Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۷ ،شماره ۲، اردیبهشت ۱۳۸۸، ۱۰۰-۹۴

# عدم ارتباط چند شکلی‌های A - 7G و T - 138C ژن MGP با بیماری عروق کرونر در بیماران ایرانی

مریم عبیری،[۱] سعید صادقیان،[۲]
الهام حکی،[۳] محمدعلی برومند،[۴]
پروین مهدی‌پور،[۱] منیژه ایزدی،[۱]
محمد کرامتی‌پور*[۱]

۱- گروه ژنتیک پزشکی
۲- گروه قلب و عروق بیمارستان قلب تهران
۳- بیمارستان قلب تهران
۴- گروه پاتولوژی، بیمارستان قلب تهران

دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول، تهران، خیابان پورسینا، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه ژنتیک پزشکی
تلفن: ۸۸۹۵۳۰۰۵
email: Keramatipour@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۰/۰۹

## چکیده

***زمینه و هدف:*** بیماری عروق کرونر Coronary Artery Disease (CAD) از شایع‌ترین علل مرگ و میر در همه کشورها از جمله ایران می‌باشد. از عوامل مستعدکننده بیماری، سابقه خانوادگی مثبت است که اشاره به ماهیت ژنتیکی CAD دارد. شناخت فاکتورهای ژنتیکی مستعدکننده به CAD، برای شناسایی افراد در معرض خطر بسیار مهم است. تغییر در فاکتورهای محیطی مستعدکننده و احیانا تداخلات دارویی در این افراد، می‌تواند نقش اساسی در پیشگیری از بیماری داشته باشد. بررسی‌های ژنتیکی تاکنون نقش بیش از ۱۰۰ ژن را در ابتلا به CAD نشان داده‌اند. ژن Matrix Gla Protein (MGP) از جمله ژن‌هایی می‌باشد که نقش چندشکلی‌های آن در جایگاه‌های ۷- و ۱۳۸- در پرموتور ژن، در ایجاد خطر ابتلا به CAD در بعضی از جمعیت‌ها گزارش شده است. مطالعه حاضر به بررسی نقش چندشکلی‌های مذکور در ایجاد خطر ابتلا به CAD، در جمعیت ایرانی پرداخته است. ***روش بررسی:*** ۱۵۰ فرد مبتلا و ۱۵۰ شاهد مناسب بر اساس علائم کلینکی و نتایج آنژیوگرافی انتخاب و از نمونه‌های خون DNA استخراج گردید و ژنوتیپ نمونه‌ها در هر دو چندشکلی با روش Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) و راندن محصولات روی ژل پلی‌آکریل آمید مشخص گردید. ***یافته‌ها:*** مقایسه فراوانی ژنوتیپی و آللی بین گروه بیماران و شاهد نشان داد که آلل A در جایگاه ۷- و آلل T در جایگاه ۱۳۸- در بین بیماران بیشتر از گروه شاهد می‌باشد. هر چند این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد (به ترتیب $p<0/2$ و $p<0/5$). ***نتیجه‌گیری:*** نتایج حاصل پیشنهادکننده عدم همبستگی چند شکلی‌های مذکور با CAD در جمعیت ایرانی می‌باشد. تایید قطعی این امر نیازمند تکرار مطالعات مشابه می‌باشد.

***کلمات کلیدی:*** بیماری عروق کرونر (CAD)، ژن MGP، چندشکلی

## مقدمه

بیماری عروق کرونر Coronary Artery Disease (CAD) از شایع‌ترین علت مرگ و میر در دنیا بوده و به نظر می‌رسد تا سال ۲۰۲۰ به عنوان مهمترین علت مرگ و میر در جهان باقی بماند.[۱] در کشور ما نیز سالیانه تعداد زیادی از مردم به این بیماری مبتلا شده و بار سنگینی را بر روی سیستم بهداشت و درمان کشور تحمیل می‌نماید. بنابراین شناخت افراد با ریسک بالای ابتلا به بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. خوشبختانه پیش‌بینی خطر ابتلا به این بیماری تا حدودی به‌وسیله فاکتورهای مرتبط با آن شامل سابقه خانوادگی ابتلا به بیماری، سطح بالای چربی‌های خون، وزن بیش از حد طبیعی، فشارخون بالا و استعمال سیگار قابل سنجش است.[۲] در میان عوامل مذکور سابقه خانوادگی مثبت از اهمیت بالایی برخوردار است، چرا که اشاره به نقش ژنتیک در ایجاد CAD دارد.[۲] مخصوصاً مطالعات جدید در CAD زودرس، نقش برجسته‌ای را برای فاکتورهای ژنتیکی نشان داده‌اند. بررسی‌های متفاوت ژنتیکی در انسان و مدل‌های حیوانی مثل موش، تاکنون نقش بیش از ۱۰۰ ژن را در ابتلا به CAD به‌وسیله ایجاد پلاک‌های آترواسکلروزی نشان داده‌اند.[۳] ارتباط تعداد زیادی از این ژن‌ها با CAD، در مطالعات انسانی، مخصوصاً مطالعات همبستگی (Association Study) نشان داده شده است. به‌طور کلی مطالعات همبستگی روش بسیار قدرتمندی در شناخت واریانت‌های ژنتیکی ایجادکننده ریسک برای بیماری‌های چندعاملی (Complex, Multifactorial or Common Disorders) از



www.SID.ir

Archive of SID



جمله CAD می‌باشد. از جمله ژن‌هایی که همبستگی آن با CAD اثبات شده ژن MGP است.[۴و۵] MGP یک مهارکننده مهم کلسیفیکاسیون در غضروف‌ها و همچنین در جدار عروق می‌باشد که بیان آن در سلول‌های عضله صاف جدار عروق و همچنین در پلاک‌های آترواسکلروزی نشان داده شده است.[۶-۸] ژن MGP حاوی تعدادی Single Nucleotide Polymorphism (SNP) می‌باشد که از میان آنها دو SNP واقع در پرموتور، در نوکلئوتیدهای ۷- و ۱۳۸- به‌دلیل مجاورت با توالی‌های تنظیم‌کننده فعالیت ژن، مهمتر به نظر می‌رسند.[۴و۵] به‌طوری‌که در چندین جمعیت مختلف ارتباط آلل‌های آنها با CAD گزارش شده است. مطالعات مورد اشاره بیشتر در کشورهای اروپائی، آمریکا و ژاپن انجام شده و نتایج حاصل نیز از جمعیتی به جمعیت دیگر تفاوت‌هایی را نشان داده‌اند.[۴و۵و۹-۱۱] پس از بررسی و جستجو در بانک‌های اطلاعاتی موجود مشخص گردید که تاکنون مطالعه‌ای در این خصوص در ایران انجام نشده است. از سویی مشخص شده است که میانکنش بین آلل‌های ژن‌های مختلف با یکدیگر و همچنین با فاکتورهای محیطی، در چگونگی اثر ژن‌ها و میزان ایجاد خطر احتمالی برای یک بیماری خاص نقش مهمی دارند. لذا زمینه‌های ژنتیکی، خصوصیات زندگی و سایر فاکتورهای محیطی که در جمعیت‌های مختلف متفاوت می‌باشند، می‌توانند در چگونگی ارتباط این ژن‌ها با بیماری موثر باشند. از این رو ضرورت دارد که مطالعات فوق در جمعیت ایرانی نیز صورت گیرد.

## روش بررسی

مطالعه حاضر به صورت مورد- شاهدی (Case – Control) بر روی ۱۵۰ فرد بیمار مبتلا به CAD و ۱۵۰ فرد شاهد انجام شده است. نمونه‌های خون مورد استفاده در این مطالعه از مراجعین مرکز قلب تهران که از تاریخ ۲۴ بهمن ۱۳۸۵ تا ۱۰ تیر ۱۳۸۶ به این مرکز مراجعه نموده‌اند، اهدا شده است. پس از ویزیت متخصص قلب و عروق و انجام آنژیوگرافی، در حداقل ۵۰٪ یکی از عروق کرونر این بیماران انسداد وجود داشت. افراد شاهد آنهایی بودند که در آنژیوگرافی هیچ انسدادی در عروق کرونر نداشتند. پس از ارائه توضیحات لازم و دریافت رضایت کتبی از اهداکنندگان، ۲ml خون از هر یک از افراد در یک تیوب حاوی مقدار لازم EDTA گرفته شد. این تیوب‌ها تا زمان انجام آزمایشات در دمای $^{\circ}$C ۲۰- نگهداری شدند در مرحله بعد اطلاعات مربوط از پرونده پزشکی و یا از بانک اطلاعاتی مرکز قلب تهران استخراج گردید. مراحل بعدی آزمایشات در آزمایشگاه گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. از نمونه‌های خون شرکت‌کنندگان DNA ژنومیک به روش "رسوب با نمک" و یا فنول- کلروفرم استخراج گردید. سپس میزان جذب نوری نمونه‌های DNA در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و نانومتر قرائت شدند. نمونه‌های DNA که نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ آنها در حدود ۲-۱/۸ بود برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفتند. به‌علاوه کیفیت مناسب نمونه‌های DNA، با راندن ۲-۳µl از هر DNA بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید گردید. جهت انجام PCR پرایمرهای رفت و برگشت جهت تکثیر نواحی اطراف دو جایگاه A –VG و T-۱۳۸C از ژن MGP طراحی گردید. پرایمرها از شرکت MWG و با سفارش شرکت فرایند دانش آرین تهیه شدند. چند شکلی‌های مورد نظر به خودی خود منجر به ایجاد RFLP نمی‌گردند. لذا پرایمرهای برگشت به‌صورتی طراحی گردیدند که محصولات PCR در هر دو جایگاه حاوی RFLP باشند تا با استفاده از آن در مرحله هضم آنزیمی بتوان ژنوتیپ نمونه‌ها را مشخص کرد. این امر با قرار دادن یک نوکلئوتید غیرمکمل نزدیک به انتهای پرایمرهای برگشت و در نتیجه ایجاد محل‌های برش مصنوعی در محصولات PCR ممکن گردید. توالی نوکلئوتیدی نزدیک به چند شکلی A–VG به صورت '5-CC (A/G)TAGG-3 می‌باشد، در توالی پرایمر به‌جای نوکلئوتید مکمل نوکلئوتیدی که زیر آن خط کشیده شد، یعنی A، C قرار داده شد تا در محصول PCR در صورت وجود نوکلئوتید مناسب، محل برش آنزیم NCOI (CCATGGG) ایجاد شود. توالی نوکلئوتیدی نزدیک به چندشکلی T-۱۳۸C به صورت '5-AC(T/C)GTT -3' است، مشابه مورد قبلی در توالی پرایمر در محل نوکلئوتیدی که زیر آن خط کشیده شده است به جای نوکلئوتید T، G قرار داده شد تا در محصولات PCR محل برش آنزیم BsrSI (ACTGGN) ایجاد شود. توالی پرایمرهای مورد استفاده به‌صورت زیر می‌باشند.

7F: 5'-AGCTCTCTCCCACTGGTTCCTCCCCTCTCAAC-3'
7R: 5'- TTGTGTAGCAGCAGTAGGGAGAGAGGCTCCCA-3'
138F: 5'-AGCATACGATGGCCAAAACTTCTGCACCAG-3'
138R: 5'- CACTGAACTAGCATTGGAACTTTTCCCAACC-3'

واکنش PCR: واکنش PCR برای تکثیر اطراف جایگاه A –VG، در حجم ۲۵µl با غلظت ۰/۵µM از پرایمرها، ۰/۲µM از هر یک از dNTPها (سیناژن- ایران) و غلظت ۱mM از + ۲Mg (سیناژن- ایران)،



www.SID.ir

Archive of SID



۱x از بافر PCR (سیناژن- ایران) و یک واحد از آنزیم Smart tag DNA polymerase (سیناژن- ایران) و میزان ۱۰۰-۵۰ng از DNA ژنومیک (gDNA) انجام شد. برنامه PCR در یک سیکل دو دقیقه‌ای در دمای $95^{\circ C}$ و سپس ۳۵ سیکل شامل ۴۵ ثانیه در دمای $95^{\circ C}$، ۶۰ ثانیه در دمای $70^{\circ C}$ و ۳۰ ثانیه در دمای $72^{\circ C}$ و در خاتمه یک سیکل ۵ دقیقه‌ای در دمای $72^{\circ C}$ در دستگاه Corbet Research انجام شد. واکنش PCR جهت تکثیر اطراف جایگاه T -۱۳۸C نیز در حجم ۲۵µl با غلظت ۰/۵µM از پرایمرها، ۰/۲µM از هر یک از dNTP ها (سیناژن- ایران) و غلظت ۱mM از + ۲Mg (سیناژن- ایران)، ۱x از بافر PCR (سیناژن- ایران) و یک واحد از آنزیم Smart tag DNA polymerase (سیناژن) و میزان ۱۰۰-۵۰ng از DNA، در یک سیکل دو دقیقه‌ای در دمای $95^{\circ C}$، ۳۳ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵، ۳۰ ثانیه در دمای $67^{\circ C}$ و ۲۰ ثانیه در دمای $72^{\circ C}$ و در خاتمه یک سیکل پنج دقیقه‌ای در دمای $72^{\circ C}$ در دستگاه Corbet Research انجام شد.

الکتروفورز: جهت حصول اطمینان از اندازه قطعات تکثیر شده، حدود ۴-۳µl از محصولات PCR به‌دست آمده بر روی ژل آگارز ۲٪ در بافر TAE 1X و با ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۴۰ دقیقه رانده شدند. سپس ژل در آب حاوی ۰/۵µg/ml اتیدیوم بروماید در حدود ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. در تمامی ژل‌ها از Ladder۱۰۰bp (سیناژن-ایران) استفاده شد تا اندازه محصول PCR در مقایسه با آن سنجیده شود. ژنوتیپ نمونه‌ها با هضم آنزیمی مناسب محصولات PCR و مشخص کردن اندازه قطعات حاصل بر روی ژل پلی‌آکریلامید مشخص شد.

هضم آنزیمی محصولات PCR: هضم آنزیمی محصولات PCR در جایگاه A -۷G: ۱۰۰۰-۵۰۰ng (۷µl) از محصول PCR به همراه پنج واحد از آنزیم محدودکننده NCOI (تهیه شده از کمپانی New England Biolab و با سفارش شرکت فزا پژوه) و ۱/۵µl از ddH2O جهت هضم به صورت Overnight در بن ماری $37^{\circ C}$ قرار داده شد. هضم آنزیمی در حجم ۱۰µl انجام شد. هضم آنزیمی محصولات PCR در جایگاه T-۱۳۸C: ۱۰۰۰-۵۰۰ng (۷µl) از محصول PCR به همراه ۲/۵ واحد از آنزیم محدودکننده BsrSI (تهیه شده از کمپانی New England Biolab و با سفارش شرکت فزا پژوه) و ۱/۵µl از ddH2O به صورت Overnight در بن‌ماری $37^{\circ C}$، هضم آنزیمی در حجم ۱۰µl انجام شد.

جهت جدا نمودن قطعات تولید شده در هضم آنزیمی، از ژل ۸٪ پلی آکریلامید استفاده گردید. پس از تهیه ژل، سه میکرولیتر از محصولات هضم آنزیمی در چاهک‌های ژل ریخته شد. بافر استفاده شده جهت الکتروفورز بافر TBE۱۰X است. بافر TBE با غلظت ده برابر (۱۰X) تهیه شده و جهت استفاده تا غلظت ۰/۶X رقیق گردید. الکتروفورز به مدت چهار ساعت برای هر دو جایگاه و با ولتاژ ۱۹۰ ولت انجام شد. جهت رنگ‌آمیزی و مشاهده نمودن باندها، از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره استفاده گردید.

## یافته‌ها

نتیجه نواحی تکثیر شده از جایگاه‌های اطراف A-۷G و T-۱۳۸C در شکل ۱ آمده است. قطعه تکثیر شده از اطراف جایگاه A-۷G، ۱۱۰bp و در مورد جایگاه T-۱۳۸C، ۱۴۵bp می‌باشد. به منظور تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها از روش RFLP استفاده شد که نتایج آن در مورد جایگاه T-۱۳۸C در شکل ۲ و در مورد جایگاه A-۷G در شکل ۳ آمده است. شرکت‌کنندگان در مطالعه شامل ۱۱۳ مرد و ۳۷ زن با میانگین سنی ۵۹/۶۷ و با ۱۰/۱۸±SD در گروه بیماران و در گروه شاهد ۷۴ مرد و ۷۶ زن با میانگین سنی ۵۵/۱۲ و با ۱۰/۲۸±SD بودند. از لحاظ عوامل مستعدکننده افراد به ابتلا به CAD (شامل استعمال سیگار، هایپر لیپیدمی، میزان تری‌گلیسیرید، کلسترول، افزایش فشار خون و دیابت) نیز افراد مورد بررسی قرار گرفتند. از لحاظ فاکتورهای مذکور دو گروه تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. نتایج تعیین ژنوتیپ نمونه‌های DNA مربوط به هر دو گروه شرکت کننده در مطالعه به همراه p محاسبه شده در جدول ۱ در مورد جایگاه‌های G-۷A و T-۱۳۸C آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود اختلاف فراوانی ژنوتیپی دو گروه از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. براساس فراوانی‌های ژنوتیپی به‌دست آمده در بخش قبل فراوانی آللی نیز برای هر دو گروه شرکت‌کننده در جدول ۲ در مورد جایگاه‌های G-۷A و فراوانی‌های ژنوتیپی به‌دست آمده در بخش قبل فراوانی آللی نیز برای هر دو گروه شرکت‌کننده در جدول ۲ در مورد جایگاه‌های G-۷A و T۱۳۸C آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود اختلاف فراوانی آللی بین دو گروه شرکت کننده از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. فراوانی آللی در کل جمعیت تحت مطالعه نیز محاسبه گردید. فراوانی آلل‌های A و G در جایگاه G-۷A به‌ترتیب ۰/۶۵ و ۰/۳۵ و فراوانی آلل‌های C و T در جایگاه T-۱۳۸C به‌ترتیب ۰/۵۷ و ۰/۴۳ به‌دست آمدند.



www.SID.ir

Archive of SID



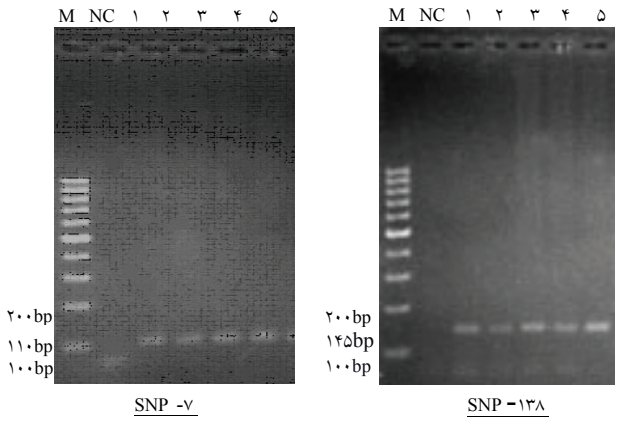
جدول- ۱: فراوانی ژنوتیپی نمونه‌های بیمار و شاهد در جایگاه‌های G-۷A و T-۱۳۸C

| نمونه‌ها | جایگاه ۷- | | | p* | جایگاه ۱۳۸- | | | p* | مجموع |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | GG | AG | AA | | CC | CT | TT | | |
| بیمار | ۴۵ | ۱۰۳ | ۲ | | ۳۰ | ۱۱۷ | ۳ | | ۱۵۰ |
| شاهد | ۵۲ | ۹۵ | ۳ | ۰/۳۵۴ | ۲۱ | ۱۲۶ | ۳ | ۰/۱۷ | ۱۵۰ |
| مجموع | ۹۷ | ۱۹۸ | ۵ | | ۵۱ | ۲۴۳ | ۶ | | ۳۰۰ |

*آزمون $\chi^2$، p<۰/۰۵ معنی‌دار است

جدول- ۲: فراوانی آللی در نمونه‌های بیمار و شاهد در جایگاه‌های G-۷A و C-۱۳۸- مقایسه فراوانی آللی با استفاده از نرم‌فزار SPSS تفاوت معنی‌داری بین دو گروه نشان نداد p<۰/۲۵ در جایگاه G-۷A و p<۰/۵ در جایگاه T-۱۳۸C). (آنالیز نتایج با استفاده از آزمون $\chi^2$ انجام شده است).

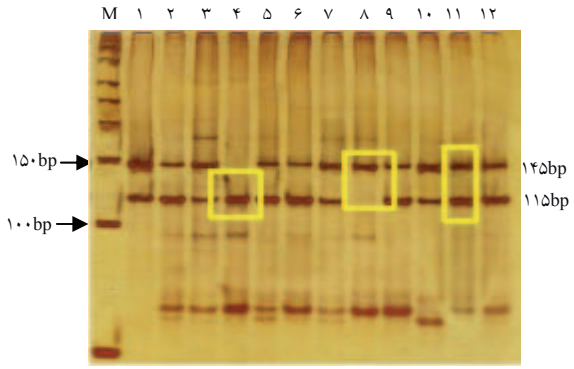
| فراوانی آللی در جایگاه ۷- | A | G | مجموع |
|---|---|---|---|
| بیمار | ۱۰۸(٪۳۶) | ۱۹۲(٪۶۴) | ۳۰۰ |
| شاهد | ۱۰۱(٪۳۴) | ۱۹۹(٪۶۶) | ۳۰۰ |
| مجموع | ۲۰۹(٪۳۵) | ۳۹۱(٪۶۵) | ۶۰۰ |
| فراوانی آللی در جایگاه ۱۳۸- | C | T | |
| بیمار | ۱۷۷(٪۵۹) | ۱۲۳(٪۴۱) | ۳۰۰ |
| شاهد | ۱۶۸(٪۵۶) | ۱۳۲(٪۴۴) | ۳۰۰ |
| مجموع | ۳۴۵(٪۵۷/۵) | ۲۵۵(٪۴۲/۵) | ۶۰۰ |



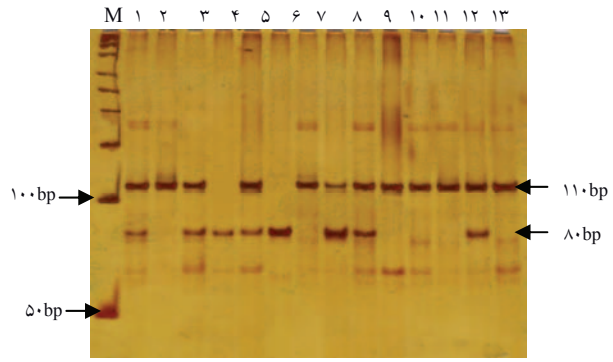

شکل- ۱: محصولات PCR تولید شده از اطراف G -۷A و T-۱۳۸C. قطعه ایجاد شده از اطراف G-۷A، ۱۱۰ bp و T-۱۳۸C، ۱۴۵ bp. M: DNA Marker ۱۰۰bp، NC: کنترل منفی، ۱~۵: محصولات PCR

## بحث

مطالعه حاضر که در مراجعه‌کنندگان به بیمارستان مرکز قلب تهران صورت گرفت، از لحاظ آماری همبستگی معنی‌داری میان




شکل- ۲ نتیجه هضم آنزیمی محصولات PCR در اطراف T-۱۳۸C رانده شده روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸٪. محصولات PCR تحت تاثیر آنزیم BsrS I هضم شدند. در صورت وجود توالی مورد شناسایی قطعه ۱۴۵bp PCR را هضم کرده و آنرا به دو قطعه ۱۱۵ و ۳۰bp تبدیل می‌کند. M: DNA Marker، ۴: هموزیگوت AA، ۸ :هموزیگوت TT، ۱۱: هتروزیگوت CT




شکل- ۳: نتیجه هضم آنزیمی محصولات PCR در اطراف A-۷G رانده شده روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸٪. محصولات PCR تحت تاثیر آنزیم NCOI هضم شدند. در صورت وجود توالی مورد شناسایی قطعه ۱۱۰bp PCR را هضم کرده و آنرا به دو قطعه ۸۰ و ۳۰bp تبدیل می‌کند. M: DNA Marker، ۴: هموزیگوت AA، ۹: هتروزیگوت AG، ۱۱: هموزیگوت GG

جایگاه‌های مورد نظر و CAD نشان نداد. البته در این مطالعه فراوانی آلل A در جایگاه G-۷A و آلل T در جایگاه T-۱۳۸C در بین بیماران بیشتر از گروه شاهد بود. از این نتایج می‌توان تفاسیر متفاوتی را



www.SID.ir

Archive of SID



استنتاج نمود. می‌توان نتیجه را به معنی منفی بودن ارتباط چند شکلی‌های فوق با CAD در جمعیت ایرانی گرفت. چنین تفسیری اگر چه با گزارشاتی از سایر کشورها نیز سازگار می‌باشد.[۱۲و۱۱] ولی با توجه به ماهیت مطالعات همبستگی و محدودیت‌های مطالعه حاضر (از جمله کم بودن تعداد نمونه‌ها)، مقداری عجولانه و سطحی به نظر می‌رسد. از سوی دیگر فراوانی بالاتر بعضی از چندشکلی‌ها در بیماران، که همسو با سایر گزارشات مثبت نیز می‌باشد را نمی‌توان از نظر دور داشت. به‌عبارتی شاید بتوان نتایج حاصل را پیشنهادکننده وجود ارتباط بین چندشکلی‌های مذکور و بیماری گرفت که محدودیت‌های موجود موجب شده که مقدار p به کمتر از ۰/۰۵ نرسیده و نتایج از نظر آماری معنی‌دار تفسیر نگردند. البته در مورد محدودیت مطالعه حاضر در نسبت مردان و زنان شرکت‌کننده در مطالعه بایستی به این واقعیت که فراوانی آللی چند شکلی‌های مذکور در کل خانم‌ها و آقایان شرکت‌کننده مشابه است توجه نمود (نتایج ارائه نشده‌اند). لذا عدم تناسب در جنسیت شرکت‌کنندگان در دو گروه به خودی خود عامل مشاهده نشدن این ارتباط با بیماری نخواهد بود. نکته قابل اهمیت دیگری که می‌بایست مدنظر قرار گیرد، جمعیت هتروژن استان تهران می‌باشد. به‌دلیل مهاجرت فراوان از نقاط مختلف کشور به این استان، جمعیت آن متشکل از جمعیت‌های کوچکتری از نژادهای مختلف کشور می‌باشد. به‌دلایل مختلف اجتماعی- فرهنگی از جمله رواج ازدواج‌های فامیلی در بین قومیت‌های مختلف در کشورمان، این جمعیت‌ها از نظر ژنتیکی تقریبا جدا از هم بوده و یکسان نیستند. این امر می‌تواند موجب ایجاد ساختار جمعیتی متفاوتی در گروه‌های بیمار و شاهد گشته و منجر به حصول نتیجه غیرواقعی در وجود یا عدم وجود همبستگی شود. در این مورد نیز افزایش تعداد نمونه‌ها می‌تواند ساختار متفاوت جمعیتی در گروه‌های بیمار و شاهد را رفع نماید. اشتباه در تشخیص بیماران از جمله موارد دیگری است که گاه عامل اختلال در نتایج مطالعات همبستگی می‌باشد. از این رو توصیه می‌گردد که در صورت امکان همه بیماران را یک پزشک مورد معاینه قرار دهد. البته در مطالعه حاضر همه بیماران توسط یک پزشک ویزیت نشده‌اند اما همگی از یک مرکز انتخاب شده‌اند که متخصصین شاغل در مرکز از معیارهای تشخیصی و سیستم آنژیوگرافی مشابهی استفاده نموده‌اند. مسئله دیگری که ممکن است باعث ایجاد خطا در مطالعات همبستگی شود، تعیین نادرست ژنوتیپ نمونه‌ها است. در صورتی که در ژنوتیپ کردن نمونه‌ها خطایی رخ دهد، در نهایت نتیجه درستی حاصل نمی‌شود. در مطالعه حاضر اندازه محصولات پس از هضم آنزیمی، در اکثر موارد دوباره به‌وسیله راندن روی ژل‌های آگارز ۳/۵٪ و پلی‌آکریلامید ۸٪ تعیین شده‌اند تا از ایجاد خطا در ژنوتیپ نمونه‌ها در حد امکان جلوگیری شود. آنچه در پایان این بحث قابل ذکر می‌باشد نیاز به ادامه مطالعه حاضر در دو راستا می‌باشد. اول اینکه ادامه مطالعه با ژنوتیپ نمودن تعداد بیشتری از نمونه‌ها، اضافه کردن نتایج حاصل و تجزیه و تحلیل دوباره همه داده‌ها بسیار توصیه می‌گردد. دوم بررسی عملکردی چند شکلی‌های مورد بررسی این ژن می‌باشد. انجام مطالعات همبستگی دیگری به‌صورت خانوادگی که محدودیت‌های ذکر شده در مطالعات جمعیتی را ندارد، نیز در تایید چگونگی ارتباط این چندشکلی‌ها با بیماری بسیار مفید خواهند بود.

*سپاسگزاری*: لازم است از زحمات پرسنل محترم آزمایشگاه گروه ژنتیک پزشکی و پرسنل آزمایشگاه و بانک اطلاعاتی مرکز قلب تهران که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، صمیمانه تشکر نمائیم. محققین از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که هزینه انجام پژوهش حاضر را تامین نمودند کمال تشکر را دارند.

## References

1. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998; 4: 1241-3.
2. Slack J, Evans KA. The increased risk of death from ischaemic heart disease in first degree relatives of 121 men and 96 women with ischaemic heart disease. *J Med Genet* 1966; 3: 239-57.
3. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation* 2004; 110: 1868-73.
4. Herrmann SM, Whatling C, Brand E, Nicaud V, Gariepy J, Simon A, et al. Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2386-93.
5. Farzaneh-Far A, Davies JD, Braam LA, Spronk HM, Proudfoot D, Chan SW, et al. A polymorphism of the human matrix gamma-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels. *J Biol Chem* 2001; 276: 32466-73.
6. Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix calcification: where is the action? *Nat Genet* 1999; 21: 150-1.
7. Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* 1985; 260: 14971-5.



www.SID.ir

Archive of SID



8. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; 386: 78-81.
9. Jono S, Ikari Y, Vermeer C, Dissel P, Hasegawa K, Shioi A, et al. Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 2004; 91: 790-4.
10. Kobayashi N, Kitazawa R, Maeda S, Schurgers L, Kitazawa S. T-138C polymorphism of matrix gla protein promoter alters its expression but is not directly associated with atherosclerotic vascular calcification. *Kobe J Med Sci* 2004; 50: 69-81.
11. O'Donnell CJ, Shea MK, Price PA, Gagnon DR, Wilson PW, Larson MG, et al. Matrix Gla protein is associated with risk factors for atherosclerosis but not with coronary artery calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2769-74.
12. Sharma SK, Israel DH, Kamean JL, Bodian CA, Ambrose JA. Clinical, angiographic, and procedural determinants of major and minor coronary dissection during angioplasty. *Am Heart J* 1993; 126: 39-47.



www.SID.ir

Archive of SID

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 2, May 2009: 94-100

# T-138C and A-7G polymorphisms in the MGP gene and the association with coronary arthery disease: Iranian patients

Abiri M.[1]
Sadeghian S.[2]
Hakki E.[3]
Boroumand MA.[4]
Mehdipour P.[1]
Izadi M.[1]
Keramatipour M.[1*]

*1- Department of Medical Genetics*
*2- Department of Cardiology, Tehran Heart Center Hospital*
*3- Tehran Heart Center Hospital*
*4- Department of Pathology, Tehran Heart Center Hospital*

*Tehran University of Medical Sciences*

*Corresponding author: Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Poursina Ave., Tehran
Tel: +98-21-88953005
email: keramatipour@tums.ac.ir

Received: October 08, 2008 Accepted: December 29, 2008

## Abstract

***Background*:** Coronary Artery Disease (CAD) is a major cause of death worldwide including Iran. The risk of developing disease in patients without symptoms is assessed in part by factors that are associated with disease. Among these factors family history points to the significance of genetic component in the risk of CAD. The identification of the genetic variants that confer risk for CAD is essential for detecting high-risk individuals, so preventative life style and therapeutic action can be taken before overt disease develops. So far more than 100 genes have been reported with possible role in developing risk for CAD. Matrix- Gla Protein (MGP) is one of these genes that association of its single nucleotide polymorphism (SNP) with CAD has been reported. Among the polymorphisms, there are two promoter SNPs at position -7 & -138 that their association with CAD has been reported before. Here we investigated the association of these SNPs with CAD in Iranian population.

***Methods*:** 150 cases and 150 controls were selected on the basis of their clinical assessments and angiographic reports. DNA was extracted from blood samples. The genotypes for both SNPs were determined using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method with size fractionation on Polyacrylamide gel.

***Results*:** The comparison of allele & genotype frequencies between patients and controls showed that there is an excess of A allele at position -7 and T allele at position -138 among patients, although these differences were not significant ($p<0.2$, and $p<0.5$ respectively).

***Conclusions:*** This study suggests no association of these SNPs with CAD in Iranian population. Confirmation of this finding needs independent repeat of similar studies.

***Keywords:*** Coronary Artery Disease (CAD), Matrix Gla Protein (MGP), Single Nucleotide Polymorphism (SNP).



www.SID.ir