

بررسی پلی مورفیسم *Glu 298 Asp* ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNos) به عنوان یک ریسک فاکتور ژنتیکی در بروز بیماری‌های قلبی عروقی در نمونه‌ای از جمعیت ایران

لیلی رجالی^۱، ماندانا حسن زاد^۲، علیرضا نجفی^۲، محمدرضا محمدحسینی^۲، میمنت فتحی^۴، محمدرضا سرزعیم^۲، سید حمید جمال الدینی^۵، محمد سامزاده^۶

^۱ عضو باشگاه پژوهشگران جوان تهران و دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
^۲ استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
^۳ استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان دکتر شریعتی
^۴ کارشناس دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
^۵ دانشجوی دکترای ژنتیک مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
^۶ دانشجوی رزیدنت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: عوامل ژنتیکی با بیماری گرفتگی عروق کرونر در ارتباط هستند. در بین چندین پلی مورفیسم ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی، وارثه *Glu298Asp* در بیماری گرفتگی عروق کرونر نقش دارد. هدف از مطالعه اخیر بررسی ارتباط بین ریسک ابتلا به بیماری گرفتگی عروق کرونر و پلی مورفیسم *Glu298Asp* در ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی می‌باشد.
روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۹۱ بیمار ایرانی دچار گرفتگی عروق کرونر و ۹۳ نمونه کنترل بررسی شدند. پلی مورفیسم *Glu298Asp* ژن سنتز نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی به وسیله روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و RFLP مورد آزمایش قرار گرفت.
یافته‌ها: تفاوت واضحی بین نمونه‌های گروه کنترل و گروه بیمار برای ژنوتیپ نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی وجود داشت. به علاوه سابقه فامیلی بیماری گرفتگی عروق کرونر، فشار خون، چربی خون و ژنوتیپ *eNos TT* فاکتورهای مستقل بیماری گرفتگی عروق کرونر بودند. افراد با ژنوتیپ *TT* از ۳/۵ برابر ($OR = 3/57$) ریسک بیشتری در ابتلا به تصلب شرایین در مقایسه با گروه کنترل برخوردار بودند.
نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد بیماری تصلب شرایین با پلی مورفیسم *Glu298Asp* ژن نیتریک اکساید سنتاز در جمعیت ما در ارتباط است.
واژگان کلیدی: بیماری تصلب شرایین، نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی، پلی مورفیسم ژنتیکی.

مقدمه

امروزه اهمیت بررسی پلی مورفیسم‌ها و ارتباط آنها با بیماری‌ها در تعیین ریسک ابتلا به بیماری بسیار بااهمیت است. بنابراین مطالعه ارتباط یا عدم ارتباط هر پلی مورفیسم در هر جمعیتی، خاص آن می‌باشد که در صورت داشتن ارتباط می‌توان بررسی آن را به عنوان مارکری برای تعیین ریسک ابتلا در نظر گرفت. بیماری‌های قلبی عروقی در کشور ایران به عنوان دومین عامل مرگ و میر محسوب می‌شوند. همچنین فشار خون یا افزایش

پلی مورفیسم‌ها در جمعیت‌های گوناگون با فراوانی‌های مختلف و ارتباط یا عدم ارتباط با بیماری‌های خاص بروز می‌کنند.

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، باشگاه پژوهشگران جوان، لیلی رجالی
 (email: leili1367@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۶/۲۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱/۲۷

ارتباط این پلی مورفیسم با بیماری‌های قلبی عروقی و فشار خون را نشان داده است (۵، ۶، ۸).

دو ژن اصلی وجود دارد که به طور مستقیم در فشار خون نقش دارند. Endothelial nitric acid و Angiotensinogen (AGT) و synthase (eNOS) نیتریک اکسید یک فاکتور اندوتلیوم آرامش دهنده که جریان خون موضعی و فشار خون سیستمیک را تنظیم می‌کند. مطالعات انجام شده منجر به این فرضیه شد که کاهش در فعالیت مسیر L-arginin-No اندوتلیالی می‌تواند در شروع و توسعه فشار خون شرکت داشته باشد (۹).

الگوی فراوانی فشارخون، در کشورهای در حال توسعه با کشورهای توسعه یافته متفاوت است (۱۰). در سال‌های اخیر، ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در مطالعات مختلفی بررسی شده است. مطالعه‌ای نشان داده است که موش‌های دارای نقص در نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی، بد عملکردی اندوتلیال و فشار خون بالا را توسعه داده‌اند و بازگشت حالت طبیعی با استفاده از روش انتقال ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی امکان پذیر است (۱۱). این یافته‌ها نشان می‌دهند که ارتباط نزدیکی بین ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و فشار خون وجود دارد. چندین پلی مورفیسم در ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی شناسایی شده‌اند. واریانت شایع ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی با تبدیل G به T در نوکلئوتید ۸۹۴ در اگزون ۷ باعث تغییر گلوتامات به آسپاراتات در جایگاه ۲۹۸ می‌شود که با بیماری‌های قلبی عروقی و فشار خون بالا مرتبط است (۱۲). اهمیت زیستی این جانیشینی هنوز در حال بررسی است. در مطالعه ای نشان دادند که نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی هدف شکست انتخابی پروتئولیتیک در سلول‌های اندوتلیالی و بافت‌های واسکولار است و بنابراین افرادی که دارای آسپاراتات در جایگاه ۲۹۸ خود هستند، فعالیت پایین نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی را نشان می‌دهند (۱۳). به علاوه کدون ۲۹۸ بین رزیدجوه‌های حیاتی دامین هم (۱۰۰ تا ۲۰۰) و جایگاه‌های اتصال L-Argenin و tetrahydrobiopterin (450-350) قرار گرفته است (۱۴). فرض شده است که در نبود tetrahydrobiopterin آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی بدون عملکرد می‌شود و منجر به کاهش تولید نیتریک اکساید و افزایش سنتز سوپراکسید می‌شود. گزارش شده است که جانیشینی Glu298Asp ممکن است روی پاسخ اندوتلیوم واسکولار به افزایش استرس‌های اکسیداتیو اثرگذار باشد (۱۶، ۱۵).

اینکه آیا جهش Glu298Asp ممکن است روی ویژگی اتصال نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی اثر بگذارد و منجر به

فشار خون سرخرگی یکی از مشکلات سلامتی جامعه بشری امروز است و یکی از ریسک فاکتورهای اصلی مرگ و میر به شمار می‌رود که خود با انواعی از اختلالات واسکولار شبیه اختلالات کاردیاک یا رنال و سکتها در ارتباط است. در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، بیماری فشار خون در ۲۵ تا ۳۵ درصد از جمعیت بزرگسال و بیش از ۶۰ تا ۷۰ درصد افرادی که زیر دهه هفتم زندگی خود هستند مشاهده می‌شود (۱).

ایران کشوری با گروه‌های قومیتی متفاوت است. سازمان بهداشت جهانی بهداشت (WHO) قومیت جمعیت ایران را بر اساس درصد به شکل زیر بیان نموده است: نژاد فارس ۵۱٪، گیلک و مازندرانی ۸٪، کرد ۷٪، عرب ۳٪، لر ۲٪، بلوچ ۲٪، ترکمن ۲٪ و سایر نژادها ۱٪. به نظر می‌رسد شیوع انواع بیماری‌های قلبی عروقی و فشار خون در میان این گروه‌های قومی بالا باشد.

مطالعات مختلفی درباره نقش پلی مورفیسم ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و ارتباط آن با بسیاری از بیماری‌ها از جمله فشار خون و بیماری‌های قلبی عروقی انجام شده است. این مطالعات بر روی جمعیت طبیعی و بیمار صورت گرفته است.

در سال ۱۹۹۸، Hibi و همکاران به ارتباط پلی مورفیسم ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و سکتة قلبی (MI) اشاره کردند که اولین مطالعه از این دست محسوب می‌شود. در این مطالعه به دخالت نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در مستعد بودن به بروز سکتة قلبی اشاره گردید (۲).

نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی، آنزیم کلیدی دخیل در حفظ هموستاز عروقی است (۳). چندین گروه ارتباط نزدیک بین ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و اختلالات عروقی شبیه بیماری‌های قلبی عروقی و فشار خون را گزارش کرده‌اند (۴، ۵).

چندین پلی مورفیسم در ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی شناسایی شده‌اند. این پلی مورفیسم‌ها روی اگزون ۷ (G/T894)، اینترون 4b/5a، اینترون ۱۱ (-30A/G)، اینترون ۱۸ (27A/C)، اینترون ۲۳ (10G/T) در ناحیه کد کننده و T786C، A922C و T1468A در نواحی فلانک ژن گزارش شده‌اند (۶).

از بین اینها، پلی مورفیسم نوکلئوتید ۸۹۴ در اغلب مطالعات گزارش شده است (۷). این پلی مورفیسم ناشی از جانیشینی گوانین به تیمین در نوکلئوتید ۱۹۱۷ در اگزون ۷ ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی منجر به جانیشینی اسید آمینه گلوتامات به آسپاراتات در کدون ۲۹۸ می‌شود. چندین مطالعه

بدعملکردی آیزیم شود، هنوز روشن نشده است. در مطالعات مختلف تنوع قابل ملاحظه‌ای دیده شده است (۲۰-۱۷، ۴، ۶). با چنین تنوعی انتظار می‌رود که ارتباط تنوع ژنی با یک بیماری ممکن است در مردم کشورهای با قومیت‌های گوناگون متفاوت باشد.

همانطور که در بالا مطرح شد، چندین پلی مورفیسم در ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی گزارش شده‌اند. در میان آنها، شایع‌ترین واریانت در اگزون ۷ (T/G ۸۹۴) ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی قرار دارد که باعث تبدیل گلوتامین ۲۹۸ به آسپارژین می‌شود که این پلی مورفیسم با گروه‌های زیادی که در معرض خطر بیماری عروق کرونر و همین‌طور سکته قلبی قرار دارند، مرتبط می‌باشد. ارتباط این پلی مورفیسم در جمعیتی مثل ایتالیا گزارش شده است، اما در جمعیت‌های دیگر گزارشات متناقض بوده است. در جمعیت ترکیه نیز مطالعه‌ای مشابه صورت گرفته است که نشان داده است وجود ژنوتیپ TT در ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در جایگاه ۲۹۸، ۱۵ برابر ریسک ابتلا به بیماری عروق کرونر را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهد.

از آنجایی که نقش پلی مورفیسم مطرح شده و ارتباط آن با بیماری عروق کرونر در جمعیت‌های مختلف گوناگون بوده است، لزوم بررسی آن در جمعیت ایران اهمیت دارد، چرا که بیماری‌های قلبی عروقی یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در جمعیت ایران می‌باشند. بنابراین هدف از انجام این طرح تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم G894T در ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و تعیین ارتباط آن با خطر ابتلا به این بیماری در مبتلایان ایرانی می‌باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه مورد-شاهدی، پلی مورفیسم ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در ۹۱ بیمار ایرانی با تشخیص بیماری گرفتگی عروق کرونر که در بخش کاردیولوژی بیمارستان‌های جواهری و لاله در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ پذیرش شده بودند، بررسی شد. گروه شاهد شامل ۹۳ مورد سالم بدون گرفتگی عروق کرونر بود. مطالعه توسط کمیته اخلاق مورد تأیید قرار گرفته است.

معیارهای ورودی برای بیماران شامل سن ابتلا به بیماری گرفتگی عروق کرونر ۵۵ سال یا جوان‌تر برای مردان و ۶۵ یا جوانتر برای زنان و حداقل ۵۰٪ گرفتگی در شریان‌های بزرگ یا یکی از شاخه‌ها که با آنژیوگرافی مشخص شده باشد بود.

(۲۲). میزان بیماری و شدت آن با تعداد عروق با حداقل گرفتگی ۵۰٪ مشخص می‌شود (چه در ۱ رگ یا چندین رگ). برای همه بیماران اطلاعاتی در مورد ریسک فاکتورهایی مثل دیابت ملیتوس، فشار خون، هایپرکلسترولمی و مصرف سیگار جمع‌آوری شد. میزان تری گلیسرید، کلسترول توتال، LDL-کلسترول و HDL-کلسترول با روش‌های متداول آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد. فشار سرخرگی به عنوان فشار سیستولی برابر یا بیشتر از ۱۴۰ mmHg و فشار خون دیاستولی برابر یا بیشتر از ۹۰ mmHg در بیشتر از ۱ زمان و موقعیت در نظر گرفته شد. بیماران با سابقه دیابت و قند خون پایه بالاتر از ۱۲۰ mg/dl به عنوان مورد دیابتی تعریف شدند. مصرف روزانه‌ی بیشتر از ۵ نخ سیگار به عنوان فرد سیگاری محسوب شد. سابقه فامیلی گرفتگی عروق کرونر بیماران و افراد شاهد در هنگام مصاحبه در نظر گرفته شد.

DNA ژنومی از ۵ میلی‌لیتر خون EDTA دار با استفاده از روش استاندارد نمک اشباع استخراج گردید. تعیین ژنوتیپ نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی برای پلی مورفیسم Glu298Asp براساس متد شرح داده شده توسط Hingorani و همکاران انجام شد (۱۰).

تکثیر DNA در طی ۳۰ چرخه که هر چرخه شامل مراحل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه در ۱ دقیقه، مرحله اتصال در دمای ۶۰ درجه به مدت ۱ دقیقه و مرحله بسط در دمای ۷۰ درجه ۱ دقیقه و مرحله بسط نهایی زنجیره با دمای ۷۰ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. دناتوراسیون (مرحله اولیه در دمای ۹۵ درجه برای ۵ دقیقه انجام شد) محصولات PCR با آنزیم محدود کننده MboI در ۳۷ درجه برای ۱۶ ساعت هضم شد. در صورت حضور T در نوکلئوتید ۸۹۴ که مطابق با Asp298، محصول PCR با طول ۲۰۶bp به ۲ قطعه ۱۱۹ bp و ۸۷bp شکسته شد. محصولات PCR در ژن آگارز ۲/۵٪ اجرا شدند و با رنگ اتیدیوم برامید قابل تشخیص شدند.

یافته‌ها

گروه بیمار شیوع بالاتری از فشار خون، دیابت، مصرف سیگار و سابقه فامیلی بیماری عروق کرونر را در مقایسه با گروه کنترل داشتند. بیماران دارای میزان بالاتر اندکس توده بدنی (BMI)، سطح کلسترول توتال، LDL-کلسترول و تری گلیسرید بودند. سابقه فامیلی، فشار خون، دیابت، مصرف سیگار، چاقی، سطح بالای کلسترول توتال، LDL-کلسترول، تری گلیسرید و پایین بودن سطح HDL-کلسترول ریسک ابتلا به بیماری گرفتگی عروق کرونر را افزایش می‌داد.

Clomboetal نشان داده که ارتباطی بین پلی مورفیسم این ژن و بروز و مقدار و درجه سختی بیماری گرفتگی عروق کرونر در جمعیت ایتالیایی وجود دارد (۲۱).

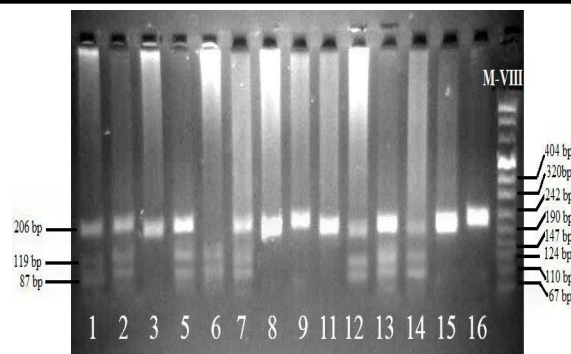
Gardmen و همکاران ارتباط معنی داری را بین آلل T ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و افزایش ریسک بیماری گرفتگی عروق کرونر و سختی آن در افراد جوانتر گزارش کردند (۲۲).

پراکنش پلی مورفیسم ژنوتیپ Glu298Asp در بین جمعیت‌های مختلف متفاوت است. برای مثال، در جمعیت ژاپنی ژنوتیپ Asp/Asp تنها در ۵ تا از ۲۲۶ بیمار (۱۲/۲٪) و در UK در ۱۰۷ تا از ۲۹۸ بیمار (۳۵٪) دیده شده است (۱۰). از طرف دیگر، Caietal نشان داده است که هیچ ارتباطی بین موتاسیون Glu298Asp ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و حتی وجود یا سختی بیماری گرفتگی عروق کرونر در استرالیایی‌های سفید وجود ندارد (۱۹). همچنین Liyouetal هیچ ارتباطی را بین پلی مورفیسم Glu298Asp ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و درجه و احتمال بیماری گرفتگی عروق کرونر گزارش نکرده است و اعلام داشته پیشرفت بیماری گرفتگی عروق کرونر به صورت گسترده‌ای به وسیله فاکتورهای محیطی با سهم محدود ژنتیک در جمعیت استرالیایی کنترل می‌شود (۲۳).

در مطالعه ایتالیایی‌ها به وسیله Brscicetal، ارتباطی بین پلی مورفیسم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و رویدادهای عودکننده بعد از سکته قلبی اولیه در بیماران جوان‌تر مشاهده نشد (۲۴).

Arasetal گزارش کرده است که پلی مورفیسم ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی هیچ اثر معنی‌داری روی احتمال و شدت بیماری عروق کرونر قلب در جمعیت ترکیه ندارد. در مطالعاتشان ژنوتیپ‌های ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (GG/GT,TT) در ۶۰، ۴۸ و ۶ تا از ۱۱۷ نمونه سالم شاهد و در ۸۹ و ۸۷ و ۲۹ تا از بیماران دارای گرفتگی عروق کرونر و در ۴۳، ۲۸ و ۵ بیمار با سکته قلبی زودرس به ترتیب دیده شد. بحث در مورد نتایج عملکردی پلی مورفیسم G894T در حال پیشرفت است (۲۵).

پلی مورفیسم در آگزن‌ها ممکن است ساختار ۳ بعدی آنزیم را تغییر دهد و پلی مورفیسم در اینترون‌ها ممکن است عملکرد بیانی را تغییر دهد. این تغییرات در جهت کاهش در محصول نیتریک اکسید و مسلماً در جهت افزایش در فشار سرخرگی یا افزایش فشار داخل گلوامرولی خواهد بود (۲۶).



شکل ۱- نتیجه PCR. ژل آگارز مربوط به تکثیر نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی که اندازه قطعه 206 جفت باز می‌باشد.

به طور کلی گروه بیمار افزایش معنی‌داری در پراکنش آلل T در گروه بیمار در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. پس می‌توان گفت ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ TT و بیماری گرفتگی عروق کرونر وجود دارد. ولی ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ T/G ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی با تعداد رگ‌های آسیب دیده به دست نیامد.

رگرسیون چندتایی نشان داد سابقه فامیلی بیماری عروق کرونر، مصرف سیگار، دیابت، چاقی، dyslipidemia و ژنوتیپ TT ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی ریسک فاکتورهای مستقل بیماری گرفتگی عروق کرونر به حساب می‌آیند. بیماران با ژنوتیپ TT ۳/۵ برابر شانس بیشتری در مقایسه با گروه شاهد در ابتلا به بیماری گرفتگی عروق کرونر داشتند (شکل ۱).

بحث

این مطالعه مشخص کرد ژنوتیپ Glu298Asp ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی با بیماری گرفتگی عروق کرونر ارتباط دارد. همچنین افزایش هموزیگوسیتی واریته TT در ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در بین بیماران مبتلا به بیماری گرفتگی عروق کرونر در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. آنالیزهای پیچیده با واریته‌های چندتایی نشان می‌دهند که این ارتباط از ریسک فاکتورهای معمول بیماری گرفتگی عروق کرونر مستقل است. مطالعه‌ای که در UK انجام شد نشان داد که پلی مورفیسم ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی از بالاترین ریسک فاکتورها برای بیماری گرفتگی عروق کرونر در منطقه شرق Anglia است (۱۰).

Glu298Asp ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی ریسک فاکتوری برای بیماری گرفتگی عروق کرونر در جمعیت ایران محسوب می شود.

برای نتیجه گیری بهتر لازم است تعداد نمونه بیشتری مورد مطالعه قرار گیرد. این اطلاعات نشان می دهد که پلی مورفیسم Glu298Asp ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی ممکن است عامل ژنتیکی مستعد کننده برای پیشرفت بیماری گرفتگی عروق کرونر باشد. تحقیقات بعدی لازم است تا ارتباط بین این موتاسیون و بیماری گرفتگی عروق کرونر در جمعیت های مختلف را اثبات کند.

با توجه به نقش حفاظت عروقی نیتریک اکسید در برابر وقایع مهم در مدت آتروژنز نشان داده شده است که هموزیگوت Asp298 ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در مقدار و فعالیت نیتریک اکسید از کاهش برخوردار خواهد شد.

مطالعه ما چندین محدودیت داشت. اولین آنها نبود مطالعات عملکردی و تعداد کم نمونه ها بود که مقدار کم نمونه قدرت آماری مطالعه را محدود کرد. به علاوه با آنالیز رگرسیون چندتایی مشخص شد سابقه فامیلی، فشار خون و هایپرکلسترومی، ریسک فاکتورهای بروز بیماری گرفتگی عروق کرونر هستند. ما مشخص کردیم که پلی مورفیسم

REFERENCES

1. Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, Emelianov D, Vlietinck R, Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J Hypertens* 1999; 17: 9-17.
2. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998; 32: 521-26.
3. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2: 1057-58.
4. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 3-8.
5. Nassar BA, Bevin LD, Johnstone DE, O'Neill BJ, Bata IR, Kirkland SA, Title LM. Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease. *Am Heart J* 2001; 142: 586-89.
6. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 1999; 100: 1515-20.
7. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, et al. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 933-36.
8. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2: 1057-58.
9. Srivastava K, Narang R, Sreenivas V, Das S, Das N. Association of eNOS Glu298Asp gene polymorphism with essential hypertension in Asian Indians. *Clin Chim Acta* 2008; 387: 80-83.
10. Kashyap MK, Yadav V, Sherawat BS, Jain S, Kumari S, Khullar M, et al. Different antioxidants status, total antioxidant power and free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem* 2005; 277: 89-99.
11. Lake-Bruse KD, Faraci FM, Shesely EG, Maeda N, Sigmund CD, Heistad DD. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol* 1999; 277: H770-76.
12. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377: 239-42.
13. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 2832-35.
14. Rankinen T, Rice T, Pérusse L, Chagnon YC, Gagnon J, Leon AS, et al. NOS3 Glu298Asp genotype and blood pressure response to endurance training: the HERITAGE family study. *Hypertension* 2000; 36: 885-89.
15. Antoniadou C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Pitsavos C, Chrysochoou C, Panagiotakos D, et al. Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1101-109.
16. Leeson CP, Hingorani AD, Mullen MJ, Jeerooburkhan N, Kattenhorn M, Cole TJ, et al. Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and dietary factors to influence endothelial function. *Circ Res* 2002; 90: 1153-58.

17. Lacolley P, Gautier S, Poirier O, Pannier B, Cambien F, Benetos A. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens* 1998; 16: 31-35.
18. Lustberg ME, Schwartz BS, Lee BK, Todd AC, Silbergeld EK. The G(894)-T(894) polymorphism in the gene for endothelial nitric oxide synthase and blood pressure in lead-exposed workers from Korea. *J Occup Environ Med* 2004; 46: 584-90.
19. Nassar BA, Bevin LD, Johnstone DE, O'Neill BJ, Bata IR, Kirkland SA, et al. Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease. *Am Heart J* 2001; 142: 586-89.
20. Cam SF, Sekuri C, Tengiz I, Ercan E, Sagcan A, Akin M, et al. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population. *Thromb Res* 2005; 116: 287-92.
21. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Rossi G, Clerico A, Biagini A. *Heart*. 2002 Jun;87(6):525-8.
22. Gardemann A, Lohre J, Cayci S, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The T allele of the missense Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with coronary heart disease in younger individuals with high atherosclerotic risk profile. *Atherosclerosis* 2002;160:167– 75.
23. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;32:521–6.
24. Brscic E, Bergerone S, Gagnor A, Colajanni E, Matullo G, Scaglione L, et al. Acute myocardial infarction in young adults: prognostic role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type I receptor, apolipoprotein E, endothelial constitutive nitric oxide synthase, and glycoprotein IIIa genetic polymorphisms at medium-term follow-up. *Am Heart J* 2000;139:979– 84.
25. Aras O, Hanson NQ, Bakanay SM, Tsai MY, Gulec S. Endothelial nitric oxide gene polymorphism (Glu298Asp) is not associated with coronary artery disease in Turkish population. *Thromb Haemost* 2002;87:347–9
26. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 1999;100:1515– 20.