Archive of SID

Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

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

Eslam Shiri, Saeid Ghorbian*

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

© 2020 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

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

اسلام شیری، سعید قربیان

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

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

چکیده

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

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

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* در بیماران مبتلا به سکته قلبی در مقایسه با افراد سالم افزایش یافته است. از لحاظ آماری تغییرات در سطح بیان ژن *hsa-miR-15* اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان داد ($p<۰/۰۵$).

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

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

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری‌های قلبی–عروقی علت اصلی مرگ و میر در سراسر جهان به شمار می‌روند به‌طوری‌که عامل اصلی تقریباً ۳۰ درصد از مرگ و میر جهانی را تشکیل می‌دهند (۱). در اثر اختلال در فرآیندهای اکسیژن رسانی و مواد غذایی به عضله قلب و کاردیومیوسیت که در اثر گرفتگی در عروق کرونری قلبی (CAD) ایجاد می‌شود، سکته قلبی و کاردیومیوپاتی ایسکمیک رخ می‌دهد. اصلی‌ترین علل سکته قلبی، آترواسکلروزیس و التهاب لایه اندوتلیال عروق کرونری است (۲). ناحیه شاخص درگیر در این فرآیند، زیر لایه اندوکاردیال بطن چپ قرار دارد که به دنبال مرگ میوسیت‌ها و آسیب‌های در این ناحیه، توانایی انتقال جریان الکتریکی و انقباض بطن چپ قلب مختل می‌گردد. به‌منظور بازسازی بافت و توانایی قلب، میوفیبروبلاست‌ها تکثیر و به ناحیه ضایعه مهاجرت می‌کنند که درنتیجه ترشح ماتریکس خارج سلولی، مانع از تخریب بطن می‌شوند (۳). به‌طورمعمول، تست‌هایی که برای تشخیص سکته قلبی مورد استفاده قرار می گیرند شامل، اندازه‌گیری سطح آنزیم‌های کراتین فسفوکیناز، کراتین کیناز نوع MB، تست‌های انعقادی PT و PTT است. امروزه، روش‌های درمانی تهاجمی و غیرتهاجمی بسیاری مانند تغییر شیوه زندگی، جراحی‌های قلب باز، آنژیوپلاستی، کاشت فنر، راهبردهای دارویی و گاهی از طریق پیوند قلب جهت درمان اختلالات قلبی و عروقی بکار گرفته می‌شوند (۴، ۵). در سال ۱۹۹۰ مولکول‌های RNA غیر رمز کننده کوچکی (Small non-coding RNA) با طول تقریبی ۲۴–۱۸ نوکلئوتید شناسایی شدند که بیان ژن‌ها را با تخریب مولکول mRNA هدف و یا مهار آغاز فرآیند ترجمه عملکرد تنظیمی خود را در مرحله بعد از ترجمه (Post-Transcriptional) انجام می‌دهند. تاکنون بیش از ۲۵۰۰ نوع miRNA شناسایی‌شده‌اند که در تنظیم مکانیسم‌های سلولی، سیگنال‌های مولکولی و مسیرهای ژنی نقش تنظیم کنندگی دارند (۶). اکثر miRNAها در سلول‌ها و اندام‌های حیاتی بدن شناسایی شده‌اند. نقش مولکول‌های miRNA در فرآیندهای سلولی به ویژه در سیستم قلبی و عروقی مشخص شده است. در انواع سلول‌های قلبی، miRNA های متعددی وجود دارند که اختصاصی سلول‌های قلب نیستند (۷). مولکول hsa-miR-15 یکی از miRNAهایی است که در بیماری‌های قلبی و عروقی در پاسخ به سکته قلبی، در شرایط ایسکمی قلبی حاد، در بیماران با جراحی قلب باز و در پاسخ به آپوپتوز سلولی در میوسیت‌ها میزان بیان آن تغییرات زیادی را نشان می دهد (۸، ۹). Hsa-miR-15 یکی از مولکول‌های بسیار حفاظت‌شده از خانواده miRs به شمار می‌رود که از نظر جایگاه سیتوژنتیکی بر روی کروموزوم q1413 قرارگرفته است. در مطالعات پیشین، *hsa-miR-15* را جزء گروهی از miRsهایی که در فرآیند تومور زایی نقش دارند، طبقه بندی شده بود (۱۰). اخیراً، بی‌نظمی در میزان بیان سطح سرمی *hsa-miR-15* در بیماران مبتلا به سکته قلبی گزارش شده است (۱۱). در این یافته‌ها پیشنهاد شده است که این مولکول می‌توانند بالقوه به‌عنوان بیومارکری در تشخیص و پیش‌آگهی از سکته قلبی استفاده شود. از طرفی نتایج این بررسی‌ها نشان داده است که با مهار بیان ژن *hsa-miR-15* نقش محافظتی در برابر خطر سکته قلبی ایجاد می کند (۱۰). بااین‌حال، اهمیت عملکرد این miR، مکانیسم مولکولی و کاربردهای درمانی احتمالی آن در بیماران مبتلا به سکته قلبی به‌طور دقیق بررسی نشده است و نیازمند تحقیقات بیشتری در این زمینه است. با توجه به اینکه چنین مطالعاتی پیشینه تحقیقاتی در مبتلایان به سکته قلبی در ایران را ندارند، لذا هدف از این مطالعه، مقایسه میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* در بیماران مبتلا به سکته قلبی با افراد سالم در مراجعه‌کنندگان به بیمارستان شهید مدنی شهر تبریز و مقایسه سطح مارکرهای بیوشیمیایی شامل CK-MB، CPK، PT و PTT سرمی در افراد مورد بررسی بود.

روش کار

این مطالعه که در قالب یک بررسی مورد–شاهدی بر روی ۱۰۷ زن و مرد مبتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی با عارضه سکته قلبی (۸۸ فرد دچار سکته قلبی و ۱۹ فرد سالم) با تشخیص بالینی پزشک متخصص بستری در بیمارستان شهید مدنی تبریز در طی دوره شش‌ماهه از مرداد تا دی‌ماه ۱۳۹۵ و در محدوده سنی ۸۵–۲۵ سال، بودند مورد ارزیابی قرار گرفتند. حجم نمونه با استفاده از فرمول مقایسه نسبت ها (سطح معنی داری ۰/۰۵ a> و توان آزمون ۸۰٪) ۱۰۷ نفر محاسبه شد.

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

α = 0.05
β = 20%
N = 107.2 # 107

$$\mathbf{n} = \frac{\left(Z\mathbf{1} - \frac{a}{\mathbf{2}} + Z\,\mathbf{1} - \beta\right)^{\mathbf{2}} \times \mathbf{2}[\bar{p}\,(\mathbf{1} - \bar{p})]}{\mathbf{d}^{\mathbf{2}}}$$

$$\mathbf{n} = \frac{\left(Z\mathbf{1} - \frac{a}{\mathbf{2}} + Z\,\mathbf{1} - \beta\right)^{\mathbf{2}} \times \mathbf{2}[\bar{p}\,(\mathbf{1} - \bar{p})]}{\mathbf{d}^{\mathbf{2}}}$$

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه ها به روش تصادفی ساده پس از تایید بیماری و درصورتی که واجد شرایط ورود به مطالعه بودند، انتخاب شدند.

از تمامی شرکت‌کنندگان پس از توضیح کامل مطالعه، رضایت‌نامه کتبی گرفته اخذ شد. داده‌های برگرفته از گزارش نوار قلب، نتایج آزمایشگاهی و اکوکاردیوگرافی بیماران بود. معیارهای ورود به مطالعه شامل مبتلایان بستری در بیمارستان‌های فوق تخصص قلب شهید مدنی تبریز با تشخیص بالینی پزشک متخصص، در محدوده‌ی سنی ۳۰ الی ۶۰ و فقدان سابقه ابتلا به بیماری‌های مزمن دیگر بودند. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: بارداری، شیردهی، قاعدگی نامرتب، استعمال مزمن دخانیات (روزی ۳ عدد بیشتر از ۴۸ ماه) یا مصرف مشروبات الکل، مصرف داروهایی مانند تاموکسیفن، رالوکسیفن، تیبولون، درمان های جایگزین هورمونی در دو سال گذشته، مصرف مکمل های پروتئینی، فیتواستروژن ها، فولات و ویتامین ب۱۲ در فاصله زمانی ۱ ماه پیش از تشخیص بیماری، مصرف داروهایی نظیر متوتروکسات، سولفاسالازین، متفرمین، سیکلوزپورین، تئوفیلین، دیورتیکها، ضدتشنج و ضدبارداری در طول ۲ سال پیش از تشخیص، ابتلا به دیابت نوع ۱ با عارضه هیپرفیلتراسیون گلومرولار، بیماران کلیوی، هیپرتیروئیدیسم، داشتن التهاب مزمن (نظیر روماتیسم مفصلی، مالتیپل اسکلروزیس، التهاب پوستی و غیره) و انواع خوش خیم توده پستانی، پیروی از الگوی غذایی خاص مانند رژیم غذایی گیاه خواری، داشتن تاریخچه هر گونه بیماری تغییرات فیبروکیستیک، فیبروآدنوما، آبسه های پستانی، التهاب مجاری و نکروز بافت چربی. در طی فاصله زمانی کمتر از ۱۰ ساعت بعد از تشخیص سکته قلبی، به میزان ۲ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی در ویال هایی که به‌صورت کد اختصاری و به صورت کاملاً محرمانه و با حفظ موازین اخلاقی شماره‌گذاری شده بودند دریافت و جهت بررسی سطح تغییرات میزان بیان ژن *hsa-miR-15*، سرم آن‌ها جداسازی و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌های نگهداری شدند. علاوه براین، از تمامی بیماران قبل از هرگونه مداخلات دارویی و آنژیوگرافی، آزمایش‌ها روتین بیوشیمی بخصوص CPK، CK-Mb، آزمایش‌های PT و PTT انجام شده بود. استخراج RNA تام با محلول Qiazol طبق پروتکل شرکت سازنده کیت انجام شد. به‌منظور ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific، **آمریکا**) و ژل الکتروفورز ۱٪ آگارز استفاده شد. سپس، RNA های استخراج شده تا قبل از سنتز cDNA در دمای ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌منظور سنتز cDNA از کیت miScript II RT Kit (Qiagen, USA) که مبنای آن اضافه کردن دم پلی A بود، استفاده شد. کلیه مراحل روی یخ انجام شد. سپس مقادیر اجزای واکنش شامل ۱۰x miScript Nucleics Mix، آب RNase free، ۵x miScript HiSpec Buffer، miScript Reverse Transcriptas Mix و Template RNA طبق جدول ۱ مخلوط شدند. به دنبال آن، بر اساس جدول زمانی و دمایی پروتکل، در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) مراحل تکثیر انجام شد (۱۲).

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

اجزاء واکنش	حجم
miScript HiSpec 5x بافر	**۴ میکرولیتر**
miScript 10x مخلوط نوکلئوتیدها	**۲ میکرولیتر**
RNaseآب عاری از آنزیم	**۱۵ میکرولیتر**
miScriptمخلوط آنزیم رونوشت بردار معکوس	**۲ میکرولیتر**
الگوRNA	**۳ میکرولیتر**
حجم کل	**۲۵ میکرولیتر**

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

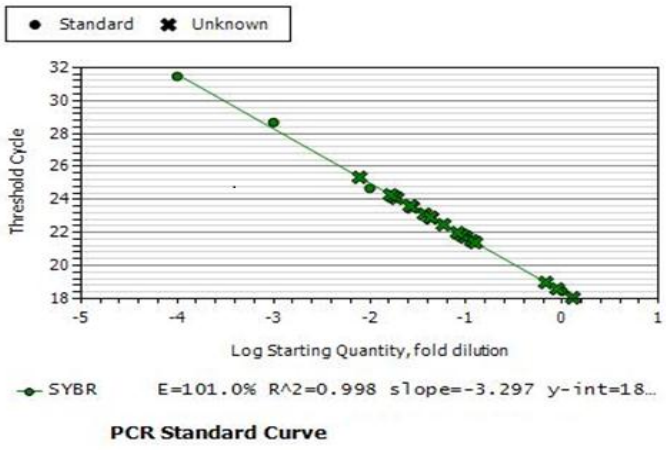
www.SID.ir

Archive of SID

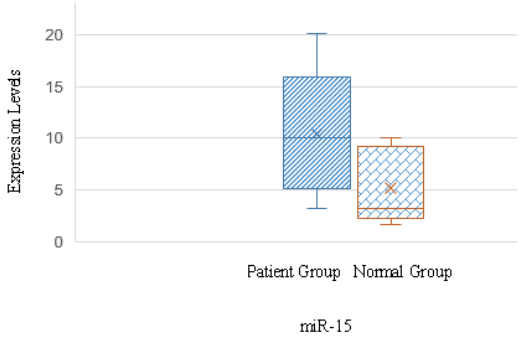
ΔCT (گروه بیمار)= ct (Target)- ct(Control)
ΔCT (گروه سالم)= ct (Target)- ct(Control)
ΔΔCT= ΔCT (Δ – (گروه بیمار) CT (گروه سالم)
بعد از محاسبه ΔCT برای ژن‌ها در هر یک از دو گروه، مقادیر در فرمول $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ در هر دو گروه وارد شد تا بعد از تعیین میزان بیان دقیق ژن در هر نمونه، نتایج حاصل در دو گروه با یکدیگر از نظر آماری مقایسه شدند. کلیه داده‌ها بر اساس نرم‌افزار SPSS Version ۲۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف–اسمیرنوف استفاده شد. در تحلیل داده‌ها از روش آماری t مستقل استفاده شد. برای تمامی موارد مقدار P محاسبه و سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (p<۰/۰۵).

یافته‌ها

در بررسی حاضر، بررسی میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* با روش کمی Real-Time PCR با استفاده از رنگ سایبر گرین انجام شد. نمودار استاندارد برای ژن‌های *hsa-miR-15* و *U6* کارایی واکنش تکثیر را تقریباً ۱۰۰ درصد (Efficiency= 101%) نشان داده بود (شکل ۱). منحنی ذوب حاصل از واکنش به‌صورت یک قله‌ای به دست آمد که اختصاصیت واکنش تکثیری را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از واکنش Real-Time PCR نشان داد که تغییرات سطح سرمی میزان بیان ژن *hsa-miR-15* در بیماران مبتلابه سکته قلبی نسبت به افراد سالم اختلاف معناداری دارد (p<۰/۰۵) بدین‌صورت که میزان بیان این ژن در سرم افراد بیمار افزایش ۳ برابری را نشان داده است (نمودار ۱). علاوه براین، سطح سرمی میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* را بر اساس شاخص توده بدنی BMI در بین ۷۷ فرد بیمار باBMI کمتر از ۳۰ (BMI<30)، در ۱۱ فرد بیمار با BMI بالای ۳۰ (BMI>30) و ۱۹ فرد سالم اندازه‌گیری و نشان داده شد که میزان بیان در افراد بیمار با BMI کمتر از ۳۰ را نسبت به دو گروه دیگر، بیشترین میزان را داشته است (جدول ۲). تمامی افراد مورد بررسی از نظر فاکتورهای بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفته بودند (جدول ۳).



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



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

جدول ۲: بررسی الگوی تغییرات میزان بیان ژن *hsa-miR-15* بین گروه‌های سالم و بیمار با BMI<30 و BMI>30

www.SID.ir

Archive of SID

گروه ها	گروه بیمار BMI<30 (۷۷ نفر=تعداد)	گروه بیمار BMI>30 (تعداد=۱۱ نفر)	گروه سالم (تعداد=۱۹ نفر)	مقدارP
میزان بیان ژن *hsa-miR-15*	۰/۹±۲۰/۳	۰/۳±۱۹/۶	۰/۳±۷/۷	۰/۰۵<

جدول-۳. مقایسه میانگین پارامترهای بیوشیمیایی در افراد گروه بیمار و گروه سالم

پارامترهای بالینی	میانگین و انحراف معیار در گروه سالم	میانگین و معیار انحراف در گروه بیمار	P مقدار
سن	۲/۲±۳۹	۹/۶±۵۹	**NS**
جنسیت (زن/مرد)	۱۵/۷	۵۸/۱۴	**NS**
BMI (kg/m^2)شاخص توده بدنی	۱/۳±۲۴/۵	۳/۰۸±۵۸/۱	**P<۰/۰۱**
BMI>30 شاخص توده بدنی	۴	۱۱	**P<۰/۰۱**
PTTزمان (ثانیه)	۳/۸±۲۹/۷	۱۴/۸۳±۴۸/۸۹	**P<۰/۰۰۵**
PTزمان (ثانیه)	۱/۵±۱۳	۷/۶±۱۳/۴	**P<۰/۰۰۵**
CPK (U/L)آنزیم کراتین فسفو کیناز	۵۴±۲۳۰	۱۸۶±۶۹۲/۲۵	**P<۰/۰۵**
CK-MB (U/L)آنزیم کراتین کیناز	۸±۳۸/۶۶	۲۲±۱۰۹/۸۲	**P<۰/۰۵**

* سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵

بحث

سکته قلبی، عامل عمده مرگ و میر در جهان به شمار می‌رود. عوامل خطر متعددی برای ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی ازجمله سن، چاقی، سبک زندگی، کلسترول تام، تغذیه ناسالم و فشارخون بالا گزارش شده است (۱۳). آسیب به بافت قلبی ناشی از سکته قلبی منجر به افزایش ناتوانی قلبی می‌شود. بنابراین، توسعه روش‌های درمانی که باعث القاء بازسازی بافتی و پیشگیری از تخریب بافت قلبی بعد از فرآیند سکته می‌شود، ازلحاظ بالینی بسیار حائز اهمیت است (۱۴). امروزه روش‌های درمانی بسیاری مانند تغییر شیوه زندگی، جراحی‌های قلب باز، آنژیوپلاستی و کاشت فنر، نمایش دارویی و در موارد خاصی پیوند قلب برای درمان بیماری‌های قلبی و عروقی بکار گرفته می شود (۱۵). در انواع مختلفی از سلول‌ها، miRNAهای متنوعی وجود دارند که ازجمله miRNA بیانی در قلب *hsa-miR-15* است که در بیماران مبتلا به سکته قلبی میزان بیان آن افزایش نشان داده است (۱۰). در این مطالعه، میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* که به‌عنوان یکی از تنظیم‌کنندگان اصلی در مسیر تمایز سلول‌های MSC (Mesenchymal Stem Cell) به سلول‌های قلبی در بیماران قبل و بعد از عمل جراحی قلب نقش دارد، مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طورکلی، اگرچه بیماری‌های قلبی با گرفتن سوابق پزشکی، معاینه قلبی و ارزیابی‌های بیشتر ازجمله آزمایش‌های خونی، اکوکاردیوگرام، نوار قلبی و تصویربرداری تشخیص داده می‌شوند (۱۶) ولی در این مطالعه، اساس و پایه تشخیص، بر مبنای میزان تغییرات سطح بیان ژن *hsa-miR-15* که یک مولکول RNA غیر رمز کننده کوچک مترشحه در سرم بیماران مبتلا به سکته قلبی است، مورد نظر است. به طور معمول از آزمایش کراتین کیناز نوع MB که در سلول‌های عضله قلب تا حدودی اختصاصی است، برای تشخیص سکته قلبی استفاده می‌شود. در مواردی که سلول‌های قلب دچار نکروز شوند (در اثر کمبود اکسیژن)، سطح این آنزیم در جریان خون افزایش می‌یابد. این آنزیم در مواردی همچون داشتن سابقه تزریقات عضلانی، رابدومیولیز، فعالیت‌های سنگین بدنی و بیماران دارای مشکلات کبدی نیز افزایش می‌یابد. در غیاب این موارد، افزایش سطح سرمی CKMB و بالا بودن آن در کمتر از ۴۸ ساعت می‌تواند در تشخیص سکته قلبی مفید واقع شود (۱۷). در سال‌های اخیر با یافتن مسیرهای پیام‌رسان، مولکولی‌های RNA فراوانی شناسایی شده اند که تا به کمک آنها تشخیص اختلالات سریع‌تر از قبل که بر پایه سنجش پروتئین‌ها و سطح آنزیم‌ها متمرکز بود، میسر گردد. در واقع، miRNA ها شامل گروهی از RNAهای کوچک غیر رمز کننده هستند که به عنوان کلید مولکولی در تنظیم بیان ژن‌ها فعالیت دارند و به عنوان تنظیم‌کننده های مسیر پیام رسان پیچیده قلبی در زمان سلامت یا بیماری قلب شناخته می‌شوند (۱۸). این مولکول‌ها بیان ژن‌های هدف خود را با تخریب، مهار ترجمه و یا القای ترجمه mRNA های هدفشان تنظیم می‌کند (۱۹). Hullinger و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای تحت عنوان " مهار *miR-15* عامل حفاظت کننده در برابر آسیب‌های وارده در اثر

www.SID.ir

Archive of SID

ایسکمی قبلی" که بر روی بافت خوکی مورد ارزیابی قرار داده بودند، نشان دادند که با استفاده از مهارکننده‌های اسید نوکلئیکی، می‌توان بیان *hsa-miR-15* را مهار و تا حد زیادی از آسیب وارده به بافت قلبی و ایجاد سکته قلبی جلوگیری کرد (۱۰). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که در بیماران مبتلا به سکته قلبی سطح این miR در سرم‌شان افزایش قابل‌توجهی را نشان داده است. Liu و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای تحت عنوان" افزایش بیان *MicroRNA-15a/b* در آسیب‌های ناشی از ischemia/reperfusion" در مدل حیوانی موش نشان دادند که میزان بیان ژن‌های *miR-15* و *miR-15b* در پاسخ به آسیب‌های وارده از طریق ischemia/reperfusion به‌طور چشمگیری افزایش یافته و بنابراین ممکن است که از طریق کاهش بیان *miR-15a/b* بتوان از آسیب‌های وارده به سلول‌های قلبی در اثر فرآیند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی جلوگیری کرد (۲۰). Porrello و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای تحت عنوان" تنظیم بازسازی بافت قلبی نوزادان/بالغین از طریق خانواده *miR-15*" در مدل موشی نشان داده بودند که مهار بیان ژن‌های خانواده *hsa-miR-15* در ابتدای تولد و یا حتی تا سن بلوغ منجر به افزایش تکثیر میوسیت‌های قلبی می‌شود و از طرفی عملکرد سیستولیک بطنی بعد از سکته قلبی بهبود پیدا می‌کند. نهایتاً به این نتیجه رسیدند که خانواده *hsa-miR-15* نقش مهمی در از دست دادن عملکرد سلول‌های بافت قلبی در طی فرآیند بازسازی ناشی از سکته قلبی خواهند داشت (۸). Liu و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مطالعه‌ای تحت عنوان" نقش آپوپتوزی و ضد رگ‌زایی *miR-106b* و *miR-15b* در مبتلایان به سکته قلبی" که با مبتنی بر روش‌های بیوانفورماتیک به منظور درک بهتر نقش miR ها در فرآیند سکته قلبی انجام‌شده بود، نشان داده بودند که از بین هزاران مولکول miR، مولکول‌های *miR-106b* مانع از رگ‌زایی و *miR-15b* سلول را به سمت آپوپتوزی هدایت می‌کنند و از این طریق ممکن است که این دو مولکول نقش بسیار مهمی در فرآیند آسیب‌زایی برای سکته قلبی ایفا کنند (۲۱). در مطالعه دیگری که توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۴ که تحت عنوان " *miR-15b* نقش تسهیل‌کننده در فرآیند آپوپتوزی القاء شده به واسطه کمبود اکسیژن در کاردیومیسیت‌ها در مسیر میتوکندریایی" انجام شده بود، نشان دادند که با افزایش بیان *miR-15b* فرآیند آپوپتوزی سلولی افزایش‌یافته و با از دست دادن توانایی غشاء میتوکندریایی همراه شده است. این در حالی است که با کاهش بیان آن، نقش محافظت‌کنندگی برای سلول را در پی دارد. مهار بیان ژن *miR-15b* منجر به افزایش سطح پروتئین Bcl-2 می‌شود بدون اینکه تأثیری بر روی سطح مولکول‌های Bcl-2 mRNA داشته باشد. پیامد حاصل از این تأثیر، مهار آزادسازی سیتوکروم c میتوکندریایی و کاهش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ خواهد بود. این احتمال وجود دارد که مولکول *miR-15b* نقش تنظیمی فرادستی را در مسیر انتقال پیام در میتوکندری در طی آپوپتوز القاء شده به‌واسطه کمبود اکسیژن داشته باشند (۲۲). به‌طورکلی نتایج حاصل از بررسی‌های متعدد نشان داده است که *hsa-miR-15* به عنوان مهارکننده تکثیر کاردیومیسیت‌ها عمل می‌کند و در القاء آپوپتوزی سلول‌های قلبی نقش مهمی دارد. نتیجه بررسی انجام‌شده در این تحقیق نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن *hsa-miR-15* در بین افراد گروه‌های بیمار و سالم وجود داشت و شاید بتوان عنوان کرد که بررسی میزان تغییرات بیان ژن *hsa-miR-15* به‌عنوان یک بیومارکر در تشخیص و پیش‌آگهی در افراد مبتلا به سکته قلبی کاربرد داشته باشد. لازم به ذکر است که در جهت تأیید این چنین یافته‌هایی به انجام مطالعات بیشتر و با اندازه جامعه آماری بزرگ‌تر نیاز خواهد بود و نمی‌توان با نتایج گزارش‌های چند بررسی محدود در جمعیت‌های خاص این مولکول را به‌عنوان بیومارکر تشخیصی و پیش‌آگهی دهنده مطرح کرد.

نتیجه‌گیری

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

قدردانی

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

www.SID.ir

Archive of SID

ملاحظات اخلاقی

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

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

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

مشارکت مؤلفان

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

References

1. Lopez A D, Mathers C D, Ezzati M, Jamison D T, Murray C J. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet* 2006; **367** (9524): 1747-1457. doi: 10.1016/s0140-6736(06) 68770-9
2. Choi J H, Chang S A, Choi J O, Song Y B, Hahn J Y, Choi SH, et al. Frequency of myocardial infarction and its relationship to angiographic collateral flow in territories supplied by chronically occluded coronary arteries. *Circulation* 2012; **127**(6): 703-709. doi: 10.1161/circulationaha.112.092353
3. Wang W, Schulze C J, Suarez-Pinzon W L, Dyck J R, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002; **106** (12): 1543-1549. doi: 10.1161/01.CIR.0000028818.33488.7B
4. Mythili S, Malathi N. Diagnostic markers of acute myocardial infarction. *Biomed Rep* 2015; **3**(6): 743-748. doi: 10.3892/br.2015.500
5. Sarkisian L, Saaby L, Poulsen T S, Gerke O, Jangaard N, Hosbond S, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with myocardial infarction, myocardial injury, and nonelevated troponins. *Am J Med* 2016; **129**(4): 445-446. doi: 10.1016/j.amjmed.2015.11.006
6. Skommer J, Rana I, Marques F Z, Zhu W, Du Z, Charchar F J. Small molecules, big effects: the role of microRNAs in regulation of cardiomyocyte death. *Cell Death Dis* 2014; **5**(7): e1325. doi: 10.1038/cddis.2014.287
7. Kränkel N, Blankenberg S, Zeller T. Early detection of myocardial infarction—microRNAs right at the time? *Ann Transl Med* 2016; **4**(24): doi: 10.21037/atm.2016.12.12
8. Porrello E R, Johnson B A, Aurora A B, Simpson E, Nam Y J, Matkovich S J, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res* 2011; **109**(6): 670-679 doi: 10.1161/circresaha.111.248880
9. Boon R A, Dimmeler S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol* 2015; **12**(3): 135. doi: 10.1038/nrcardio.2014.207
10. Hullinger T G, Montgomery R L, Seto A G, Dickinson B A, Semus H M, Lynch J M, et al. Inhibition of miR-15 Protects Against Cardiac Ischemic Injury Novelty and Significance. *Circ Res* 2012; **110**(1): 71-81. doi: 10.1161/circresaha. 111.244442
11. Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(24): 15524-15529. doi: 10.1073/pnas.2426 06799
12. Meyer S U, Stoecker K, Sass S, Theis F J, Pfaffl M W. Posttranscriptional regulatory networks: from expression profiling to integrative analysis of mRNA and microRNA data. *Quantitative Real-Time PCR: Springer* 2014; **5**: 165-188. doi: 10.1007/978-1-4939-0733-5_15
13. Rørholm Pedersen L, Frestad D, Mide Michelsen M, Dam Mygind N, Rasmusen H, Elena Suhrs H, et al. Risk factors for myocardial infarction in women and men: a review of the current literature. *Curr Pharm Des* 2016; **22**(25): 3835-3852. doi: 10.2174/1381612822666160309115318
14. Karantalis V, Balkan W, Schulman I H, Hatzistergos K E, Hare J M. Cell-based therapy for prevention and reversal of myocardial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; **303**(3): H256-270. doi: 10.1152/ajpheart. 00221.2012
15. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes M J, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2018; **39**(2): 119-177. doi: 10.1016/ j.rec.2017.11.010

www.SID.ir

Archive of SID

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

www.SID.ir