

The investigation of miR-499 in apoptosis of cardiomyocytes in blood serum of MI patients

Hesam Hasanzadeh¹, Changiz Ahmadizadeh², Abolfazl Ghorbani³

¹ MSc, Department of Molecular Genetics, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

² Assistant Professor, Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

³ Assistant Professor, Department of Genetics, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

Abstract

Background: Ischemic heart diseases (IHD) cause most deaths worldwide in a way that they are the cause of more than 30 percent of the deaths. After the discovery of miRNA in 1990 and the discovery of more than 2500 types of miRNA, gradually the importance of these mechanism regulators and molecular signals and gene routes were identified in the processes and the cellular mechanisms, especially in cardiovascular system. The goal of this research was to investigate miR-499 dominating the apoptosis of heart cellules in serums of the patients with MI (myocardial infarction).

Materials and methods: In this case-control study, miR-499 were investigated by real time PCR among 70 MI patients in Shahid Madani Hospital in Tabriz in 2017 and the data were compared with healthy persons. The statistical analyses were carried out using SPSS (version19) by t-test method. $P < 0.05$ were considered as significant.

Results: The expression levels of miR-499 significantly increased among MI patients compared to control group ($P = 0.007$). The miR-499 expression has no significant difference between overweight and normal weight people ($P = 0.06$).

Conclusion: The present study showed that the expression of miR-499 among individuals suffering from MI has been greater than healthy people and it can be utilized as a diagnostic and also prognostic factor of MI patients.

Keywords: Acute myocardial infarction, Apoptosis, miR-499.

Cited as: Hasanzadeh H, Ahmadizadeh CH, Ghorbani A. The investigation of miR-499 in apoptosis of cardiomyocytes in blood serum of MI patients. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(2): 155-162.

Correspondence to: Changiz Ahmadizadeh

Tel: +989104030464

E-mail: ch-ahmadizadeh@iau-ahar.ac.ir

ORCID ID: 0000-0003-0780-3159

Received: 8 Sep 2018; **Accepted:** 27 Nov 2018

بررسی miR-499 دخیل در روند آپوپتوز سلول های قلب در سرم بیماران دچار MI

حسام حسن زاده^۱، چنگیز احمدی زاده^۲، ابوالفضل قربانی^۳

^۱ کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک مولکولی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

^۲ استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران

^۳ استادیار، گروه ژنتیک، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری های قلبی اسکیمیک (IHD) دلیل بیشتر مرگ و میرها در سطح جهان است، به طوری که عامل بیش از ۳۰٪ مرگ و میرها است. بعد از کشف miRNAها در سال ۱۹۹۰ و کشف بیش از ۲۵۰۰ نوع miRNA رفته رفته اهمیت این تنظیم کنندگان مکانیسم و سیگنال های مولکولی و مسیرهای ژنی در پروسه ها و مکانیسم سلولی بخصوص در سیستم قلبی عروقی مشخص شده است. هدف از این تحقیق بررسی miR-499 دخیل در روند آپوپتوز سلول های قلب در سرم بیماران دچار انفارکتوس قلبی (MI) بود.

روش بررسی: در این مطالعه موردی-شاهدی، بیان miR-499 در ۷۰ بیمار بستری به علت MI در بیمارستان شهید مدنی تبریز در سال ۱۳۹۶ توسط Real time PCR بررسی و با همان تعداد فرد سالم مقایسه شد. تحلیل آماری با نرم افزار SPSS (version 19) و با به کار بردن t-test/انجام شد. مقادیر $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: سطح بیان miR-499 در بیماران مبتلا به MI در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد ($P=0.007$). بیان miR-499 در افراد چاق و نرمال تفاوت معنی داری از نظر آماری نداشت ($P=0.06$).

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که بیان ژن miR-499 در افراد دچار MI بیشتر از افراد سالم است و بیان آن می تواند به عنوان عامل تشخیصی و همچنین در تعیین پیش آگهی بیماران مبتلا به MI به کار رود.

واژگان کلیدی: انفارکتوس میوکارد حاد (MI)، آپوپتوز، miR-499

مقدمه

تنگی سرخرگ های کرونر و مخصوصاً سکته حاد قلبی در این گونه کشورها افزایش یافته است (۲، ۳). مرگ و میر بیماری های قلبی-عروقی در کشورهای توسعه یافته روبه کاهش نهاده، ولی در کشورهای در حال توسعه و همچنین ایران به دلیل افزایش امید به زندگی، سهم بیماری های قلبی-عروقی در میان عوامل منتهی به مرگ در حال افزایش است و طبق پیش بینی سازمان جهانی بهداشت، عامل اصلی مرگ و میر در سراسر دنیا، در سال ۲۰۲۰ خواهد بود (۴). بیماری های عروق کرونر قلب طیف گسترده ای دارند که یک سر آن آسیب قابل برگشت میوکارد (آنژین پایدار یا ناپایدار یا درد قفسه سینه) و انتهای دیگر آن انفارکتوس حاد میوکارد (آسیب غیرقابل برگشت قلب که منجر به جایگزینی بافت قلبی غیرزنده با بافت اسکار

بیماری های قلبی و عروقی شایع ترین علت مرگ و میر در اکثر کشورهای جهان هستند (۱). طی چند دهه گذشته بیماری سرخرگ های کرونر و MI (Acute Myocardial Infarction) عامل درجه اول مرگ در کشورهای صنعتی بوده است، ولی طی همین مدت با شناخت هر چه بیشتر عوامل خطر، کنترل هر چه بهتر آن ها در افراد مبتلا به این عوامل، سن ابتلا به بیماری

آدرس نویسنده مسئول: اهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، استادیار گروه میکروبیولوژی، چنگیز احمدی

زاده (email: ch-ahmadizadeh@iau-ahar.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0003-0076-2446

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۶/۱۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۹/۶

تبریز، در محدوده سنی ۶۰-۳۰ سال در سال ۱۳۹۶ در صورت دارا بودن معیارهای ورود به مطالعه، وارد مطالعه شدند. از تمامی شرکت کنندگان پس از توضیح کامل مطالعه، رضایت نامه کتبی گرفته شد. داده‌ها برگرفته از گزارش نوار قلب، آزمایشگاه و اکوکاردیوگرافی بیماران بود. تاریخچه ابتلا به بیماری (مثبت، منفی)، دریافت دارویی، سابقه جراحی و فعالیت بدنی (فعالیت بدنی: ندارد، کم، متوسط، فعال و بسیار فعال) و پرسش‌نامه تغذیه‌ای نیز توسط پرسشگران آموزش دیده با استفاده از پرسش نامه دموگرافیک به دست آمد. شاخص‌های فعالیت، تغذیه، سبک زندگی تکمیل شده و مارکرهای بیوشیمیایی شامل CK-MB، CPK، LDH، AST و cTnT سرمی اندازه‌گیری شد؛ سپس ارتباط بین *miR-499* و متغیرهای تغذیه‌ای، سبک زندگی، مارکرهای بیوشیمیایی و شدت بیماری تحلیل شد. بعد از تحویل خون به مقدار ۵ میلی لیتر از هر فرد به صورت محیطی از بیماران، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در ظروف حاوی EDTA تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد.

روش استخراج Micro-RNA

در این مطالعه حدود دویست میکرولیتر سرم توسط کیت اختصاصی جداسازی و استخراج microRNAها با استفاده از *miRCURY RNA isolation kit* از شرکت اگزیکون انجام شد. برای تعیین غلظت RNA از دستگاه نانودراپ استفاده شد و اساس کار این دستگاه اسپکتروفتومتری بود که سرعت و دقت بالایی در سنجش غلظت اسیدهای نوکلئیک دارد. این دستگاه، OD (optical density) نمونه را در طول موج ۲۶۰ nm برای تعیین غلظت RNA اندازه‌گیری کرد. هر واحد OD در طول موج ۲۶۰ nm برابر با 40 ng/ml RNA تک رشته‌ای است.

سنتز cDNA

برای سنتز cDNA micro RNA از کیت شرکت Exiqon استفاده شد. دستورالعمل این شرکت شامل ۲ مرحله است. مرحله اول شامل اضافه کردن poly A و مرحله دوم reverse transcription است. بر طبق پروتکل ابتدا با آنزیمی که از ویروس گرفته شده صاحب دم poly A از انتهای 3 شده، سپس توسط پرایمر مخصوص کیت از تمام RNAهای کوچک cDNA ساخته شد. مرحله اول در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه و واکنش مرحله دوم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه انکوبه شد.

Real-time-PCR

میزان بیان ژن‌ها به وسیله دستگاه Lightcycler96-Roche اندازه‌گیری شد. ابتدا cDNAهای سنتز شده با توجه به توصیه کیت مورد استفاده، ۱ به ۲۰ رقیق شدند. سپس با

فیبروتیک و غیرقابل انقباض) است. عواملی که در ارتباط با افزایش خطر ایجاد بیماری عروق کرونر قلب هستند را می‌توان به سه دسته بزرگ اصلی تقسیم کرد که شامل عوامل غیرقابل اصلاح و تغییر (سن بالای ۴۵ سال در مردان و ۵۵ سال به بالا در زنان، یائسگی زودرس بدون درمان با جایگزینی هورمونی در زنان، تاریخچه فامیلی بیماری عروق کرونر قلب)، عوامل قابل اصلاح و تغییر (سیگار، چاقی، فشارخون بالا، دیابت ملیتوس، فعالیت فیزیکی ناکافی، افزایش کلسترول کل خون، افزایش سطح کلسترول LDL، کاهش سطح کلسترول HDL)، و عوامل خطر قلبی پیشنهاد شده (مصرف ناکافی ویتامین‌های ب کمپلکس، هیپرتانسیون) است (۵). بر اساس برخی گزارش‌ها عامل اصلی انفارکتوس میوکارد حاد تغییر نحوه زندگی است (۶). درمان‌های مبتنی بر شواهد شامل کاربرد عوامل مهارکننده آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین، استاتین‌ها، آنژیوپلاستی، تعبیه استنت و مخصوصاً کاربرد ترومبولیتیک‌ها و... به درمان روتین بیماری عروق کرونر افزوده شده‌اند (۷). بعد از کشف miRNAها، جایگاه آن‌ها در پروسه‌ها و مکانیسم سلولی به‌خصوص در سیستم قلبی عروقی مشخص شده است. miRNAهای زیادی وجود دارند که در بیماری‌های قلبی و عروقی افزایش یا کاهش پیدا می‌کنند. miRNAها معمولاً RNAهای ۲۴-۱۸ نوکلئوتیدی و بسیار حفاظت‌شده هستند (۸). تاکنون بیش از ۲۵۰۰ miRNA انسانی شناخته شده‌اند (۹). مطالعات نشان می‌دهند که این مولکول‌ها بیان بیش از ۳۰٪ از ژن‌های بنیادی را در فرایند بیولوژیک مختلف تنظیم می‌کند. این فرایند شامل تکثیر، تمایز، مهاجرت، آپوپتوز و مرگ می‌باشد (۱۰ و ۱۱). miRNAها با هدف قرار دادن mRNA ژن‌های هدف باعث خاموشی ژن‌ها می‌گردند. بسیاری از فرایندهای پاتولوژیکی از جمله بیماری‌های قلبی و عروقی با بیان غیر نرمال این مولکول‌ها در ارتباط می‌باشند (۱۲ و ۱۳). با افزایش شواهد دال بر عملکرد تنظیم‌کنندگی miRNAها در سیستم‌های متعدد بیولوژیکی، ارزش این مولکول‌ها به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی و درمانی در بیماری‌های مختلف روزبه‌روز رو به افزایش است (۱۴). هدف از این مطالعه تحقیق بررسی *miR-499* دخیل در روند آپوپتوز سلول‌های قلب در سرم بیماران دچار MI بود.

مواد و روشها

در این مطالعه موردی-شاهدی، ۷۷ زن و مرد مبتلا به بیماری قلب و عروق با عارضه سکته قلبی (MI) با تشخیص بالینی پزشکی متخصص بستری در بیمارستان فوق تخصصی قلب شهید مدنی

جدول ۱. شرایط دمایی PCR

مرحله	زمان	دما
واسرشتگی اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد
واسرشتگی	۱۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی گراد
اتصال و گسترش	۶۰ ثانیه	۶۰ درجه سانتی گراد
		مرحله تکثیر به تعداد ۴۵ چرخه

جدول ۲. مشخصات پرایمر های مورد استفاده در پژوهش

miR-499	204102, hsa-miR-499-5p, LNA™ PCR primer set, UniRT miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, microRNA primer set, 200 rxns
U6	203907, U6 snRNA (hsa, mmu, rno) PCR primer set, UniRT. miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, reference gene primer set. NCBI Symbol U6snRNA, NCBI Accession: x59362

جدول ۳. اطلاعات دموگرافیکی افراد مورد مطالعه

ویژگی	زنان بیمار	مردان بیمار	زنان سالم	مردان سالم
سن (سال)	۷۵±۴	۶۸±۲	۴۰±۳	۴۲±۲
وزن (کیلوگرم)	۶۵±۳	۷۹±۳	۶۱±۳	۷۸±۳
قد (سانتی متر)	۱۵۹±۲	۱۶۶±۲	۱۶۴±۱	۱۶۹±۳
شاخص توده بدن (kg/m ²)	۲۲±۱	۲۴±۰/۴	۲۰±۱	۲۵±۱

استفاده از پرایمرهای اختصاصی اقدام به آماده سازی نمونه ها برای Real-time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شد.

بعد از آماده سازی محلول طبق توصیه کیت با استفاده از برنامه جدول ۱ و دستگاه light 96 Roche میزان بیان ژن-ها بررسی شد و سپس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ اقدام به بررسی میزان نمونه ها شد.

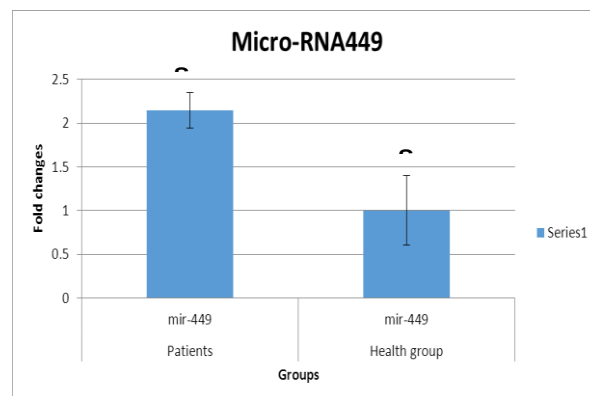
در این مطالعه برای حصول اطمینان از صحیح سنتز cDNA، PCR برای miR-U6 به عنوان ژن کنترل داخلی انجام شد. برای نرمال سازی بیان ژن ها در نمونه های کنترل و تومور با توجه به اینکه پرایمرهای مورد استفاده به صورت کاملاً تجاری هستند و طبق ادعای شرکت سازنده دارای حداکثر بازدهی در طول واکنش هستند از فرمول $ct = ct(target) - ct(control)$ استفاده شد. سپس در هر یک از دو گروه برای درک چگونگی تغییرات بیان ژن ها ΔCt محاسبه شده برای هر یک از نمونه ها در فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای هر یک وارد شد تا بیان دقیق هر نمونه مشخص شود. در نهایت داده های حاصله در دو گروه با استفاده از روش های آماری با هم مقایسه شد. با توجه به اینکه در این مطالعه هم برای ژن کنترل داخلی و هم ژن های مورد بررسی از کیت real time ویژه micro RNA ساخت کمپانی Exiqon استفاده شد که مراحل انجام تکنیک و

دمای مرحله اتصال پرایمر در این کیت تمام ژن ها یکسان و برابر با ۶۰ درجه سانتی گراد طبق جدول ۲ است. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در جدول ۲ آمده است. پرایمرهای miR-499 و رفرانس آن U6 از شرکت اگزیکون تهیه شده است. توالی miR-499 عبارت از UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU است (۱۵). جهت تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS.version19 و t-test استفاده شد. $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اطلاعات دموگرافیک افراد مورد مطالعه در جدول ۳ و منحنی ذوب در نمودار ۱ قابل مشاهده هستند. تایید اختصاصی بودن عملکرد پرایمرها و نیز عدم آلودگی به DNA ژنومی با بررسی پیک منحنی اختصاصی ذوب در دمای ۷۸ درجه سانتی گراد نشان داده شد. میانگین سنی مردان و زنان گروه بیماراران مورد مطالعه به ترتیب 75 ± 4 و 68 ± 2 سال بود. میانگین سنی مردان و زنان گروه سالم به ترتیب 40 ± 3 و 42 ± 2 سال بود. در مطالعه حاضر بررسی بیان miR-499 به روش RT-PCR با استفاده از رنگ سایبرگرین انجام شد. میزان بیان ژن miR-499 در سرم خونی افراد مبتلا به بیماری MI و افراد سالم با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد بررسی قرار گرفت. شایان ذکر است که

در مطالعه حاضر از ژن *miR-U6* به عنوان ژن کنترل کننده داخلی استفاده شد و میزان بیان ژن *miR-499* ۲ برابر افزایش پیدا کرد که اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده شد ($P\text{-value}=0.007$). نتایج نشان داد این *miRNA* در افراد چاق و نرمال تفاوتی ندارد ($P\text{-value}=0.06$).



نمودار ۱. بیان سطح *miR-499* در خون افراد بیماری و کنترل. همه *ct* های به دست آمده بر *miR-U6* نرمالایز شده است. ($P\text{-value}=0.007$)

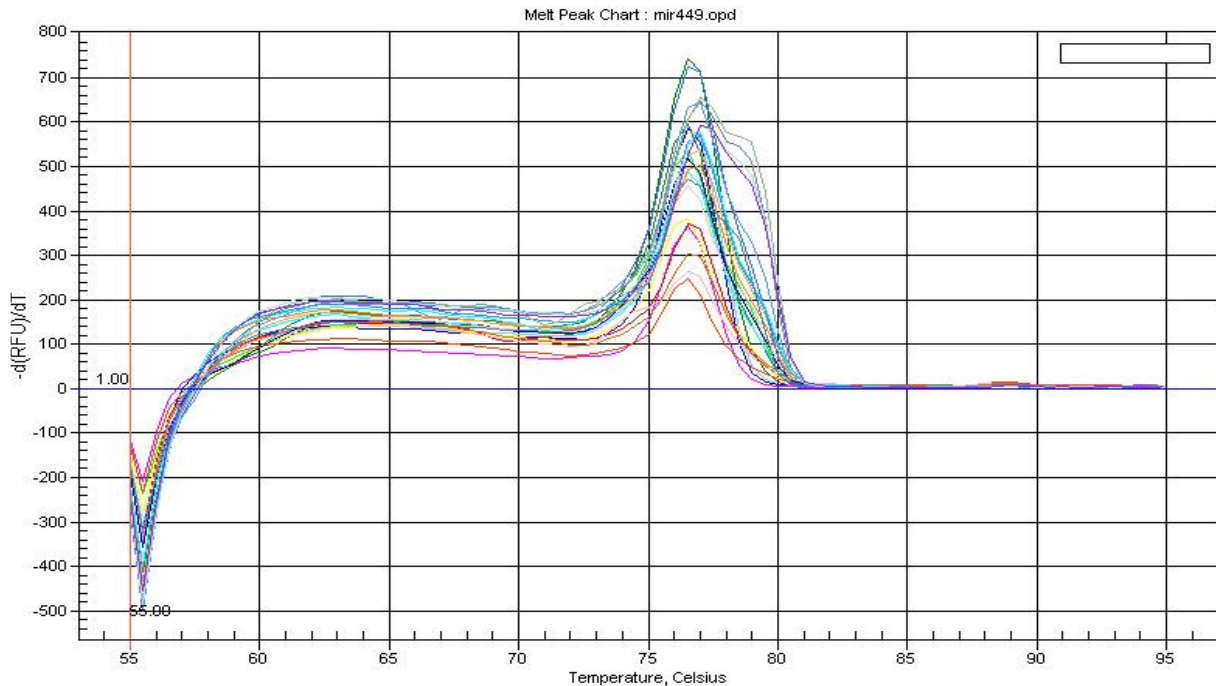


نمودار ۲. بیان سطح *miR-499* در افراد چاق و نرمال. همه *ct* های به دست آمده بر *miR-U6* نرمالایز شده است. ($P\text{-value}=0.06$)

بحث

سکته قلبی یا آنفارکتوس میوکارد (Myocardial infarction) یا حمله قلبی، عبارت از انهدام و مرگ سلولی دائم و غیرقابل برگشت در بخشی از عضله قلب (میوکارد) است که به علت ازبین رفتن جریان خون و وقوع یک ایسکمی شدید در آن

قسمت از قلب روی می دهد (۱۶). این توقف گردش خون ممکن است ناگهانی و بدون هیچ علائم قبلی نمایان گردد یا پس از چند حمله آنژینی (درد قفسه سینه) نمود یابد. عمده ترین دلیل سکته بسته شدن رگ های تغذیه کننده قلب است. سکته قلبی نوعی عارضه فراگیر است که هرساله باعث مرگ هزاران تن می گردد (۱۷). در میان عوامل مساعد کننده، دیابت، فشارخون بالا، کلسترول خون بالا افراط در استعمال دخانیات و الکل، عدم فعالیت بدنی، فشار عصبی، سابقه فامیلی و سن قابل ذکرند (۱۸). به طور یقین این بیماری خیلی وخیم است و سالیانه تنها در آمریکا، در سال ۲۰۰۴ میلادی، بیش از ۱۵۰۰۰ نفر از این عارضه جان باختند (۱۹). بنابراین تشخیص سریع این بیماری برای پیشگیری از مرگ هزاران نفر الزامی است. تست های تشخیص آزمایشگاهی بر روی خون از اهمیت خاصی در تشخیص سریع افراد بیمار و بررسی درمان و یا تعیین ریسک حمله مجدد در آینده برخوردار هستند. مارکرهای بیوشیمیایی آسیب میوکارد به طور عمده در اوائل دهه ۱۹۵۰ کشف شدند، از جمله آنزیم های ترانس آمیناز که بعدها به عنوان GOT و GPT در عضله قلب شناخته شدند. در بررسی بیماران بستری نشان داده شد که سطح ترانس آمینازها بعد از سکته قلبی به سرعت افزایش می یابد. چون این آنزیم ها به مقدار کافی در عضله اسکلتی و بافت های دیگر نیز وجود دارند استفاده از ترانس آمینازها به عنوان مارکرهای قلبی زیاد دوام نداشت. بعدها ترانس آمینازها همراه لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز برای تشخیص های قلبی معرفی شدند (۲۰). مهم ترین تست آزمایشگاهی برای تشخیص بیماری های قلبی اندازه گیری تروپونین است. تروپونین (Tn) یک کمپلکس تنظیمی از ۳ پروتئین است که در فواصل منظم در رشته های نازک عضله مخطط قرار گرفته است. تست ایمنوشیمیایی تروپونین برای بیماری های قلب می تواند به طور ۱۰۰٪ اختصاصی عمل کند. میزان تروپونین قلبی ۲۴ ساعت بعد از سکته قلبی به بالاترین سطح خود می رسد. ویژگی و حساسیت بالای تروپونین قلبی باعث شده است که این آنزیم یک تست اختصاصی در بیماری های CHD و MI در سراسر جهان در نظر گرفته شود (۲۱). از آنجایی که سطح سرمی بیومارکری که برای بیماری های قلبی و تشخیص MI استفاده می شود تنها بعد از MI و یا بیماری ها در ساعت های اولیه بالا می رود؛ بنابراین نمی توان در تشخیص زودهنگام این بیومارکرها را استفاده کرد. بنابراین دانشمندان به دنبال پیدا کردن مارکرهای ژنتیکی به جای مارکرهای بیوشیمیایی هستند. نشانگرهای تشخیصی ژنتیکی در مقایسه با مارکرهای



شکل ۱. نمونه منحنی ذوب پس از انجام Real Time PCR. وجود باندهای تک نشان دهنده تکثیر اختصاصی و بدون مشکل است.

بیوشیمیایی از کارایی بالایی برخوردار هستند و تشخیص دقیق تری را ارائه می دهند. از جمله این مارکرها می توان به میکروRNAها اشاره کرد. miRNAها گروهی از RNAهای کوچک مولکول هستند که در تنظیم بیان ژن در مرحله پس از رونویسی نقش دارند. حضور miRNAها در مایعات بدن به اثبات رسیده و امکان استفاده از آنها به عنوان بیومارکهای تشخیصی برای انواع مختلفی از بیماری ها در حال مطالعه است. امروزه روشی که برای تشخیص زود هنگام مورد استفاده قرار می گیرد استفاده از میکروRNAها هست که آنها دارای طولی برابر ۲۵-۱۸ نوکلئوتید هستند (۲۲). میکروRNAها بیان ژن ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه ی آنها، کنترل می کنند. این ساختارهای مولکولی در کنترل فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک سلولی شرکت می کنند. شناسایی میکروRNAها و مولکول های هدف آنها، افق روشنی را برای شناخت مسیرهایی که منجر به بیماری ها می شوند، فراهم کرده است. از این رو می توان از این ترکیبات به عنوان نشان گرهای زیستی بالقوه در تشخیص، پیش بینی و درمان بیماری ها به خصوص بیماری های قلبی استفاده کرد. فابیولا و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در مطالعه خود گزارش کردند که از حدود ۹۲ بیمار مورد مطالعه، اکثریت آنها دارای سطح سرمی بالایی برای miR-499 بودند (۲۳). در مطالعه xiao و همکارانش در سال ۲۰۱۴، آنها پس از ایجاد MI

مصنوعی در موش ها و سپس اندازه گیری سطح سرمی انواع میکروRNAها متوجه شدند که miR-499 از افزایش قابل ملاحظه ای در ساعت های اولیه برخوردار بود (۲۳). مطالعه ای که توسط لی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ انجام شد نشان داد که miR-499 از آپوپتوز سلول های قلبی با استفاده از هدف قرار دادن ژن پروتئین *PDCD4* می شود (۲۵) miR-499 می تواند تاثیر مثبتی در درمان نارسایی قلبی داشته باشد، البته باید بین دست کاری ژنی و تاثیر فعالیت بدنی تفاوت قائل شد، زیرا فعالیت بدنی با دوره های استراحت دنبال می شود که فرصتی برای بازسازی و تجدید سازگانه بافت است. می دانیم که miRs در حقیقت سرکوب کننده های ژن است و از طریق اتصال به mRNA موجب تخریب یا مهار ترجمه آنها می شود (۲۶،۲۷). mRNA هدف miR ممکن است فاکتورهای فعال کننده رونویسی یا سرکوب کننده رونویسی باشند که این mRNA را ژن هدف می نامند. از ژن های هدف می توان به *purβ* و *Thrap1* اشاره کرد (۲۸) فاکتور *purβ* سرکوب کننده بیان αMHC است. ناحیه غیر ترجمه *purβ* mRNA دارای یک جایگاه اتصال برای miR-499 است، به این معنی که این ژن توسط miR-499 مهار می شود (۲۹). مقادیر ایزوفرم αMHC در زمان نارسایی قلبی و هیپرتروفی پاتولوژیکی کاهش می یابد، به طوری که تقریباً غیر قابل ردیابی هستند (۳۰). به نظر می رسد فعالیت بدنی از

ویژگی بالا هستند (۳۴) Devaux و همکارانش در سال ۲۰۱۲ میلادی به این نتیجه رسیدند که miRNAهای گردشی نشانگری قدرتمند برای انفارکتوس میوکارد حاد هستند (۳۵). نتایجی که در این تحقیق به دست آمد نشان داد که *miR-499* در سرم افراد دچار MI به شدت در مقایسه با افراد کنترل افزایش می‌یابد. نتایج سایر محققان و گزارش‌هایی که در مورد این میکروRNA در بیماران قلبی گزارش شده است، نشان می‌دهد مطالعه حاضر با بسیاری از آن‌ها منطبق است. نتایج این مطالعه نشان داد میزان بیان *miR-499* در بیماران MI دو برابر بیشتر از افراد نرمال است و در صورت تکرار این یافته می‌توان این میکروRNA را به‌عنوان به‌عنوان عامل تشخیصی و همچنین در تعیین پیش‌آگهی بیماران مبتلا به MI به کار برد.

قدردانی و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه حسام حسن زاده دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک با کد ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۵۱۰۰۴ در دانشگاه آزاد واحد اهر است. بدین وسیله از تمامی مسئولان و کارکنان مرکز تحقیقات بیمارستان شهید مدنی تبریز و سایر افرادی که در انجام این پژوهش همکاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

طریق افزایش بیان *miR-499* موجب افزایش بیان α MHC می‌شود، به این صورت که *miR-499*، ژن هدف خود یعنی *purβ* را سرکوب می‌کند. کاهش میزان *purβ* (سرکوب کننده بیان α MHC) موجب افزایش بیان ژن α MHC می‌شود که فرایندی بر خلاف آنچه است که در هایپرتروفی نوع پاتولوژیکی رخ می‌دهد (۳۱). از دیگر ژن‌های هدف می‌توان به ژن *Thrap1* اشاره کرد که تعدیل کننده سیگنال هورمون تیروئید است و در تنظیم پاسخ β MHC و پاسخ برنامه ژن میوفیبریل به هایپرتیروئیدیسم نقش کلیدی بازی می‌کند (۲۸). افزایش هورمون تیروئید باعث افزایش بیان α MHC و کاهش بیان β MHC در عضله قلب می‌شود (۳۲). تاثیر *miR-499* بر بیان ژن‌ها، با اندازه گیری میزان mRNA و پروتئین آن‌ها بهتر مشخص می‌شود، زیرا *miR-499* حد فاصل بیان ژن و ترجمه در سطح پروتئین آن است. Mitchelson و همکارانش در سال ۲۰۱۵ میلادی به این نتیجه رسیدند که بیان نابجای miRNAها از عوامل مهم در توسعه و پیشرفت بیماری است. همچنین به این نتیجه رسیدند که miRNAهای متعارف قلبی (*miR1-133-206*) مرکزی برای توسعه و سلامت عضلات اسکلتی و قلبی پستانداران هستند (۳۳). Sheikh. و همکارانش در سال ۲۰۱۳ میلادی به این نتیجه رسیدند که میکروRNAهای گردشی یک انتخاب بالقوه برای نشانگرها در تشخیص انفارکتوس حاد قلبی و پیش‌آگهی با حساسیت و

REFERENCES

1. Last J, Cummins S. One year survival in acute myocardial infarction. *Lancet* 1993;341:72-5.
2. Antman EM, Braunwald E. Acute myocardial infarction. In: Braunwald E, ed. *Heart diseases*. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1997. P.1184-288.
3. McMechan SR, Jennifer Adgey AA. Age related outcome of acute myocardial infarction. *BMJ* 1998;317:1334-5.
4. Peltonen M, Lundberg V, Huhtasaari F, Asplund K. Marked improvement in survival after acute myocardial infarction in middle-aged men but not in women. The Northern Sweden MONICA study 1985-94. *J Intern Med* 2000;247:579-87.
5. Verderose J. Coronary Heart Disease, Nutrition management for older Adults, monograph on the internet. New York: American Heart Association; 2001.
6. World Health Organization. Technical report series 894. Obesity, preventing and managing the global epidemic, Report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization; 2000.
7. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kotteke TE, et al. Explaining the Decrease in US Deaths from Coronary Disease, 1980-2000. *N Engl J Med* 2007;356:2388-98.
8. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med* 2009;60:167-79.
9. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39:D152-7.
10. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92-105.
11. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415-9.

12. Williams AH, Liu N, van Rooij E, Olson EN. MicroRNA control of muscle development and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:461-9.
13. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:857-66.
14. Esau CC, Monia BP. Therapeutic potential for microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:101-14.
15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402-8.
16. Finkle WD, Greenland S, Ridgeway GK, Adams JL, Frasco MA, Cook MB, et al. Increased risk of non-fatal myocardial infarction following testosterone therapy prescription in men. *PLoS One* 2014;29:e85805.
17. Hood WB Jr, Joison J, Kumar R, Katayama I, Neiman RS, Norman JC. Experimental myocardial infarction. I. Production of left ventricular failure by gradual coronary occlusion in intact conscious dogs. *Cardiovasc Res* 2017;4:73-83.
18. Martin SS, Khokhar AA, May HT, Kulkarni KR, Blaha MJ, Joshi PH, et al. HDL cholesterol subclasses, myocardial infarction, and mortality in secondary prevention: the Lipoprotein Investigators Collaborative. *Eur Heart J* 2014;36:22-30.
19. Ludwig A, Lucero-Obusan C, Schirmer P, Winston C, Holodniy M. Acute cardiac injury events $\leq$ 30 days after laboratory-confirmed influenza virus infection among U.S. veterans, 2010-2012. *BMC Cardiovasc Disord* 2015;15:109.
20. Mair J, Jaffe A, Apple F, Lindahl B. Cardiac biomarkers. *Dis Markers* 2015;2015:370569.
21. Shah ASV, Griffiths M, Lee KK, McAllister DA, Hunter AL, Ferry AV, et al. High sensitivity cardiac troponin and the under-diagnosis of myocardial infarction in women: prospective cohort study. *BMJ* 2015;350:h626.
22. Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, D'Alessandra Y, Lazzarini R, Santini G, et al. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2013;167:531-6.
23. Li C, Fang Z, Jiang T, Zhang Q, Liu C, Zhang C, et al. Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris. *BMC Med Genomics* 2013;6:16.
24. Xiao J, Shen B, Li J, Lv D, Zhao Y, Wang F, et al. Serum microRNA-499 and microRNA-208a as biomarkers of acute myocardial infarction. *Int J Clin Exp Med* 2014;7:136.
25. Li Y, Lu J, Bao X, Wang X, Wu J, Li X, et al. MiR-499-5p protects cardiomyocytes against ischaemic injury via anti-apoptosis by targeting PDCD4. *Oncotarget* 2016;7:35607-17.
26. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2009;7:147-54.
27. Maragkakis M, Alexiou P, Papadopoulos GL, Reczko M, Dalamagas T, Giannopoulos G, et al. Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics* 2009;10:295.
28. Van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland L B, Qi X, Richardson JA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 2009;17:662-73.
29. Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* 2000;86:386-90.
30. Weiner RB, Baggish AL. Exercise-induced cardiac remodeling. *Prog Cardiovasc Dis* 2012;54:380-6.
31. Gustafson TA, Markham BE, Morkin E. Effects of thyroid hormone on alpha-actin and myosin heavy chain gene expression in cardiac and skeletal muscles of the rat: Measurement of mRNA content using synthetic oligonucleotide probes. *Circ Res* 1986;59:194-201.
32. Van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007;316:575-9.
33. Mitchelson K, Wen-Yan Qin. Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease. *World J Biol Chem* 2015;6:162-208.
34. Sheikh Md SA, Xia K, Yang TL, Peng J. Circulating microRNAs: a potential role in diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction. *Dis Markers* 2013;35:561-6.
35. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, et al. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2012;58:559-67.