

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 Yaghoubi¹, Fatemeh Khaki Khatibi^{2*}

¹Cardiovascular Research Center, Shahid Madani Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Department 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 spectrophotometrically 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 alleles 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

*Corresponding author:

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*}

^۱مرکز تحقیقات قلبی عروقی، شهید مدنی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۲گروه 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 GPX، SOD 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 تیوباربتوریک 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 ($P < 0.05$) در کل موردها. سطوح MDA سرم در بیماران CAD در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری افزایش یافته بود ($P < 0.05$). فراوانی ژنوتیپ T-786C در گروه CAD بطور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود که نشان می دهد ال 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 سهم 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.khakhkhatibi@yahoo.com

مقدمه

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

پیشگیری ازبیماری عروق کرونر و کاهش میزان مرگ و میر ناشی از آن در کشورهای در حال توسعه به عنوان یک مشکل اساسی مطرح است. بیماری عروق کرونر در اثر آترواسکلروزیس به وجود می آید. آترواسکلروزیس منجر به گرفتگی عروق میشود و

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 وارد شدند که علائم بیماری عروق کرونر را 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 ۱۴۰ mg/dl) در افراد CAD جزو شرایط ورود به مطالعه بوده است. بیماران با اختلالات کلیوی (کراتی نین بالای ۲ mg/dl)، افراد با نارسایی کبد، هیپرتیروئیدسم، بیماران مبتلا به تیروپلازی، 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، هایپرلیپیدمی، 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) گلوبولهای 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, USA, 300) اندازه گیری شد. اساس آزمایش بدین شرح می باشد که نقش SOD تسریع دیسموتاسیون رادیکال (O_2^-) 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^- تولید شده قادرند با ۲- (۴-یدوفنیل) -۳- (۴-نیترفنل) -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 گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) گلوبولهای قرمز بروش کلریمتری (اسپکتروفوتومتری) و با استفاده از کیت RANSEL ساخت شرکت RANDOX انگلستان صورت گرفت. اساس آزمایش بدین شرح می باشد: GPX، اکسیداسیون گلوکاتایون (GSH) را بوسیله کومن هیدروپراکسید کاتالیز می کند. در حضور گلوکاتایون ردوکناز (GR) و NADPH، گلوکاتایون اکسید شده

میباشد (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 نیز ارتباط تنگاتنگی با اختلال عملکرد اندوتلیالی دارند (۴). این ریسک فاکتورها شامل انواع رادیکالهای آزاد اکسیژن، سوپراکسید، پراکسیداسیون لیپید، hs-CRP و عوامل دیگر میباشد که افزایش این رادیکالها ارتباط زیادی با اختلال در عملکرد اندوتلیالی در نوع حیوانی دارد همچنین مدارک زیادی از یک ارتباط بین استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد اندوتلیالی در انسانها به دست آمده است (۷-۵). فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت از قبیل سوپراکسید دیس موتاز (SOD)، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) در اریتروسیتهها و آنتی اکسیدانتها غیر آنزیماتیک 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 (۸ و ۱). مالون دی آلدئید (MDA) یک گروه کربونیل تولید شده در طی 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). اخیراً "نقص آنزیم NO سنتاز اندوتلیالی (eNOS) بطور وسیعی برای پلی مورفیسم های ژنی جهت توضیح نقش ژنتیک در بیماریهای عروقی مورد مطالعه قرار گرفته 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، T-786C 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 (شهر تبریز) فراوانی پلی مورفیسم T-786C در ژن eNOS در بیماران مبتلا به CAD مورد مطالعه قرار میگیرد. جهت پی بردن به ارتباط پلی مورفیسم T-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 (SOD, GPX, TAC) و پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) اندازه گیری و با گروه شاهد، مقایسه و ارتباط 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 از نوع توصیفی-مقایسه ای بوده و توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز تصویب گردیده است. در این مطالعه ۶۰ نفر از بیماران مبتلا به CAD مراجعه کننده به مرکز

شد. جهت کنترل PCR، پرایمر CO 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. ال C و T به ترتیب محصولات bp ۱۷۶ و bp ۲۵۰ تولید نمود.

داده های به دست آمده از مطالعه بوسیله روش های آماری توصیفی آزمون تفاوت میانگین (آزمون t) برای گروههای مستقل و آزمون رابطه مجذور کای (کای اسکور) 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 قرار گرفت. در این مطالعه مقدار $P < 0/05$ 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 58 ± 9 سال و در گروه شاهد 57 ± 5 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 $105/85 \pm 4/1$ و میانگین سطح گلوکز در گروه شاهد $98/13 \pm 19/81$ mg/dl بود. میانگین SOD در گروه بیمار $216/96 \pm 972/49$ U/gHb و در گروه کنترل $273/78 \pm 1317/32$ U/gHb بود. بررسی نتایج آزمون t (t-test) برای گروه های مستقل نشان داد که تفاوت میانگین SOD در دو گروه از لحاظ آماری معنی دار می باشد ($p < 0/001$).

میانگین GPX در گروه بیمار $10/09 \pm 40/61$ U/gHb و در گروه کنترل $8/85 \pm 48/23$ U/gHb 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 ($p < 0/001$).

میانگین ظرفیت توتال آنتی اکسیدانت (TAC) در بیماران مورد مطالعه $0/22 \pm 0/88$ mmol/l و در گروه کنترل $0/16 \pm 0/16$ mmol/l 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 ($p < 0/001$)، یعنی در حالت کل فعالیت آنزیمی SOD، GPX و TAC در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری کاهش یافته بود (جدول ۲).

میانگین MDA در گروه بیمار $3/39 \pm 1/19$ nmol/ml و در گروه کنترل $1/17 \pm 1/56$ mol/ml بود. بررسی نتایج آزمون t (t-test) برای گروه های مستقل نشان داد که تفاوت میانگین MDA در دو

(GSSG) فوراً 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 $37^{\circ}C$ صورت گرفت. اندازه گیری ظرفیت توتال آنتی اکسیدانت پلاسما (TAC) بروش کلریمتری (اسپکتروفتومتری) با استفاده از کیت RANDOX صورت گرفت. اساس آزمایش بدین شرح میباشد: ابتدا ترکیب ABTS (۲،۲-آزینو-دی-۳-اتیل بنزوتیازولین سولفات) با یک پراکسیداز (مت میوگلوبین) و H_2O_2 جهت سنتز رادیکال کاتیون $ABTS^+$ انکوبه می گردد. این ماده رنگ آبی - سبز نسبتاً پایدار 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 تیوباربیتریک اسید (TBA)، استخراج با بوتانل نرمال، اندازه گیری جذب با روش اسپکتروفتومتری و مقایسه جذب با منحنی استاندارد می باشد (۱۶ و ۱۷).

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 الهای C و T 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 ال C بود. ال T در پرایمر Forward معرفی

گروه از لحاظ آماری معنی دار می باشد ($p < 0/001$) یعنی سطوح MDA سرم در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری افزایش یافته بود (جدول ۲).

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 مورفیزم T-786C، قطعه ال ال C با اندازه ۱۷۶ جفت باز، قطعه ال 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

در دو گروه مورد مطالعه از لحاظ آماری معنی دار می باشد ($p = 0/03$). بررسی نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عامله نشان داد که تفاوت میانگین SOD در ژنوتیپ های مختلف از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد ($p = 0/86$)، همچنین بررسی اثرات تعاملی ژنوتیپ در دو گروه نیز از لحاظ آماری معنی دار نیست ($p > 0/05$) (جدول ۴).

بررسی نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عامله نشان داد که تفاوت میانگین GPX در ژنوتیپ های مختلف از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد ($p = 0/53$)، همچنین بررسی اثرات تعاملی ژنوتیپ در دو گروه نیز از لحاظ آماری معنی دار نیست ($p > 0/05$) (جدول ۴).

بررسی نتایج آزمون تحلیل واریانس دو عامله نشان داد که تفاوت میانگین MDA در ژنوتیپ های مختلف از لحاظ آماری معنی دار نمی باشد ($p = 0/65$)، همچنین بررسی اثرات تعاملی ژنوتیپ در دو گروه نیز از لحاظ آماری معنی دار نیست ($p > 0/05$) (جدول ۴).

جدول ۱: داده های بالینی گروه های بیمار و کنترل

P Value	کنترل (تعداد=۶۰) میانگین \pm انحراف معیار	بیماران (تعداد=۶۰) میانگین \pm انحراف معیار	مشخصات
	۳۰/۳۰	۳۰/۳۰	(مونث و مذکر) تعداد
	۵۷ \pm ۱۱	۵۸ \pm ۹	(سن) سال
$P = 0/04^*$	۲۲ (۳۶/۷٪)	۳۳ (۵۵٪)	** فشارخون، تعداد (/)
	۱۹ (۳۱/۷٪)	۲۵ (۴۱/۷٪)	سابقه فامیلی، تعداد (/)

* $P < 0/05$ معنی دار می باشد.
** واحد فشارخون = mmHg

جدول ۲: پارامترهای سطوح آنتی اکسیدانت ها و اکسیدانت ها در دو گروه بیمار و کنترل

P value*	کنترل (تعداد=۶۰) میانگین \pm انحراف معیار	بیماران (تعداد=۶۰) میانگین \pm انحراف معیار	پارامترها
$P < 0/001$	۱۳۱۷/۳۲ \pm ۲۷۳/۷۸	۹۷۲/۴۹ \pm ۲۱۶/۹۶	SOD(U/gHb)
$P < 0/001$	۴۸/۲۳ \pm ۸/۸۵	۴۰/۶۱ \pm ۱۰/۰۹	GPX(U/gHb)
$P < 0/001$	۱/۱۴ \pm ۰/۱۶	۰/۸۸ \pm ۰/۲۲	TAC(mmol/L)
$P < 0/001$	۱/۵۶ \pm ۰/۱۷	۳/۳۹ \pm ۱/۱۹	MDA(nmol/ml)

* $P < 0/05$ معنی دار می باشد.

جدول ۳: 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
تعداد	(۳۸٪)	(۴۶٪)	(۱۵٪)
گروه کنترل	۳۷	۱۸	۵
تعداد	(۶۱٪)	(۳۰٪)	(۸٪)

جدول ۴: آمار توصیفی مربوط به میانگین SOD, GPX و MDA در دو گروه و ژنوتیپ های مختلف

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

بحث

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 O_2^- منجر به مصرف بیشتر SOD در غشا گردیده و در نتیجه منتهی به کاهش SOD در خارج 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 اسیژن، 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 اسیژن، نیتروژن و تولید مواد دفاعی بدن از قبیل آنتی اکسیدانت ها وجود دارد و افزایش گونه های اسیژن منجر به استرس اکسیداتیو می شود. نتیجه استرس اکسیداتیو، شامل آسیب است که به DNA

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 آتروژنیزس 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 رداکاز (GR)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، سروپلاسمین و پروتئین ها از قبیل متالوتئین 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 سوپراکسید 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

باشد. ایشان یک موتاسیون T-786C در ناحیه Flanking-5' ژن eNOS پیدا نمودند که با اسپاسم کرونری ارتباط دارد (۳۰). وجود ال 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 T-786C eNOS منجر به ایجاد یک CAD زود هنگام و سکت قلبی حاد با خطرات زیاد می شود.

اخیراً "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 باشند. 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/4b4 و G894T می باشد.

در مطالعه حاضر یک افزایش معنی دار در ال C افراد بیمار در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید، بدین صورت که فراوانی ال C در حالت کل در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل بود یعنی مجموع درصد (TC+CC) در افراد بیمار بیشتر از 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. ال C وقتی به جای ال 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 ال C بر ال 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 ال C غالب بر ال 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 آترواسکلروز می باشند. این مطالعات نشان می دهد که مواد آنتی اکسیدانت می تواند در جلوگیری از آترواسکلروز 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 رژیم 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 ال C نیز می تواند در پیشرفت آترواسکلروز سهمی باشد.

وارد می شود و موتاسیون رخ می دهد همچنین منجر به مرگ سلولی (آپوپتوز) 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 تواند 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 آترواسکلروز ثابت نموده است (۲۸).

ژن eNOS در سنتز NO نقش بسزایی ایفا می کند. از بین 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 mRNA eNOS کاهش یافته و با سطوح نیتريت/نیترات سرم در ارتباط است. اندازه گیری های ژن eNOS و فعالیت های بانداینگ پروموتور اثرات پلی مورفیسم T-786C در روی فعالیت eNOS را تأیید 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 سکت قلبی، فشارخون، بیماری عروق کلیوی و بیماری عروق مغزی نخاعی را داشت (۱۱).

مطالعات دیگر در ژاپن نیز نشان می دهد که 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، ال C-786 می تواند با یک کاهش معنی داری از فعالیت پروموتور ژن eNOS ارتباط داشته

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. Soyduñç 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 dismutase. *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. Soyduñç 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.