



# ارتباط پلی مورفیسم های $c.*49T>C$ و $c.-932 G>A$ ژن CYBA با بیماری عروق کرونر: یک مطالعه مورد-شاهدی

## در جمعیت مردم کاشان

ظاهره مازوچی (PhD)<sup>۱</sup>، محمد کریمیان (PhD)<sup>۱\*</sup>، مجید مازوچی (MD)<sup>۲</sup>،

اباصلت حسین زاده کلاگر (PhD)<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابل، ایران

<sup>۳</sup> گروه قلب و عروق، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

(دریافت مقاله: ۹۵/۸/۸ - پذیرش مقاله: ۹۵/۱۲/۲۳)

### چکیده

زمینه: ژن CYBA (Cytochrome B-245 Alpha Chain; p22phox). کد کننده زیر واحد اصلی آنزیم NADH/NADPH-اکسیداز است. این آنزیم در سلولهای عضلات صاف دیواره رگها بیان می شود، که گونه های فعال اکسیژن را تولید می کنند. از سوی دیگر استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیماری عروق کرونر (Coronary Artery Disease; CAD) نقش اساسی دارد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم های  $rs9932581(c.-930G>A)$  و  $rs7195830(c.*49T>C)$ ، با بیماری عروق کرونر در یک جمعیت ایرانی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، نمونه های خون سیراته از ۱۸۰ فرد شامل ۸۵ بیمار مبتلا به بیماری عروق کرونر و ۹۵ فرد سالم جمع آوری شدند. قطعات حاوی هریک از پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی  $rs9932581$  و  $rs7195830$  ژن CYBA نمونه های DNA استخراج شده، با واکنش زنجیره ای پلیمرازی (PCR) تکثیر گردید. سپس ژنوتیپ آنها به روش Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) تعیین شد. آنالیز وابستگی ژنتیکی به وسیله آزمون رگرسیون لجستیک نیز بررسی شد.

یافته ها: آنالیز داده ها در مورد پلی مورفیسم  $c.-930G>A$  نشان داد که ارتباط معنی دار بین ژنوتیپ AA و ریسک ابتلا به CAD وجود دارد ( $OR: ۲/۷۱$  درصد،  $95CI: ۱/۰۴-۷/۰۶$ ،  $p=۰/۰۴۱$ ). همچنین آنالیز آلی نشان داد ارتباط معنی داری بین آلل A و ریسک ابتلا به CAD وجود دارد ( $OR: ۱/۶۵$  درصد،  $95 CI: ۱/۰۵-۲/۵۷$ ،  $p=۰/۰۲۹$ ). این در حالی است که هیچ ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم  $c.*49T>C$  و ریسک ابتلا به CAD مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که پلی مورفیسم  $c.-930G>A$  ممکن است در استعداد ابتلا به CAD نقش داشته باشد که می تواند به عنوان یک بیومارکر برای بررسی ها بیشتر توسط محققان مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: بیماری عروق کرونر، ژن CYBA، پلی مورفیسم ژنتیکی، کاشان

\*کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات علوم تشریحی

## مقدمه

بیماری عروق کرونر (Coronary Artery Disease; CAD) به عنوان رایج‌ترین فرم بیماری‌های قلبی و عروقی، یک بیماری چند عاملی با اتیولوژی پیچیده بوده که مجموعه‌ای از فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در بروز آن نقش دارد (۱ و ۲). بنابراین، هنگام ارزیابی علت CAD علاوه بر ریسک فاکتورهای سنتی از جمله فشار خون، دیابت، چربی خون و سیگار کشیدن، استعداد ژنتیکی هم باید در نظر گرفته شود (۳). استرس اکسیداتیو، نقش مهمی در شروع و پیشرفت تصلب شرایین به عنوان پاتوژنز اولیه بیماری عروق کرونر بازی می‌کند (۴). تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در اثر عدم تعادل در سیستم‌های اکسیداتیو-آنتی اکسیداتیو، منجر به حوادث التهابی در سلول‌های ایمنی و اندوتلیال می‌شود (۵).

اکسیدازهای NADH/NADPH، مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در سیستم ایمنی ذاتی هستند که گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species, ROS) را تولید می‌کنند. آنها اغلب در سلول‌های عضله صاف عروق (vascular smooth muscle cells, VSMC)، سلول‌های اندوتلیال و فاگوسیت‌ها بیان می‌شوند (۶). آنزیم NADH/NADPH-اکسیداز فاگوسیتیک یک فلاوپروتئین مرتبط با غشاء است که شامل دو زیر واحد غشایی اصلی gp91phox (nox2) و p22phox و سه پروتئین سیتوزولی p40phox، p47phox و p67phox می‌باشد (۷). سایر ایزوفرم‌های NOX، در سلول‌های تیروئید و کلون بیان می‌شوند و با زیر واحد p22phox جفت می‌شوند (۸). زیر واحد p22phox که جز اساسی برای عملکرد اکسیدازهای NADH/NADPH محسوب می‌شود به زنجیره سبک سیتوکروم b نوترفیل‌های انسانی یا CYBA

(human neutrophil cytochrome b light chain) نیز معروف است (۹). سیستم NADPH-اکسیداز ممکن است در پاتوفیزیولوژی بیماری عروق کرونر دخیل باشد. این سیستم منبع غالب تولید ROS در سلول‌های عروقی است (۱۰). علاوه بر این، بیان p22phox در عروق کرونر آترواسکلروتیک انسان نسبت به شریان غیر آترواسکلروتیک بالاتر می‌باشد (۱۱).

ژن CYBA، روی بازوی بزرگ کروموزوم ۱۶ (16q24) قرار دارد و زیر واحد p22phox را کد می‌کند (۱۲). از میان انواع پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی گزارش شده مطالعات زیادی روی دو پلی‌مورفیسم rs4673 (c.214 T>C) و rs1049255 (c.\*24G>A) و ارتباط آنها با بیماری عروق کرونر انجام شدند (۱۳ و ۱۴). هدف این مطالعه بررسی ارتباط دو پلی‌مورفیسم‌های ژن CYBA شامل: rs7195830 (c.\*49T>C) که روی ناحیه 3'UTR ژن قرار داد و پلی‌مورفیسم rs9932581 (c.-930G>A) که در بالا دست ژن قرار دارد، با بیماری عروق کرونر، در یک جمعیت ایرانی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

## گروه بیمار و شاهد

در این مطالعه مورد شاهدهی، ۱۸۰ نفر شامل ۸۵ بیمار مبتلا به بیماری عروق کرونر (CAD) و ۹۵ فرد سالم با سن مشابه شرکت کردند. گروه بیمار از میان مبتلایان به CAD پذیرش شده در بخش کاردیولوژی بیمارستان شهید بهشتی کاشان (کاشان، ایران) در سال‌های ۱۳۹۳ و

۱۳۹۴ انتخاب شدند. همه افراد وارد شده به مطالعه، سن بالاتر از ۵۵ سال داشتند. بیماری عروق کرونر با مشخصه تنگی حداقل ۵۰ درصد در بیش از یک رگ کرونر با آنژیوگرافی تأیید شد. بیماران با سابقه کاردیوواسکولار، بیماری کلیوی، کبدی، دیابت ملیتوس، فشار خون، بدخیمی، علائم بالینی اختلال انعقادی، کلاژنوزیس و مسمومیت حاد (مانند آمفتامین و CO) از مطالعه خارج شدند. افراد گروه کنترل از میان مراجعان به بیمارستان شهید بهشتی کاشان جهت چکاپ و آزمایشات روتین، انتخاب شدند. معیارهای خروج از مطالعه برای افراد سالم

عبارت بود از: نشانه‌های CHD (از قبیل تنگی نفس و درد قفسه سینه در حالت فعالیت و استراحت)، انفارکتوس میوکارد، دیابت، فشار خون و دیگر بیماری‌های ژنتیکی و خانوادگی. برخی از مشخصات بالینی گروه بیمار و کنترل در جدول ۱ ارایه شدند. در نهایت از هریک از افراد مورد مطالعه، ۲ سی سی خون در لوله‌های خونگیری سیترا، جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. فرم رضایت آگاهانه از هریک از افراد مورد مطالعه گرفته شد.

جدول (۱) مقایسه ویژگی‌های بالینی بین گروه کنترل و بیمار			
متغیرها	بیمار (n=۸۵)	سالم (n=۹۵)	p-value
جنسیت	مرد	۴۵ (۵۲/۹۴٪)	۰/۹۲۱
	زن	۴۰ (۴۷/۰۶٪)	۰/۰۲۳
سیگاری	بله	۳۴ (۴۰/۰۰٪)	۰/۰۳۳
	خیر	۵۱ (۶۰/۰۰٪)	۰/۰۳۳
سن (سال)	۶۲/۳۷±۳/۲۱	۶۱/۶۸±۴/۲۸	۰/۲۲۷
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	۲۶/۱۳±۲/۴۵	۲۴/۹۸±۲/۲۷	۰/۰۰۱
HDL (mg/dl)	۴۴/۱۳±۵/۰۴	۴۲/۶۷±۲/۰۴	۰/۰۳۳
LDL (mg/dl)	۱۱۸/۰۵±۱۸/۳۱	۱۱۴/۰۴±۱۲/۵۵	۰/۰۸۶
TG (mg/dl)	۱۳۹/۴۴±۲۶/۹۳	۱۳۳/۲۷±۲۸/۰۳	۰/۱۳۵
TC (mg/dl)	۱۴۳/۶۷±۲۵/۹۴	۱۴۱/۴۳±۲۳/۱۳	۰/۵۴۲

مقادیر داده‌های کمی به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.  
 BMI: Body mass index, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low-density lipoprotein, TG: Triglycerides, TC: Total cholesterol

در این مطالعه، افراد پس از اخذ رضایت نامه کتبی وارد مطالعه شدند. رضایت‌نامه شامل معرفی پژوهش، بیان مزایا و خطرات، راه حل برای جبران خطرات، روش نمونه‌گیری یا سایر خدمات، محرمانه بودن این مطالعه، پاسخگویی به پرسش‌ها و حق انصراف در خروج از مطالعه می‌باشد. بیمار با آگاهی کامل از موارد فوق رضایت خود را به عنوان یک فرد مورد مطالعه در پژوهش اعلام می‌دارد. کلیه اطلاعاتی که از بیمار گرفته می‌شود و نیز نام وی محرمانه باقی خواهد ماند و نتایج تحقیقات به صورت کلی و در قالب اطلاعات گروه مورد

مطالعه منتشر می‌گردد و نتایج فردی در صورت نیاز بدون ذکر نام و مشخصات فردی عرضه خواهد گردید.

### تعیین ژنوتیپ

ژنوم نمونه‌های خونی به وسیله کیت استخراج DNA (Bioneer Co. Korea)، استخراج شد. جهت تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم‌های  $c.49T>C$  و  $c.-930G>A$  از روش PCR-RFLP استفاده شد. به این منظور، ابتدا قطعات حاوی پلی‌مورفیسم‌های فوق به وسیله پرایمرهای اختصاصی و شرایط ارائه شده در جدول ۲ تکثیر شدند.

جدول ۲) توالی پرایمرها و شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز			
اندازه محصول (bp)	شرایط PCR	توالی پرایمر (5'→3')	پلی مورفیسم (rs No.)
۱۷۴	۳۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۷ درجه سانتی‌گراد و ۷۲ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد	5'-GTGCACCCACCTGCAATACA	c.*49T>C (rs7195830)
		5'-TGCTGAGAAGGAAGGCGATG	
۱۵۵	۳۰ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۷۲ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد	5'-GGGGAATAAAACCAGCATT	c.-930G>A (rs9932581)
		5'-GGCTCTGAACAGCCTGCC	

میکروگرم) از محصولات PCR حاوی پلی‌مورفیسم‌های c.\*49T>C و c.-930G>A به ترتیب با ۵ واحد از آنزیم‌های محدودکننده NspI (شرکت فرمتاز، آلمان) و Fnu4HI (شرکت فرمتاز، آلمان) تیمار شدند (جدول ۳). ژنوتیپ نمونه‌ها به وسیله الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد تشخیص داده شد. همچنین ژل‌های پلی‌اکریل آمید با نیترا ت نقره به روش عمومی رنگ‌آمیزی شدند (۱۵).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترمال سایکلر گرایان اپندورف (Hamburg, Germany). Eppendorf Co. و در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲۵ میکرومولار از هریک از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۱۰۰ میکرومولار مخلوط dNTP (شرکت فرمتاز، آلمان)، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز (شرکت فرمتاز، آلمان) و ۵۰ نانوگرم از DNA الگو انجام شد. حدود ۱۰ میکرولیتر (۱/۰)

جدول ۳) شرایط تیمار با آنزیم‌های محدودکننده					
محصولات هضم آنزیمی (bp)			ناحیه برش	آنزیم محدودکننده	پلی مورفیسم (rs No.)
هتروزیگوت	ژنوتیپ موتانت	ژنوتیپ وحشی			
۲۲ و ۱۵۲، ۱۷۴	۱۷۴	۲۲ و ۱۵۲	RCATG^Y	NspI	c.*49T>C (rs7195830)
۲۰ و ۱۳۵، ۱۵۵	۱۵۵	۲۰ و ۱۳۵	GC^NGC	Fnu4HI	c.-930G>A (rs9932581)

### یافته‌ها

#### الگوی تعیین ژنوتیپ

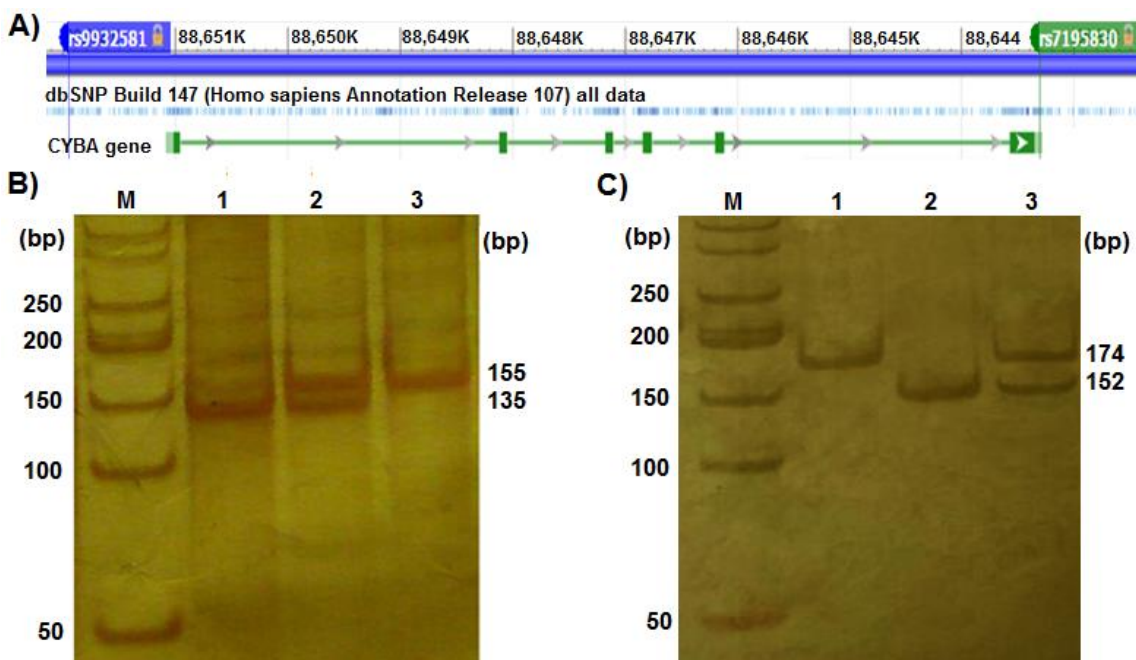
بعد از الکتروفورز، ژنوم انسان یک باند اصلی با تحرک پایین روی ژل آگارز نشان داد. هنگامیکه ژنوم انسان به‌عنوان الگو در PCR استفاده شد، قطعات CYBA حاوی c.\*49T>C و c.-930G>A به ترتیب با اندازه‌های ۱۷۴bp و ۱۵۵bp تولید شد. بعد از الکتروفورز محصولات دایجست شده پلی‌مورفیسم c.\*49T>C، ژنوتیپ‌های TT، TC و CC به ترتیب دو (۱۵۲bp و ۲۲bp)، سه (۱۷۴bp)

#### آنالیز آماری

جهت آنالیز داده‌های کمی از آزمون T مستقل استفاده شد. متغیرهای کیفی جنسیت و وضعیت سیگاری بودن به‌وسیله تست کای مربع مقایسه شدند. تعادل هاردی-و اینبرگ به وسیله تست مربع کای بررسی شدند. ارتباط بین واریانت‌های ژنتیکی c.\*49T>C و c.-930G>A ژن CYBA با بیماری عروق کرونر با استفاده از آنالیز آماری رگرسیون لجستیک و محاسبه OR بافاصله اطمینان ۹۵ درصد به‌وسیله نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ مورد بررسی قرار گرفت.

ترتیب دو (۱۳۵bp و ۲۰bp)، سه (۱۵۵bp، ۱۳۵bp و ۲۰bp) و یک (۲۰bp) باند روی ژل پلی اکریل آمید نشان دادند (شکل ۱).

۱۵۲bp و ۲۲bp) و یک (۱۷۴bp) باند روی ژل پلی اکریل آمید نشان دادند. اما در مورد پلی مورفیسیم c.-930G>A، ژنوتیپ‌های AA و GA، GG به



شکل ۱) نقشه ژن *CYBA* و نتایج PCR-RFLP در ژل پلی آکرلامید ۸ درصد: نقشه ژنی *CYBA* انسانی که از پایگاه داده NCBI به دست آمد، حاوی ۶ اگزون و SNP‌های متعدد می‌باشد و پلی مورفیسیم‌های c.-930G>A و c.\*49T>C به ترتیب روی پروموتور و 3'UTR ژن قرار گرفته‌اند (A)؛ آلگوی برش قطعه ۱۵۵bp حاوی پلی مورفیسیم c.-930G>A تیمار شده با آنزیم *Fnu4HI* (لاین M: مارکر DNA، لاین ۱: ژنوتیپ GG، لاین ۲: ژنوتیپ GA، لاین ۳: ژنوتیپ AA) (B). آلگوی برش قطعه ۱۷۴bp حاوی پلی مورفیسیم c.\*49T>C تیمار شده با آنزیم *NspI* (لاین M: مارکر DNA، لاین ۱: ژنوتیپ CC، لاین ۲: ژنوتیپ TC، لاین ۳: ژنوتیپ CC) (C).

توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی  
آنالیز آماری نشان داد که توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها برای  
پلی مورفیسیم‌های (P=۰/۵۴۶،  $\chi^2=۰/۳۶۴$ ) c.-930G>A و (P=۰/۰۸۲،  $\chi^2=۳/۰۳۰$ ) c.\*49T>C در  
گروه کنترل در تعادل هاردی واینبرگ می‌باشد. فراوانی  
آللی و ژنوتیپی پلی مورفیسیم‌های مذکور در گروه بیمار  
و کنترل در جدول ۴ نشان داده شده است.

توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی  
آنالیز آماری نشان داد که توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها برای  
پلی مورفیسیم‌های (P=۰/۵۴۶،  $\chi^2=۰/۳۶۴$ ) c.-930G>A و (P=۰/۰۸۲،  $\chi^2=۳/۰۳۰$ ) c.\*49T>C در  
گروه کنترل در تعادل هاردی واینبرگ می‌باشد. فراوانی  
آللی و ژنوتیپی پلی مورفیسیم‌های مذکور در گروه بیمار  
و کنترل در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴) فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی‌مورفیسم‌های c.930G>A و c.49T>C در گروه سالم و بیمار				
p-value	(95% CI) OR	تعداد (درصد)		ژنوتیپ/آلل
		بیمار (n=۸۵)	سالم (n=۹۵)	
-	-	۳۶ (۴۲/۳۵٪)	۵۲ (۵۴/۷۴٪)	GG
۰/۲۹۶	(۰/۷۴-۲/۶۵)۱/۴۰	۳۴ (۴۰/۰۰٪)	۳۵ (۳۶/۸۴٪)	GA
۰/۰۴۱	(۱/۰۴-۷/۰۶)۲/۷۱	۱۵ (۱۷/۶۵٪)	۸ (۰۸/۴۲٪)	AA
۰/۰۹۸	(۰/۹۱-۲/۹۷)۱/۶۵	۴۹ (۵۷/۶۵٪)	۴۳ (۲۸/۴۲٪)	GA+AA
-	-	۱۰۶ (۶۲/۳۵٪)	۱۳۹ (۷۳/۱۶٪)	G
۰/۰۲۹	(۱/۰۵-۲/۵۷)۱/۶۵	۶۴ (۳۷/۶۵٪)	۵۱ (۲۶/۸۴٪)	A
-	-	۱۸ (۲۱/۱۸٪)	۲۷ (۲۸/۴۲٪)	TT
۰/۱۶۱	(۰/۸۱-۳/۵۳)۱/۶۹	۴۴ (۵۱/۷۶٪)	۳۹ (۴۱/۰۵٪)	TC
۰/۶۷۴	(۰/۵۳-۲/۶۷)۱/۱۹	۲۳ (۲۷/۰۶٪)	۲۹ (۳۰/۵۳٪)	CC
۰/۲۶۴	(۰/۷۴-۲/۹۳)۱/۴۸	۶۷ (۷۸/۸۲٪)	۶۸ (۷۱/۵۸٪)	TC+CC
-	-	۸۰ (۴۷/۰۶٪)	۹۳ (۴۸/۹۵٪)	T
۰/۷۲۰	(۰/۷۱-۱/۶۳)۱/۰۸	۹۰ (۵۲/۹۴٪)	۹۷ (۵۱/۰۵٪)	C

تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه بیمار و سالم با \* نشان داده شد.

داد که آلل C فاقد ارتباط معنی‌دار با ریسک CAD می‌باشد (جدول ۴).

### بحث

امروزه بیماری عروق کرونر یک مشکل بالینی مهمی در دنیا محسوب می‌شود (۱۶). از آنجایی که با وجود پیشرفت‌های موجود در این زمینه، پیشگیری همچنان بهترین شیوه مقابله با CAD محسوب می‌شود، شناسایی فاکتورهای خطر آن، از اهمیت بسزایی برخوردار است. فاکتورهای ژنتیکی زیادی در افزایش خطر ابتلا به CAD وجود دارد (۱۹-۱۷). پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در ژن‌های دخیل در استرس اکسیداتیو از جمله ژن CYBA می‌تواند ریسک فاکتور مهمی برای CAD محسوب شود (۱۴). در این مطالعه ارتباط پلی‌مورفیسم‌های c.930G>A و c.49T>C ژن فوق با CAD در یک جمعیت ایرانی بررسی شد. نتایج مطالعه ما نشان داد که ژنوتیپ AA و آلل A از پلی‌مورفیسم c.930G>A ارتباط معناداری با افزایش

در مورد پلی‌مورفیسم c.930G>A و با توجه به اطلاعات جدول ۴، فراوانی ژنوتیپ‌های AA و GA در گروه بیمار بیشتر از افراد سالم بود ولی در مورد ژنوتیپ GG، فراوانی آن در گروه سالم بیشتر از گروه بیمار بود. آنالیز ژنوتیپ‌ها نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ AA و ریسک ابتلا به CAD وجود دارد بگونه‌ای که ریسک ابتلا به بیماری CAD در افراد بیمار برابر افراد سالم بوده است. آنالیز آللی هم نشان داد که یک ارتباط معنی‌داری بین آلل A و ریسک ابتلا به CAD وجود دارد به طوری که ریسک ابتلا به این بیماری برای آلل A، ۱/۶۵ برابر آلل G بود. ارزیابی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم c.49T>C، نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت (TT و CC) در گروه سالم بیشتر از گروه بیمار است در حالی که فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت TC در گروه بیمار بیشتر بود. آنالیز آماری ژنوتیپ‌ها نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های TC و CC با ریسک ابتلا به بیماری عروق کرونر وجود ندارد ( $P > 0/05$ ). همچنین آنالیز آللی نشان

بالادستی ژن ممکن است باعث تغییر تمایل اتصال فاکتورهای رونویسی با پروموتور و در نهایت تغییر بیان ژن شود (۲۹). از سوی دیگر چون پلی مورفیسیم  $c.*49T>C$  در ناحیه 3'UTR ژن واقع شد که آن هم می تواند با مکانیسم هایی همچون تغییر تمایل miRNA، بیان ژن CYBA را تغییر دهد (۳۰). بنابراین مطالعات بعدی می تواند با تأثیر پلی مورفیسیم های فوق بر بیان ژن CYBA با یک رویکرد بیوانفورماتیک متمرکز شود.

یکی از محدودیت های این مطالعه عدم آنژیوگرافی افراد گروه کنترل می باشد. برخی از موارد دیگر هم جزو محدودیت های این مطالعه محسوب می شوند. مثلاً افراد حاضر در گروه بیمار و سالم از لحاظ BMI و HDL، یکسان نبودند. همچنین جامعه آماری این مطالعه نسبتاً کوچک است و باید مطالعات بیشتر با جامعه آماری بزرگ تر در نژادهای مختلف انجام شود. همچنین مطالعات بعدی با در نظر گرفتن اینترکشن های ژن-ژن و ژن-محیط نیاز است.

#### نتیجه گیری

نتایج مطالعه ما نشان می دهد که پلی مورفیسیم  $c.-932G>A$  می تواند به عنوان یک فاکتور خطر برای CAD در جمعیت کاشان-ایران مورد توجه محققین قرار گیرد. در صورت انجام مطالعات تکمیلی، پلی مورفیسیم فوق می تواند به عنوان یک بیومارکر مناسب جهت غربالگری افراد مستعد ابتلا به CAD بکار گرفته شود. از طرف دیگر پلی مورفیسیم  $c.*49T>C$  ارتباطی با خطر ابتلا به بیماری عروق کرونر را نشان نداد. در حالی که پیش بینی می شد این پلی مورفیسیم بتواند تمایل اتصال miRNA با 3'UTR ژن را تغییر دهد که پیشنهاد می شود مطالعه آن برای

ریسک CAD دارد. اما آنالیز پلی مورفیسیم  $c.*49T>C$  نشان داد که ژنوتیپ های CC و TC و همچنین آلل C، فاقد ارتباط معنی داری با ریسک CAD می باشند.

تاکنون مطالعات کمی در مورد ارتباط پلی مورفیسیم های  $c.*49T>C$  و  $c.-930G>A$  ژن CYBA و ریسک CAD انجام شده است. مطالعه نیمیچ (Niemiec) و همکاران، نشان دادند که آلل 930G- پلی مورفیسیم  $c.-930G>A$  با افزایش ریسک بیماری عروق کرونر ارتباط دارد (۲۰). مطالعه نواک (Nowak) و همکاران، نشان داد که پلی مورفیسیم  $c.*49T>C$  ژن CYBA با ریسک ابتلا به CAD ارتباط معنی داری دارد (۲۱). برخی اختلافات جزئی نتایج حاصل از مطالعات مشابه می تواند به دلیل تأثیر فاکتورهای نژادی و محیطی باشد. ارتباط موتاسیون های ژن CYBA با ریسک CAD توسط یکسری از مکانیسم های مولکولی توجیه می شود. برخی از یافته های تجربی حاکی از نقش پاتوفیزیولوژیک برخی پلی مورفیسیم های ژن CYBA هستند که برخی از آنها قادر به تغییر بیان و فعالیت ژن NADPH اکسیداز در زمینه بیماری های قلبی عروقی هستند (۲۲). برای مثال، در یک مدل حیوانی فشار خون بالای ژنتیکی، فعالیت NADPH اکسیداز آنورتی و بیان p22phox در رت های با فشار خون بالا در مقایسه با رت های نرمال افزایش یافته است، و پیشنهاد شده است که این تغییر بیان p22phox ممکن است توسط واریته های ژنتیکی در ژن p22phox تنظیم شود (۲۳). مطالعات وابستگی ژنتیکی قبلی ما نشان داد که آنالیز *in silico*، ابزار مناسبی جهت بررسی اثر پلی مورفیسیم بر روی ساختار mRNA (۲۴ و ۲۵)، عملکرد پروتئین (۲۶ و ۲۷) و بیان ژن (۲۸) می باشد. پلی مورفیسیم  $c.-930G>A$  یک ترانزیشن پروموتوری می باشد و در بالادست ژن قرار گرفته است. این تغییر در ناحیه



بررسی‌های بیشتر در جمعیت‌های بزرگ صورت پذیرد.

شاهدی تقدیر و تشکر می‌نماییم.

### سپاس و قدردانی

از همه کسانی که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند به‌خصوص شرکت کنندگان حاضر در مطالعه مورد-

### تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

### References:

1. Shafiei E, Fouladi Z, Shafiei P. The safe interval time of crystalloid cardioplegic solution transfusion during CABG. *Iran South Med J*. 2015; 18(1): 71-79.
2. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease an update. *Hypertension* 2001; 37(4): 1053-9.
3. Pjanic M, Miller CL, Wirka R, et al. Genetics and genomics of coronary artery disease. *Curr Cardiol Rep* 2016; 18(10): 102.
4. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(1): 29-38.
5. Qin B, Yang H, Xiao B, et al. Role of microRNAs in endothelial inflammation and senescence. *Mol Biol Rep* 2012; 39(4): 4509-18.
6. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20(17): 2794-814.
7. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 2: S170-80.
8. Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, et al. NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 2000; 254(1-2): 237-43.
9. Uenno N, Takeya R, Miyano K, et al. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem* 2005; 280(24): 23328-39.
10. Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 1994; 266(6 Pt 2): H2568-72.
11. Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105(12): 1429-35.
12. Liang B, Wei Q, Shen T, et al. The A640G polymorphism in the NAD (P) H oxidase p22phox gene (CYBA) is associated with risk reduction of coronary heart disease: a meta-analysis. *Clin Biochem* 2014; 47(6):409-16.
13. Najafi M, Alipoor B, Shabani M, et al. Association between rs4673 (C/T) and rs13306294 (A/G) haplotypes of NAD (P) H oxidase p22phox gene and severity of stenosis in coronary arteries. *Gene* 2012; 499(1): 213-7.
14. Hu P, Huang MY, Hu XY, et al. Meta-analysis of C242T polymorphism in CYBA genes: risk of acute coronary syndrome is lower in Asians but not in Caucasians. *J Zhejiang Univ Sci B* 2015; 16(5): 370-9.
15. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012, 104-111.
16. Pollock A, Jones DS. Coronary artery disease and the contours of pharmaceuticalization. *Soc Sci Med* 2015; 131: 221-7.
17. Raygan F, Karimian M, Rezaeian A, et al. Angiotensinogen-M235T as a risk factor for myocardial infarction in Asian populations: a genetic association study and a bioinformatics approach. *Croat Med J* 2016; 57(4): 351-62.
18. Mazaheri M, Karimian M, Behjati M, et al. Association analysis of rs1049255 and rs4673 transitions in p22phox gene with coronary



- artery disease: A case-control study and a computational analysis. *Ir J Med Sci* 2017; 1-8.
19. McClelland RL, Jorgensen NW, Budoff M, et al. 10-year coronary heart disease risk prediction using coronary artery calcium and traditional risk factors: derivation in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) with validation in the HNR (Heinz Nixdorf Recall) study and the DHS (Dallas Heart Study). *J Am Coll Cardiol* 2015; 66(15): 1643-53.
20. Niemiec P, Nowak T, Iwanicki T, et al. The -930A> G polymorphism of the CYBA gene is associated with premature coronary artery disease. A case-control study and gene-risk factors interactions. *Mol Bio Rep* 2014; 41(5): 3287-94.
21. Nowak T, Niemiec P, Górczyńska-Kosiorz S, et al. The CYBA gene 49A> G polymorphism (rs7195830) is associated with hypertension in patients with coronary artery disease. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 1539671.
22. Zalba G, San José G, Moreno MU, et al. NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22phox gene in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(9-10): 1327-36.
23. Zalba G, Beaumont FJ, San José G, et al. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 35(5): 1055-61.
24. Karimian M, Hosseinzadeh Colagar A. Human MTHFR-G1793A transition may be a protective mutation against male infertility: a genetic association study and in silico analysis. *Hum Fertil* 2017; 1-9.
25. Nikzad H, Karimian M, Sareban K, et al. MTHFR-Ala222Val and male infertility: a study in Iranian men, an updated meta-analysis and an in silico analysis. *Reprod Biomed Online* 2015; 31(5): 668-80.
26. Karimian M, Hosseinzadeh Colagar A. Methionine synthase A2756G transition might be a risk factor for male infertility: evidences from seven case-control studies. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 425: 1-10.
27. Karimian M, Colagar AH. Association of C677T transition of the human methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene with male infertility. *Reprod Fertil Dev* 2016; 28(6): 785-94.
28. Jamali S, Karimian M, Nikzad H, et al. The c.-190 C> A transversion in promoter region of protamine1 gene as a genetic risk factor for idiopathic oligozoospermia. *Mol Biol Rep* 2016; 43(8): 795-802.
29. Guo Y, Jamison DC. The distribution of SNPs in human gene regulatory regions. *BMC Genomics* 2005; 6: 140.
30. Haas U, Sczakiel G, Laufer S. MicroRNA-mediated regulation of gene expression is affected by disease-associated SNPs within the 3'-UTR via altered RNA structure. *RNA Biol* 2012; 9(6): 924-37.

Original Article

# Association of c.\*49T>C and c.-932 G>A Polymorphisms of *CYBA* Gene with Coronary Artery Disease: a Case-Control Study in Kashan Population

T. Mazoochi (PhD)<sup>1</sup>, M. Karimian (PhD)<sup>1,2\*</sup>, M. Mazoochi (MD)<sup>3</sup>,  
A. Hosseinzadeh Colagar (PhD)<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

<sup>2</sup> Department of Molecular and Cell Biology, School of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

<sup>3</sup> Department of Cardiology, School of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

(Received 20 Oct, 2016 Accepted 13 Mar, 2017)

## Abstract

**Background:** The *CYBA* (Cytochrome B-245 Alpha Chain; *p22phox*) gene encodes an essential subunit of NADH/NADPH-oxidase. This enzyme expressed in smooth muscle cells of arteries which produces the active oxygen species. On the other hand oxidative stress has a significant role in the pathogenesis of coronary artery disease (CAD). The aim of this study was to investigate the association of rs7195830 (c.\*49T>C) and rs9932581 (c.-930G>A) polymorphisms in *CYBA* gene with coronary artery disease in an Iranian population.

**Materials and Methods:** In this case-control study, citrated blood samples were obtained from 180 subjects including 85 patient with CAD and 95 healthy people. The fragments containing rs7195830 and rs9932581 of *CYBA* gene from extracted genome were amplified by polymerase chain reaction. Then the genotype of samples was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. Genetic association analysis was assessed by logistic regression test.

**Results:** Data analysis of c.-930G>A polymorphism revealed a significant association between AA genotype and risk of CAD (OR: 2.71, 95%CI: 1.04-7.06,  $p=0.041$ ). Also, allelic analysis revealed that there was a significant association between A allele and CAD risk (OR: 1.65, 95%CI: 1.05-2.57,  $p=0.029$ ), while there was no significant association between c.\*49T>C polymorphism and risk of CAD.

**Conclusion:** Findings showed that, the c.-930G>A polymorphism may have some role in the susceptibility to CAD. which it can consider as a potential biomarker in further researches.

**Key words:** Coronary artery disease, *CYBA* gene, Genetic polymorphism, Kashan

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Mazoochi T, Karimian M, Mazoochi M, Hosseinzadeh Colagar. Association of c.\*49T>C and c.-932 G>A Polymorphisms of *CYBA* Gene with Coronary Artery Disease: a Case-Control Study in Kashan Population. Iran South Med J 2017; 20(5): 416-425

Copyright © 2017 Mazoochi, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

\*Address for correspondence: Department of Molecular and Cell Biology, School of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. Email: mdkarimian@gmail.com

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>

[www.SID.ir](http://www.SID.ir)