مقـــاله تحقیقی

ارزیابی microRNA-197 گردش خون انسان به عنوان یک نشانگر هدف در بیماران مبتلا به اختلال عروق کرونر قلب

شهرام زهتابیان[1]، رضا علی بخشی[2*]، سید یوسف سیدنا[3]، علی رضا رای[4]

[1] دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

[2] استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

[3] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

[4] استادیار، گروه قلب، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

* نشانی نویسنده مسئول:

گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

تلفن: ۹۹۴۸۴۷۴ – ۰۶۱

نشانی الکترونیک: ralibakhshiy@gmail.com

چکیده

زمینه: بیماری شریان کرونر (CAD) به تنگی یا انسداد تمام یا قسمتی از مجرای شریان کرونر به دلیل فرایند آترواسکلروز یا وجود لخته اطلاق می شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط miR-197 سرم به عنوان یک شاخص تشخیصی در بیماران مبتلا به بیماری عروق کرونر است.

روش کار: دراین مطالعه ۱۰۰ بیمارکه دارای اختلال و تنگی شریان عروق کرونر بودند، انتخاب گردیدند. استخراج microRNA ها از نمونه پلاسما خون محیطی با استفاده از کیت اختصاصی استخراج microRNAs انجام گرفت. سپس سنتز cDNA و سطح بیان miR-197 با تکنیک Real Time RT-PCR روش SYBER Green و snRNA U6 به عنوان کنترل داخلی انجام گرفت. جهت تحلیل میزان بیان microRNA و معنی دار بودن از آزمون t-test استفاده شد و برای تعیین ارتباط بین سطح بیان microRNA ها آزمون ضریب همبستگی پیرسون (Pearson) به کار گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دهنده وجود ارتباط مثبت بین سطح بیان miR-197 دربیماران با اختلالات عروق کرونراست و بیان متوسط از ۰/۱۱ ± ۰/۷۸ در نمونه شاهد به میزان ۲/۷۶ بر اساس شدت درگیری عروق کرونر افزایش یافت. بنابراین بیان نسبی miR-197 در گروه بیماران مبتلا به عروق کرونری در مقایسه با کنترل به صورت معنا داری افزایش یافته بود (P<۰/۰۴).

نتیجه‌گیری: احتمالا می توان miR-197 را به عنوان یک شاخص عملکرد سلول‌های اندوتلیال عروق کرونر در نظر گرفت. لذا می‌توان از این microRNA به عنوان نشانگر زیستی جهت پیش آگهی شروع اولیه وکنترل درمان اختلالات عروق کرونر استفاده کرد.

واژگان کلیدی: MiR-197، اختلالات عروق کرونر، snRNA U6، Real Time RT-PCR

مقدمه

بیماری شریان کرونر (CAD) به تنگی یا انسداد تمام یا قسمتی از مجرای شریان کرونر به دلیل فرایند آترواسکلروز و یا وجود لخته اطلاق می‌شود که در آن شریان مبتلا نمی‌تواند نیاز عضله میوکارد به اکسیژن را برآورده سازد و پیامد آن آنژین صدری و انفارکتوس میوکارد است (۲و۱). روش‌های مختلفی جهت تشخیص، "شناسایی"، پیگیری و کنترل درمان قلبی عروقی وجود دارد. در روش‌های درمانی می‌توان استفاده از داروهای ضدانعقاد، دستیابی به عروق کرونر از طریق شریان رانی (PCI)، گشاد کردن کرونر، استنت‌گذاری، جراحی بای‌پس شریان کرونری (CABS) و پیوند از ورید صافن را بر شمرد، اما روش های درمانی یاد شده تهاجمی، خطرناک و پرهزینه هستند (۴ و ۳). لذا روش‌های نوین جهت شناسایی افراد مستعد به تنگی عروق نه تنها در مراحل ابتدایی و اولیه بلکه قبل از شروع اختلالات شریان کرونر و احتمالا پیگیری درمان ضروری می‌باشد.

دراین خصوص مطالعه بر روی microRNAها که خانواده مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها هستند مدنظر قرار گرفته است. microRNAها، RNA های غیر کد کننده با طول ۲۴-۱۹ نوکلئوتید می‌باشند که بیان mRNAهای هدف سلول را تنظیم می‌کنند و لذا در مراحل زیستی مختلف سلول از جمله تمایز، تکثیر، آپوپتوز، سوخت و ساز، تنظیم بیان ژن و حتی نئوپلازی دخیل می‌باشند (۵). این micro RNAها به واسطه RNA پلیمراز II به Pri-miRNA رونوشت شده، سپس به کمک کمپلکس آنزیمی Drosha Pasha در هسته سلول پردازش شده و به pre-miRNA با طول تقریبی ۶۵ نوکلئوتید تبدیل می‌گردد. Pre-mRNA به کمک پروتئین اکسپورتین ۵ و Ran-GTP از هسته به سیتوپلاسم وارد می‌شود. microRNAهای بالغ از طریق ۸-۲ نوکلئوتید ناحیه مرکزی خود به mRNA هدف متصل می‌شود. microRNAها با اتصال به mRNA 3′-UTR هدف، باعث مهار ترجمه در سطح پس از رونویسی می‌گردند و یا مانع اتصال ریبوزوم و ادامه ترجمه شده و همچنین می‌توانند با تشکیل RNAهای دو رشته‌ای (mRNA-microRNA) باعث تسهیل تجزیه سریعتر mRNA گردند (۷ و ۶).

microRNA-197، در جایگاه 1P13.3 در کروموزوم ۱ انسان قرار دارد و در بیولوژی مولکولی، یک مولکول RNA بدون کد گذاری است که مطالعات متعددی در رابطه با عملکرد آن در اختلالات قلبی صورت گرفته است. نتایج مطالعه ای نشان می‌دهد که سطح miR-197 جریان خون در بیماران مبتلا به علائم شدید تنگی شرایین کرونری، که در نهایت باعث مرگ این بیماران شده، افزایش یافته است(۸). همچنین طی یک پژوهش مشخص گردید، سطح miR-197 به طور قابل توجهی در واکنش‌های التهابی عروق کرونر و فعال‌سازی پلاکت‌ها افزایش یافته است. نتایج این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که این بیومارکر نقش مهمی در روند انگیزش واکنش‌های التهابی در سلول‌های آندوتلیال عروق از طریق سیگنال‌های التهابی IL-22 بازی می‌کند. بدین صورت که IL-22 که توسط سلول‌های Th1، Th17 و Th22 تولید می‌شود و نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های التهابی با واسطه T cellها بازی می‌کند، می‌تواند باعث افزایش بیان miR-197 از طریق اتصال STAT3 فسفریله در پروموتور سکانس miR-197 شده و نیز خود رسپتور IL-22، هدف مستقیمی برای miR-197 گردد و در نتیجه miR-197 سیگنال‌های التهابی IL-22 را کنترل می‌نماید (۹). بعلاوه با تمرکز مجدد بر نقش این microRNA در روند التهاب مشخص گردید که افزایش بیان miR-197 خارج سلولی می‌تواند با هدف‌گیری IL-18، کاهش بیان این انترلوکین را از دو طریق تاثیر بر mRNA و همچنین روند سنتز پروتئین آن سبب گردد. IL-18 دارای نقش کلیدی در روند مکانیسم التهاب و سیستم ایمنی است. لذا رابطه معکوسی بین افزایش سطح بیان این microRNA با IL-18 مشاهده گردید(۱۰). آنالیزهای دیگر نیز با تمرکز بر نقش miR-197 در روند التهاب از طریق سیگنال‌های التهابی IL16/STAT3 صورت گرفته است و وجود یک راه تنظیمی دوطرفه بین سیگنال‌های التهابی IL16/STAT3 و miR-197 به اثبات رسید. نهایتا مشخص گردید که اینترلوکین ۱۶ می‌تواند باعث القاء بیان STAT3 در سطح سنتز پروتئین شده، که مجموعه IL16/ STAT3 به نوبه خود باعث تغییر بیان miR-197 از طریق تاثیر بر سیستم اتصال آنزیم Drosha شده و موجب بلوغ و کامل شدن miR-197 می گردد. لذا رابطه تنظیمی دوطرفه ای بین این mi-croRNA و سیگنال‌های التهابی IL16/STAT3 در سلول وجود دارد (۱۱).

همچنین رابطه متقابل این microRNA و تومور ساپرسورها (Tumor Suppressors) مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که این miR-197 از طریق تاثیر مستقیم بر دو پروتئین NOXA و BMF، کاهش روند القاء P53 را سبب شده و باعث تسهیل تکثیر سلولی می‌گردد. لذا افزایش بیان این microRNA نه تنها باعث القاء و افزایش تکثیر سلولی شده، توقف مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را سبب می‌شود (۱۲). در مطالعه دیگر، مشخص گردید سلول‌های آندوتلیال می‌توانند منبع مهمی در تولید miR-197 در سیستم گردش خون باشند. سطوح miR-197 حاصل از پلاکت‌ها با فعال شدن ترومبوسیت‌ها همراه است و در بیماران دریافت‌کننده درمان آنتی پلاکت، سطح miR-197 تغییر یافته که نشان دهنده نقش این microRNA در پیشرفت بیماری قلبی عروقی است. پلاکت‌های فعال شده با افزایش مرگ و میر در بیماران مبتلا به سندرم کرونری حاد، حتی در ماه‌ها و سال‌ها پس از حادثه اولیه رابطه همبستگی دارند. نتایج این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که سطح miR-197 در جریان خون و عروق کرونر در بیماران با علائم شدید تنگی عروق کرونر که نهایتا مرگ بیمار را سبب شده و نیز در واکنش‌های التهابی

عروق کرونر و فعال شدن پلاکت‌ها، به صورت واضحی افزایش یافته است. لذا افزایش سطح بیان این microRNA به طور واضحی می‌تواند پیش آگهی وخامت بیماری قلبی عروقی و مرگ این دسته از بیماران باشد (۱۳).

همچنین miR-197 می‌تواند از طریق NOXA سبب مقاومت در برابر آپوپتوز وابسته به آنکوژن شده و مهار بیان p53 را بطور قابل ملاحظه‌ای سبب گردد. NOXA 3′UTR می‌تواند به عنوان هدف مشخصی برای miR-197 عمل کرده و سبب خاموش شدن STAT6 و تنظیم منفی FOXJ2 گردد و نهایتا تنظیم منفی ژن‌های بیوسنتز کلسترل را سبب شود (۱۵ و ۱۴). بعلاوه miR-197 به عنوان یک تنظیم کننده منفی MCL-1 نیز عمل می‌کند. بیان بیش از حد miR-197، بیان MCL-1 را از طریق هدف‌گیری 3′UTR کاهش داده لذا افزایش سلول‌های انتهایی آپوپتوز را تحت کنترل قرار می‌دهد. افزایش بیان MCL-1 در ایجاد اختصاصی فنوتیپ‌های بدخیم نقش داشته و با افزایش مقاومت به آپوپتوز مرتبط می‌باشد. همچنین miR-197 به طور قابل توجهی باعث افزایش بیان BH3 و محصولات مرتبط با پروآپوپتوز مانند BID، BAX، BAD و BIM شده و کاهش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مانند BCL-2 و BCL-XL را سبب می‌گردد. علاوه بر این، سطح بالایی از miR-197 باعث القای آپوپتوز ناشی از شکست caspase-3، caspase-9 و پلیمر از PARP می‌گردد. همچنین تحقیقات دیگر مشخص نموده است که miR-197 در ارتباط و همراه با مسیر سیگنالینگ JAK / STAT بوده و با مسیر سیگنالینگ گیرنده‌های Toll که نقش مهمی در تکثیر، آپوپتوز و تمایز دارد، نیز مرتبط می‌باشد (۱۸ – ۱۶).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی ارتباط سطح بیان این microRNA و اختلالات قلبی عروقی با تمرکز بر اختلال سلول‌های آندوتلیال و نیزرابطه ریسک فاکتورهای روتین و دخیل در بیماران مبتلا به CAD و افراد سالم، به منظور یافتن بیومارکر احتمالی جهت تعیین پیش آگهی، تشخیص اولیه، پیگیری درمان و تعیین stage بیماری می‌باشد و اینکه احتمالا بتوان در آینده از microRNAها به عنوان بیومارکرهایی در تعیین نوع درمان و نیز هدف مولکولی در طراحی استراتژی‌های جدید کنترل اختلالات قلبی عروقی استفاده نمود.

روش کار

این مطالعه بررسی ۱۰۰ بیمار قلبی مبتلا به اختلال شریان عروق کرونر (CAD) که طی سال های ۱۳۹۶ الی ۱۳۹۷ جهت درمان، چه بصورت دارویی، آنژیوگرافی (PCI) و پیوند شریان کرونری (CABG) به مرکز تحقیقات و تخصصی قلب و عروق واقع در بیمارستان قلب و عروق امام علی (ع) شهر کرمانشاه مراجعه کرده بودند، انجام گردید. در ضمن خصوصیات دموگرافیک بیماران از جمله متغیرهایی نظیر سن، جنس، شاخص توده بدنی، اختلالات چربی، فشار خون شریانی، سابقه بیماری قلبی و غیر قلبی، وضعیت گرافت پس از پیوند و غیره ثبت و استخراج شد. سپس با استفاده از تکنیک Real time PCR Quantification سطح بیان miR-197 در سرم بیماران و نمونه‌های کنترل، به ترتیب طی مراحل ذیل تعیین گردید.

نمونه‌گیری

در این روش ابتدا، تمامی نمونه‌های خون افراد مبتلا به اختلال شریان عروق کرونر در تیوپ‌های free Nuclease حاوی ضد انعقاد EDTA (اتیلن دی امین ترا استیک‌اسید) استریل، جمع‌آوری گردید. سپس پلاسمای نمونه‌ها در مدت کمتر از ۱ ساعت از نمونه گیری، بوسیله سانتریفوژ ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه جدا و به لوله‌های اپندروف Nuclease free منتقل شده و تا زمان جدا سازی RNA در فریزر ۷۰°- سانتیگراد نگهداری شد.

طراحی پرایمرهای miR-197، U6 snRNA

توالی پرایمرهای مورد نظر از پایگاه نوکلئوتیدی NCBI جهت داشتن پرایمر مطلوب، با کمترین شباهت نواحی هدف با توالی‌های دیگر بدست آمد. همچنین جهت اطمینان از عدم همولوژی و مکمل بودن توالی پرایمرها با توالی های نوکلئوتیدی در بخش دیگر ژنوم، به سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST نیز مراجعه گردید. سپس توسط هم ردیفی چندگانه Multiple Alignment توالی‌ها بوسیله نرم‌افزار MEGA4، نواحی حفاظت شده تعیین و در نهایت پرایمرها با استفاده از نرم افزار Allel ID7 طراحی شدند. (جدول ۱)

نهایتا پرایمرها از شرکت تکاپوزیست بصورت لیوفلیزه (در دمای ۲۵–۱۸) سفارش و تحویل گرفته شد و پس از رقیق سازی در دمای ۲۰– درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

استخراج microRNA به روش silica-based fiber matrix

استخراج microRNAها با استفاده از نمونه پلاسمای خون محیطی بیماران انجام گردید و در این مورد از کیت miRNA isolation kit

جدول ۱: پرایمرهای طراحی شده جهت انجام Real-Time PCR برای miR-197 و U6 snRNA

پرایمرتام	پرایمر برگشت	پرایمر رفت
miR-197	´5 ´-GCG AGC ACA GAA TTA ATA-3	´5 ´-TGA TGA CCC CAG GTA ACT CT-3
U6 snRNA	´5 ´- TGG TGT CGT GGA GT-3	´5 ´- CTC GCT TCG GCA GCA CA-3

شرکت Favorgen (Cat No: FAMIK001) و مطابق با پروتکل مربوطه، که قادر به استخراج RNAهای کوچک با طول کمتر از ۲۰۰ جفت باز است استفاده شد. در این روش یک ستون اسپین با ماتریس فیبر مبتنی بر سیلیکا، ریز RNAها را در حضور یک نمک chao-tropic salt بر اساس اتصال انتخابی مولکول‌های RNA از اندازه‌های مختلف به ماتریس فیبر بر پایه سیلیکا silica-based fiber matrix در زمان متفاوت متصل می‌نماید و سپس microRNAها در میکروتیوپ RNase Free جمع‌آوری می‌گردند. خلوص و غلظت این microRNAها با استفاده از التراویوله اسپکتروفوتومتر در جذب 260nm و 280nm با کاربرد دستگاه نانودراپ (USA Nanodrop spectrophotometer Bio Tek) اندازه‌گیری شد. نمونه‌های RNA در A260/280، خلوص بالای ۱/۹ را نشان دادند. سپس این microRNA در دمای ۸۰°C – تا مرحله سنتز cDNA نگهداری گردیدند.

واکنش پلی آدنیلاسیون

واکنش پلی آدنیلاسیون در میکروتیوپ‌ها شامل: Reaction buffer10x (2µℓ), ATP (2µℓ), RNA (2µℓ), poly A enzyme (0.5µℓ) و که با Depc water حجم نهایی 20µℓ رسید و به کمک پیپت به آرامی با یکدیگر مخلوط و در نهایت اسپین شده در واکنش دمایی ۳۷°C به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه و انجام گردید.

سنتز رشته‌های اول cDNA

طی این مرحله از دو پرایمر، یکی پرایمر معکوس مکمل ناحیه پلی آدنیله یا همان آداپتور پرایمر با مشخصات (dT 18 liophilized 0.5 OD oligo) و دیگری پرایمر مستقیم مشابه سکانس microRNA طی مراحل ذیل استفاده شد. ابتدا RNA extract (1µg) با 20 pmol Specific Primer (0.5µℓ) به مدت ۵ دقیقه در ۷۰°C انکوبه شد، سپس به این مجموعه Reaction buffer 5x ,(2µℓ) RT enzyme M-Mulv ،(4µℓ) dNTP mix ،(2µℓ) پرایمرمعکوس oligo dT ،(1µg) RNase Inhibitor، (0.5µℓ) اضافه و با آب تیمار شده با DEPC و بافر مربوطه، نهایتا تک رشته cDNA مکمل microRNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر در دمای ۴۲°C به مدت ۶۰ دقیقه ساخته شد. بعد از سنتز cDNA دما را به مدت ۵ دقیقه در ۹۵°C جهت غیر فعال کردن آنزیم RT تنظیم و واکنش را انکوبه و کامل گردید.

تکثیر به روش Relative quantification real time PCR

در این مرحله ویال‌های مربوط به SYBER Green Master Mix که دور از نور نگهداشته شده بود، بلافاصله قبل از استفاده با سرو ته کردن ویال، محتویات تیوپ را که شامل DNA پلی مراز مقاوم به حرارت Hot start Tag DNA Polymerase ، Mgcl2 ، dNTP ، dUTP و بافر مربوطه می‌باشد مخلوط گردید. واکنش سنجش miR-197 در حجم نهایی 20µℓ شامل: Syber green master mix (10µℓ) ، Primer reverse (1µℓ), Primer forward (1µℓ) cDNA (4µℓ) رنگ فلورسانس ROX dye (4µℓ) که با Nuclease Free Depc Water به حجم مربوطه رسید و بصورت دوتایی (duplicate) در دستگاه Biosystems steponeTM Real time PCR AB Applied مورد سنجش قرار گرفت. در ضمن جهت نرمالیزه کردن سنجش در هر مرحله از RNAهای کوچک هسته‌ای snRNA U6 (housekeeping gene) استفاده شد. همچنین از ۱۰ نمونه سرم سالم که همراه افراد تحت مطالعه تهیه گردیده بود با هم مخلوط شده وبعد از ورتکس کردن، یک نمونه پولد سالم تهیه شد. این نمونه پولد اخیر به عنوان کالیبراتور به کار رفت که همراه نمونه‌های بقیه افراد روی پلیت سنجش گردید. نهایتا طبق الگو دمایی ذیل مراحل انجام گرفت:

۵ دقیقه در ۹۵°C جهت فعال شدن آنزیم و سپس ۴۰ سیکل تکثیر شامل ۱۰ ثانیه در ۹۵° درجه سانتیگراد، ۶۰ ثانیه در ۵۷°C جهت anneling و ۳۰ ثانیه در ۷۲°C جهت extention. در هر Run یک نمونه به عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی Master Mix و یک کنترل داخلی و کنترل مثبت، همزمان ارزیابی می‌گردید.

داده‌های نوری از دستگاه وارد نرم افزارLinReg PCR ویراست ۱۱ شده و سپس برای هر نمونه Ct دوتایی و میانگین آن محاسبه شد (سیکلی که در آن منحنی تزاید خط آستانه را قطع می‌کند) و همچنین Mean PCR Efficiency مشخص می‌گردد. سپس CtΔ (تفاوت Ct بین ژن مورد نظر و کنترل داخلی) و ΔΔCT (تفاوت CTΔ بین نمونه بیمار وکنترل یا نمونه کالیبراتور) محاسبه گردید. و با استفاده از فرمول (Livak -ΔΔCt2) میزان بیان miRNAها محاسبه گردید. در نهایت نسبت بیان یا همان expression ratio برای miRNAها در نمونه‌ها نسبت به نمونه‌های نرمال با نرم افزار Rest 2009 تعیین و بعد از انتقال اطلاعات به نرم‌افزار Ex-cel 2007 و SPSS ویرایش ۱۶ کلیه اعمال تجزیه و تحلیل داده‌ها انجام شد. آزمون آماری مورد استفاده، آزمون t با سطح معنا داری کمتر یا مساوی ۰/۰۵ است و معناداری اختلافات برای بیان ژن بین گروه کنترل و گروه مورد بوسیله این آزمون تعیین گردید و مقدارP کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

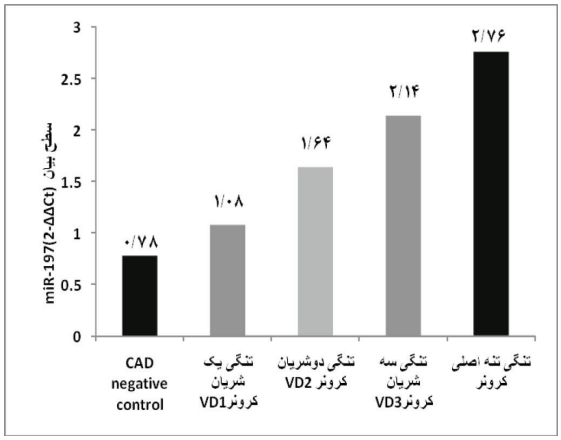
بر اساس تجزیه و تحلیل مکرر داده‌ها، سطوح بیان miR-197 در تمامی نمونه‌های بیماران عروق کرونر به درجات مختلف، افزایش بیان بارزی را در مقایسه با گروه سالم نشان می‌دهد، بعبارتی که

تفاوت معنی‌داری از لحاظ سطح بیان این microRNA بین افراد بیمار و کنترل وجود دارد (جدول۲). بدین صورت که بر اساس نتایج، بیان miR-197 با درصد و تعداد عروق درگیر رابطه معنی دار و مستقیمی داشت و میزان بیان miR-197 برپایه درگیری عروق کرونر بین ۳۰ تا ۳۰۰ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می‌داد ($P < ۰/۰۵$ و $P < ۰/۰۰۴$).

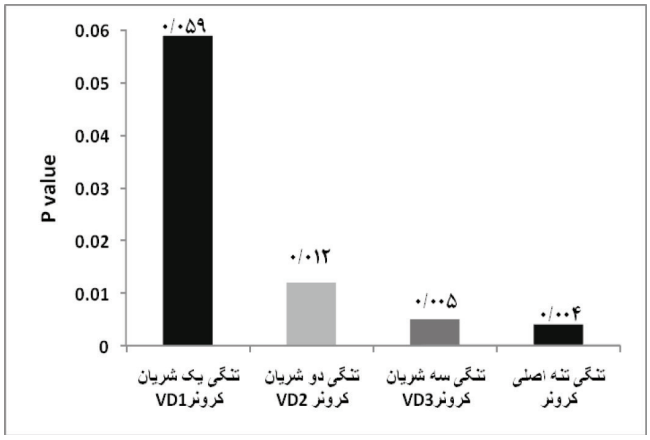
لازم به ذکر است که از کل بیماران، تعداد ۵۲ بیمار با تنگی سه شریان کرونر، ۱۷ بیمار با تنگی دو شریان کرونر، ۲۸ بیمار با تنگی یک شریان کرونر و ۳ بیمار به تنگی تنه اصلی کرونر مبتلا بودند. در بررسی، ارتباط سطح بیان miR-197 با توجه به متغیر کمی سن در چهار گروه مبتلا: در گروه بیمار با در گیری یک رگ کرونر، میزان بیان سرمی miR-197 با میانگین ۱/۰۸ و فاصله اطمینان ۰/۹۱–۲/۵۱ و میانگین سنی ۵۸ سال، در گروه بیمار با درگیری دو رگ کرونر میزان بیان سرمی miR-197 با میانگین ۱/۶۴ و فاصله اطمینان ۱/۱۶–۳/۳۲ و میانگین سنی ۶۰ سال، در گروه بیمار با درگیری سه رگ کرونر، میزان بیان سرم miR-197 با میانگین ۲/۱۴ و فاصله اطمینان ۱/۳۱–۳/۹۷ و میانگین سنی ۶۵ سال و در بیماران با تنگی تنه اصلی کرونر، میزان بیان سرمی miR-197 با میانگین ۲/۷۶ و فاصله اطمینان ۱/۷۷–۴/۵۳ و میانگین سنی ۶۴ سال با انحراف معیار ۷ بود. که از جنبه آماری، ضریب همبستگی پیرسون اختلاف معنا دار بین گروه‌ها را نشان داد.

از نظر متغیرهای بیوشیمیایی، میانگین سطح کلسترول در گروه کنترل (CAD -)۲۲±۱۵۳ و در گروه بیماران (CAD +) ۴۵ ± ۱۹۰ مشخص گردید. با وجود افزایش کلسترول ، نتایج T-test اختلاف معنی داری بین میانگین سطح کلسترول سرم در گروه کنترل و گروه بیمار را نشان نمی‌داد ($P < ۰ / ۴۰۷$).

میانگین LDL سرم در گروه کنترل (CAD -) ۱۳ ±۱۰۰ و در گروه بیمار۳۱ ± ۱۲۹ (CAD+) تعیین گردید که نتایج آزمون t در این مورد هم، علیرغم افزایش سطح سرمی LDL در بیماران، بیانگر آن بود که اختلاف معنی داری میان میانگین سطح LDL سرم در گروه کنترل و گروه بیمار بارز نمی‌باشد ($P< ۰/۷۳۳$). میانگین HDL سرم در گروه کنترل (CAD -) ۳±۳۳ و در گروه بیمار (CAD +) ۲±۳۰ ثبت گردید، که برخلاف دو فاکتور پیشین، میزان HDL روندی کاهشی را در بیماران قلبی عروقی نشان می‌داد. اما علیرغم کاهش سطح سرمی HDL در بیماران نسبت به افراد کنترل و سالم، اختلاف معنی داری میان میانگین سطح HDL سرم، در گروه کنترل و گروه بیمار وجود نداشت ($P< ۰/۲۷۳$). نهایتا میانگین تری گلیسیرید سرم در گروه کنترل (CAD -) ۱۸ ±۱۴۵ و در گروه مورد (CAD +) ۴۹ ± ۱۸۸ مشخص گردید که باز علیرغم افزایش سطح سرمی این فاکتوردر بیماران، نتایج آزمون T تفاوت معنی داری



شکل ۱ : نمودار سطح بیان miR-197 بر حسب تعداد عروق کرونر درگیردر بیماران CAD+



شکل۲: توزیع سطح معنادار miR-197 بر حسب شدت در گیری عروق کرونر در بیماران CAD+

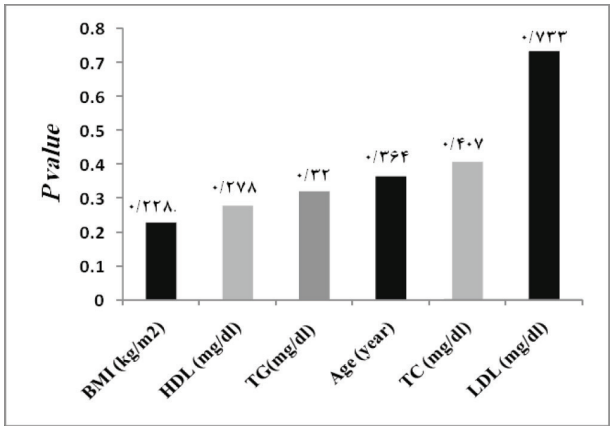
جدول ۲: سطح بیان miR-197 برحسب تعداد عروق کرونر درگیر دربیماران قلبی عروقی

نوع اختلال عروق کرونر	تعداد بیمار +CAD	سطح بیان miR-197	P-Value
تنگی یک شریان کرونر VD1	۲۸	۱/۰۸	<۰/۰۵۹
تنگی دوشریان کرونر VD2	۱۷	۱/۶۴	<۰/۰۱۲
تنگی سه شریان کرونر VD3	۵۲	۲/۱۴	<۰/۰۰۵
تنگی تنه اصلی کرونر	۳	۲/۷۶	<۰/۰۰۴

جدول ۳: مقایسه و میزان بیان شاخص های بیوشیمیایی و دموگرافیک در میان بیماران قلبی عروقی و افراد سالم

متغیرها	گروه کنترل	گروه بیمار	P-value
جنس(مرد/زن)	۱۶/۱۴	۸۷/۱۳	-
سن(سال)	۵۵±۸	۵۷±۹	۰/۳۶۴
شاخص توده بدنی (kg/m^2)	۲۷/۴۵±۲/۰۹	۲۷/۷۸±۳/۴۵	۰/۲۲۸
کلسترول تام(mg/dl)	۱۵۳±۲۲	۱۹۰±۴۵	۰/۴۰۷
LDL لیپوپروتئین با دانسیته پایین(mg/dl)	۱۰۰±۱۳	۱۲۹±۳۱	۰/۷۳۳
HDL لیپوپروتئین با دانسیته بالا(mg/dl)	۳۰±۲	۳۳±۳	۰/۲۷۳
TG تری گلیسرید(mg/dl)	۱۴۵±۱۸	۱۸۸±۴۹	۰/۳۲۰

را بین میانگین سطوح تری گلیسرید سرم، در گروه کنترل و گروه بیمارنشان نداد (P< ۰/۳۲۰) (جدول ۳) .



شکل۳: توزیع سطح معنادار شاخص های کلینیکال روتین در بیماران قلبی عروقی.
BMI: شاخص توده بدنی (kg/m^2) ، HDL: لیپوپروتئین با دانسیته بالا (mg/dl) ، TG: تری گلیسرید (mg/dl) ، TC: کلسترول تام (mg/dl) ، LDL: لیپوپروتئین با دانسیته پایین (mg/dl)

بحث و نتیجه گیری

طی چند سال گذشته توجه بسیاری از پژوهشگران به سمت بررسی نقش microRNAها درعملکردهای سلولی مولکولی ونیز اختلالات و بیماری های مختلف معطوف گردیده است (۲۰ و ۱۹). از آنجایی که در زمینه بیماری های قلبی و عروقی، بخصوص تشخیص، کنترل و درمان از جنبه ژنتیک مولکولی با تمرکز بر نقش microRNAها تحقیقات دقیقی حداقل در کشور ما صورت نگرفته است لازم به نظر می‌رسد. در این زمینه تحقیقات گسترده‌تری انجام گیرد. از اهداف انجام این پژوهش بررسی بیان و نقش microRNA-197 در اختلالات قلبی عروقی با هدف‌گیری عروق کرونر قلب می‌باشد، البته هدف کلی، بررسی امکان کاربرد این microRNA به عنوان بیومارکر رایج تشخیص عملکرد عروق کرونر و کنترل درمان بیماری‌های قلبی می‌باشد. پژوهش اخیر به بررسی نقش miR-197 در بیماران قلبی عروقی با استفاده از تکنیک real time PCR Relative quantification (روش تعیین کمیت نسبی) به روش SYBER Green، پرداخته است. اساس این روش توانایی اتصال رنگ SYBER Green به DNA دو رشته‌ای و ایجاد سیگنال فلورسانس مناسب و آشکار نمودن روند تکثیر طی real time PCR است. یکی از کاربردی‌ترین موارد استفاده از این روش، بررسی بیان ژن‌ها می‌باشد، در این حالت نیاز به نمونه استاندارد نمی باشد و کاهش یا افزایش بیان را در مقایسه با یک استاندارد یا ژن مرجع و همچنین تهیه رقت از نمونه کالیبراتور نشان می‌دهد. در این حالت می‌توان از RNA، DNA، cDNA ژنومی و یا حتی DNA کلون شده استفاده نمود. این تکنیک امروزه به عنوان روشی بسیار دقیق و اختصاصی جهت بررسی بیان microRNAها بکار می‌رود (۲۱).

مطالعه حاضر تغییر بیان و تاثیر miR-197 را با توجه به شاخص‌های روتین دموگرافیک و بیوشیمیایی در بیماران با اختلال شریان عروق کرونر که طی سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷ جهت درمان چه بصورت دارویی، آنژیوگرافی (PCI) و پیوند شریان کرونری (CABS) به مرکز تحقیقاتی تخصصی قلب و عروق واقع در بیمارستان امام علی (ع) شهر کرمانشاه مراجعه کرده اند، ارزیابی می‌کند. بر طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش، روند افزایشی و کاهشی بیان microRNA مورد مطالعه می‌تواند منعکس کننده عملکرد و روند بیولوژی سلول‌های آندوتلیال عروق کرونر قلب باشد، به صورتی که هر گونه اختلال درعملکرد سلول‌های آندوتلیال عروقی که در stageهای مختلف بیماری قلبی عروقی ظاهر می‌شود می تواند تاثیر بارزی بر تغییربیان این microRNAها داشته باشد. لذا این تغییر بیان microRNAها می‌تواند مستقیما نشان دهنده وضعیت عروق کرونر در مراحل ابتدایی و پیش آگهی بیماری و نیز طی مراحل بیماری قلبی و حتی مطالعه روند بهبود بیماری بعد از پیوند باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که در اختلالات عروق کرونر قلب، microRNA افزایش بیان مشخصی را نشان می‌دهد و این افزایش

بیان در تمامی نمونه‌های بیماران (CAD+) به درجات مختلف درگیری عروق، در مقایسه با گروه سالم (CAD-) دیده می‌شود، بصورتی که تفاوت معنی‌داری از لحاظ سطح بیان این microRNA بین افراد سالم و بیمار وجود دارد. همچنین بر اساس نتایج، بیان miR-197 با درصد و تعداد عروق درگیر نیز رابطه معنی‌دار و مستقیمی دارد. به این معنا که میزان بیان miR-197 برپایه درگیری عروق کرونر بین ۳۰ تا ۳۰۰ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵ و P< ۰/۰۰۴).

بصورت واضح در چهار گروه مبتلا با توجه به سطح بیان ۰/۱۱±۰/۷۸ در گروه کنترل (CAD-)، در گروه بیمار با در گیری یک رگ کرونر، میزان بیان سرمی miR-197 با میانگین ۱/۰۸ با فاصله اطمینان ۲/۵۱-۰/۹۱ و میانگین سنی ۵۸ سال و در گروه بیمار با درگیری دو رگ کرونر میزان بیان سرمی miR-197 میانگین ۱/۶۴ با فاصله اطمینان ۳/۳۲-۱/۱۶ و میانگین سنی ۶۰ سال و در گروه بیمار با در گیری سه رگ کرونر، میزان بیان سرم miR-197 میانگین ۲/۱۴ با فاصله اطمینان ۳/۹۷-۱/۳۱ و میانگین سنی ۶۵ سال و در بیماران با تنگی تنه اصلی کرون، میزان بیان سرمی miR-197 با میانگین ۲/۷۶ با فاصله اطمینان ۴/۵۳-۱/۷۷ و میانگین سنی ۶۴ سال بود. که از جنبه آماری و ضریب همبستگی پیرسون اختلاف معنادار بین گروه‌ها وجود داشت (P =۰/۰۰۴).

بیان افزایشیmiR-197 سرم، احتمالا منعکس کننده ایجاد تغییرات عملکردی درسلول های اندوتلیال عروق کرونر و نهایتا شدت درگیری و وخامت بیماری قلبی می باشد. لذا این microRNA احتمالا به همراه اطلاعات ریسک فاکتور های دیگر بیماری قلبی می تواند به عنوان بیومارکر مهمی در پیش آگهی شروع اولیه، تشخیص، پیگیری و کنترل وضعیت سلول‌های آندوتلیال عروق کرونر و درمان اختلالات عروق کرونر بیماری CAD مطرح شود.

همچنین ریسک فاکتورهای مهمی که به صورت روتین در بیماران قلبی عروقی مورد سنجش قرار می‌گیرد، از جمله Total cholestrol، TG، LDL، شاخص توده بدنی و سن بیمار، (به جز HDL که کاهش و همبستگی معکوسی را نشان می‌داد) همبستگی مثبت و افزایش بیان مشخصی را نشان می‌داد. اما علی رغم افزایش بیان پارامترهای اخیر در چهارگروه از بیماران، با گرفتگی یک، دو، سه و تنه اصلی کرونر، این افزایش بیان معناداری را نشان نمی‌داد. لذا از متغیرهای مورد بررسی در این تحقیق، علیرغم افزایش سطح بیان اکثر پارامترها، به نظر می‌رسد بیومارکر miR-197 همبستگی مثبت و معنادار مهمی در این دسته از بیماران را دارا می‌باشد.

از متغیرهای مورد بررسی در این تحقیق، علیرغم افزایش سطح بیان اکثر پارامترها، به نظر می رسد بیومارکر miR-197 همبستگی مثبت و معنا داری مهمی در این دسته از بیماران نسبت به افراد کنترل محسوب می‌گردد. بنابراین افزایش و تغییر بیان مشخص miR-197 در ضایعات عروق کرونر، احتمالا می‌تواند منعکس کننده تغییرعملکرد سلول‌های اندوتلیال عروق کرونر و نیز با وسعت گرفتگی عروق کرونر ارتباط معنا داری در این دسته از بیماران داشته باشد و احتمالا miR-197 می تواند به عنوان یک بیومارکر مهم در تشخیص، پیگیری و کنترل وضعیت عروق کرونر و بیماری CAD مطرح گردد.

بنابراین به نظر می رسد اندازه گیری miR–197 به عنوان بیومارکر سرمی، می‌تواند به عنوان یک ریسک فاکتور بیماری قلبی عروقی، بسیار ارزشمند باشد. از این رو انجام پژوهش‌های بیشتر جهت دست یافتن به مجموعه‌ای از پانل‌های microRNA با همراهی miR-197 می‌تواند به تشخیص زودرس این گونه از ضایعات قلبی–عروقی، کمک نماید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی همکاران در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال که در انجام این تحقیق کمک فراوانی نمودند، اعلام می‌نمایند.

منابع

1. Kanuri SH, Ipe J, Kassab K, Gao H, Liu Y, Skaar TC, et al. Next generation MicroRNA sequencing to identify coronary artery disease patients at risk of recurrent myocardial infarction. Atherosclerosis 2018;278:232-239.

2. Writing Group Members, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation 2016;133(4):e38-360.

3. Albus C, Barkhausen J, Fleck E, Haasenritter J, Lindner O, Silber S. The Diagnosis of Chronic Coronary Heart Disease. Dtsch Arztebl Int 2017;114(42):712-719.

4. Albus C, Barkhausen J, Fleck E, Haasenritter J, Lindner O, Silber S. The Diagnosis of Chronic Coronary Heart Disease. Dtsch Arztebl Int 2017;114(42):712-719.

5. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. Int J Mol Sci 2016;17(10):1712.

6. Liu H, Lei C, He Q, Pan Z, Xiao D, Tao Y. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer. Mol Cancer 2018;17(1):64.

7. Mihailescu R. Gene expression regulation: lessons from noncoding RNAs. RNA 2015;21(4):695-6.

8. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, Karakas M, Ojeda F, Lau DM, et al. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in

a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. PLoS One 2015;10(12):e0145930.

9. Lerman G, Sharon M, Leibowitz-Amit R, Sidi Y, Avni D. The crosstalk between IL-22 signaling and miR-197 in human keratinocytes. PLoS One 2014;9(9):e107467.

10. Chen L, Li C, Peng Z, Zhao J, Gong G, Tan D. miR-197 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Hepatitis B Virus-Infected Patients. Gut Liver 2013;7(3):335-42.

11. Wang H, Su X, Yang M, Chen T, Hou J, Li N, et al. Reciprocal control of miR-197 and IL-6/STAT3 pathway reveals miR-197 as potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. Oncoimmunology 2015;4(10):e1031440.

12. Fiori ME, Barbini C, Haas TL, Marroncelli N, Patrizii M, Biffoni M, et al. Antitumor effect of miR-197 targeting in p53 wild-type lung cancer. Cell Death Differ 2014;21(5):774-82.

13. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, Karakas M, Ojeda F, Lau DM, et al. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. PLoS One 2015;10(12):e0145930.

14. Shibue T, Takeda K, Oda E, Tanaka H, Murasawa H, Takaoka A, et al. Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. Genes Dev 2003;17(18):2233-8.

15. Dubey R, Saini N. STAT6 silencing up-regulates cholesterol synthesis via miR-197/FOXJ2 axis and induces ER stress-mediated apoptosis in lung cancer cells. Biochim Biophys Acta 2015;1849(1):32-43.

16. Ling J, Wu X, Fu Z, Tan J, Xu Q. Systematic analysis of gene expression pattern in has-miR-197 over-expressed human uterine leiomyoma cells. Biomed Pharmacother 2015;75:226-33.

17. Yang Y, Li F, Saha MN, Abdi J, Qiu L, Chang H. miR-137 and miR-197 Induce Apoptosis and Suppress Tumorigenicity by Targeting MCL-1 in Multiple Myeloma. Clin Cancer Res 2015;21(10):2399-411.

18. Fiori ME, Barbini C, Haas TL, Marroncelli N, Patrizii M, Biffoni M, et al. Antitumor effect of miR-197 targeting in p53 wild-type lung cancer. Cell Death Differ 2014;21(5):774-82.

19. Jia HL, Liu CW, Zhang L, Xu WJ, Gao XJ, Bai J, et al. Sets of serum exosomal microRNAs as candidate diagnostic biomarkers for Kawasaki disease. Sci Rep 2017;7:44706.

20. McManus DD, Rong J, Huan T, Lacey S, Tanriverdi K, Munson PJ, et al. Messenger RNA and MicroRNA transcriptomic signatures of cardiometabolic risk factors. BMC Genomics 2017;18(1):139.

21. Tang T, Cheng Y, She Q, Jiang Y, Chen Y, Yang W, et al. Long non-coding RNA TUG1 sponges miR-197 to enhance cisplatin sensitivity in triple negative breast cancer. Biomed Pharmacother 2018;107:338-346.