیادی افزایش می یابد. مطالعاتی ارتباط معنی داری بین NO و CAD را نشان می دهند، MDA و NO یک ارتباط غیر معنی داری را نشان دادند. مقادیر بالای MDA در CAD، یک ارتباط معنی داری را بین استرس اکسیداتیو و آترواسکلروزیز ثابت نموده است (۲۸).

ژن eNOS درستز NO نقش بسزائی ایفا می کند. ازبین ژن های متعدد، ژن eNOS بعنوان یک کاندیدای مهم در بیماریهای عروق کرونر بطور وسیعی مطالعه گردیده است (۲۹). پلی مورفیسم های متعددی در ژن eNOS کشف شده است که با تولید NO در ارتباط است اما پلی مورفیسم T-786C از همه اینها مهمتر می باشد. پلی مورفیسم T-786C در ناحیه پروموتور ژن eNOS با eNOS mRNA کاهش یافته و با سطوح نیتریت/نیترات سرم در ارتباط است. اندازه گیری های ژن eNOS و فعالیت های باندینگ پروموتور اثرات پلی مورفیسم T-786C در روی فعالیت eNOS را تائید می کند (۲۹).

مطالعات دانشمندان در مورد پلی مورفیسم T-786C و پلی مورفیسم های مهم دیگر می تواند بطور مناسبی در تغییر بیان ژن eNOS نقش داشته باشد. با بیان ناقص این ژن می توان انتظار بیماریهای عروقی شامل سکته قلبی، فشارخون، بیماری عروق کلیوی و بیماری عروق مغزی نخاعی را داشت (۱۱).

مطالعات دیگر در ژاپن نیز نشان می دهدکه واریانت T/C در ناحیه پروموتور می تواند با کاهش فعالیت پروموتور eNOS و در نتیجه بیماری عروقی ارتباط داشته باشد (۱۱).

بر طبق Nakayama و همکاران ، الل C 786- می تواند با یک کاهش معنی داری از فعالیت پروموتور ژن eNOS ارتباط داشته باشد. ایشان یک موتاسیون T-786C در ناحیهFlanking -'5 ژن eNOS پیدا نمودند که با اسپاسم کرونری ارتباط دارد (۳۰). وجود الل C منجر به کاهش تولید NO شده و اسپاسم عروق کرونر را سبب می شود اکثر محققین (۳۰)، پیشنهاد می کنند که در هموزیگوت CC، اسپاسم کرونر ممکن است شدید باشد زیرا که وجود ژنوتیپ eNOS CC 786- منجر به ایجاد یک CAD زود هنگام و سکته قلبی حاد با خطرات زیاد می شود.

اخیرا" مطالعات متعدد نشان می دهد که موتاسیون های زیادی از ژن eNOS وجود دارد و این موتاسیون ها ممکن است یک ریسک فاکتوری برای CAD، MI و هیپرتانسیون باشد. آنها همچنین مشاهده نمودند که این پلی مورفیسم ها بطور زیادی در بین انواع نژادها با هم فرق دارد، این پلی مورفیسم ها شامل T-786C، Glu298Asp، a/4b۴ و G894T می باشد.

در مطالعه حاضر یک افزایش معنی دار در الل C افراد بیمار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید، بدین صورت که فراوانی الل C در حالت کل در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل بود یعنی مجموع درصد (TC+CC) در افراد بیمار بیشتراز درصد TT بود. حالت CC هموزیگوت در پیشرفت آترواسکلروز خیلی مهمتر از حالات دیگر می باشد. گروه بیمار ممکن است.

پلی مورفیسم T-786C مهمترین پلی مورفیسم در ژن eNOS می باشد بنابراین منجر به کاهش آنزیم مربوط به سنتز NO شده و در نتیجه کاهش تولید NO می گردد. الل C وقتی به جای الل T می نشیند تغییر در پروموتور eNOS انجام می گیرد و در نتیجه سنتز به خوبی انجام نمی شود و چون در اکثر مطالعات در اثر غالب بودن الل C بر الل T، NO کاهش می یابد و چون NO مهمترین فاکتور اتساع دهنده عروق می باشد، همین امر زمینه را برای بیماری آترواسکلروز فراهم می سازد در نتیجه به خاطر همین در بیماران CAD فراوانی الل C غالب بر الل T بود، اما جالب توجه است که هیچ ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ CC و TC با هر کدام از پارامترهای بیوشیمیایی از قبیل MDA، SOD، GPX و بقیه مشاهده نگردید.

نتیجه گیری

استرس اکسیداتیو به همراه سایر عوامل، ریسک فاکتورهای مهمی در آغاز و پیشرفت آترواسکلروزیس می باشند. این مطالعات نشان می دهد که مواد آنتی اکسیدانت می توانند در جلوگیری از آترواسکلروزیس دخیل باشد. تحقیقات زیادی نیز در مورد نقش معالجه با آنتی اکسیدانت ها در بیماری قلبی کرونر انجام گردیده است. توصیه ما برای بیماران CAD این می باشد که مکمل های رژیمی به همراه آنتی اکسیدانت ها (ویتامین های E و C) را نیز مصرف نمایند. این امر پیشرفت CAD را کاهش خواهد داد زیرا منجر به کاهش اکسیداسیون لیپوپروتئین ها خواهد شد. لازم به توضیح می باشد که فراوانی الل C نیز می تواند در پیشرفت آترواسکلروزیس سهیم باشد.

References

1. Khaki-Khatibi F, Yaghoubi AR, Rahbani-Nobar M. Serum levels of Nitric Oxide and its relation to frequency of T-786C Polymorphism of NO Synthase Gene in patients with Coronary Artery Diseases. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services* 2013; **35**(3): 46-53.
2. Fatini C, Sofi F, Sticchi E, betal B.S. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (G894T, 4a4b, T-786C) and hyperhomocysteinemia on the predisposition to acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2004; **147**: 516-521.
3. R.Rosik E. Arginine fights coronary artery disease. *Life Enhancement* 2002; 1-7.
4. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function. A critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004; **190** Suppl II: II-27-II-33.
5. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42: 1075-1081.
6. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; **91**: 7A-11A.
7. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; **122**: 339-352.
8. B.sharma S, Garg S. hs-CRP and oxidative stress in young CAD patients: a pilot study. *Indian journal of clinical Biochemistry* 2008; **23**(4): 334-336.
9. Soydinç S, Çelik A, Demiryürek S. The relationship between oxidative stress, nitric oxide, and coronary artery disease. *Eur J Gen Med* 2007; **4**(2): 62-66.
10. Nasreen S, Nabika T, Shibata H, Moriyama H, Yamashita K, Masuda J, et.al. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**: 605-610.
11. Senthil D, Raveendran M, H.Shen Y, Utama B, Dudley D, Wang J, et.al. Genotype- Dependent Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOs) and Its Regulatory Proteins in Cultured Endothelial Cells. *DNA Cell Biol* 2005; **24**(4): 218-224.
12. Ciftci C, Melil S, Cebi Y, Ersoz M, Cagatay P, Kilicgedik M, et.al. Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. *Lipids in Health and Disease* 2008; **7**(5): 1-6.
13. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH. Plasma lipid peroxidation Zinc and Erythrocyte cu-zn superoxide dismotase. *Res Vet Sci* 1983; **34**: 253-256.
14. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; **70**: 158.
15. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ. Factors in fluencing the antioxidant activity determined by the ABTS0 + radical cation assay. *Clin Sci* 1993; **84**: 407-412.
16. Bilici M,Efe H, A. Koroglu M, A. Uydu H, Nekaroglu M, Deger O. Anti-oxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antide present treatments. *Journal of Affective Disorders* 2001; **64**: 43-51.
17. Yag. IK. lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: Free Radicals in Diagnostic Medicine. 1st ed: plenum press, New York, 1994; PP: 1-15.
18. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function. A critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004; **190** Suppl II: II-27–II-33.
19. K.Shaikh A, N.Suryakar A. Oxidative stress and antioxidant status before and after supplementation of A-Z anti-oxidant tablets in coronary artery disease. *Biomedical Research* 2009; **20**(2): 136-140.
20. Kusano C, Ferrari B. Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2008; **7**(1): 1-15.
21. Vishnu-Priya V, Surapaneni KM. Erythrocyte Lipid Peroxidation, Glutathione, Ascorbic Acid, Vitamin E, Antioxidant Enzymes and Serum Homocysteine Levels in Patients with Coronary Artery Disease. *J Clin Diag Res* 2008; **2**: 1180-1185.
22. Kayyum-Shaikh A, Suryakar AN. Oxidative stress and antioxidant status before and after supplementation of A-Z anti-oxidant tablets in coronary artery disease. *Biom Res* 2009; **20**(2): 136-140.
23. Demirbag R, Yilmaz R, Kocyigit A. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutat Res* 2005; **570**: 197-203.
24. Fazendas P, Joao IF, Llobet S. Plasma Total antioxidant status in young survivors of myocardial infarction. *Rev Port Card* 2000; **19**: 463-467.
25. Yegin A, Yegin H, Aliciguzel Y. Erythrocyte Selenium glutathione peroxide activity is lower in patients with Coronary atherosclerosis. *Jpn Heart Jr* 1997; **38**: 793-779.
26. Kostner K, Hornykewycz S, Yang P. Is oxidative stress causally linked to unstable angina pectoris? A study in 100 CAD patients and matched controls. *Cardiovascular Res* 1997; **36**: 330-336.
27. Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem* 2001; **47**(5): 887-892.
28. Soydinc S, Celik A, Demiryurek S, Davutoglu V, Tarakcioglu M, Aksoy M. The relationship between oxidative stress, nitric oxide, and coronary artery disease. *Eur J Gen Med* 2007; **4**(2): 62-66.
29. Cattaruzza M, Guzik TJ, Słodowski W. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. *Circ Res* 2004; **95**: 841-847.
30. Han Y, Xu W, Zhang W, Liu N, Ji Y. T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Pharmacology* 2010; **85**: 211-216.