Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 29, No.2, Summer 2019 **ORIGINAL ARTICLE**

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

Hesam Hasanzadeh[1], Changiz Ahmadizadeh[2], Abolfazl Ghorbani[3]
[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

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۹، شماره ۲، تابستان ۹۸، صفحات ۱۵۵ تا ۱۶۲

Original Article

بررسی miR-499 دخیل در روند آپوپتوز سلول های قلب درسرم 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: *بیماری‌های قلبی اسکیمیک (IHD) دلیل بیشتر مرگ‌ومیرها در سطح جهان است، به‌طوری‌که عامل بیش از ۳۰ ٪ مرگ‌ومیرها است. بعد از کشف miRNAها در سال ۱۹۹۰ و کشف بیش از ۲۵۰۰ نوع miRNA رفته‌رفته اهمیت این تنظیم‌کنندگان مکانیسم و سیگنال‌های مولکولی و مسیرهای ژنی در پروسه‌ها و مکانیسم سلولی بخصوص در سیستم قلبی عروقی مشخص‌شده است. هدف از این تحقیق بررسی miR-499 دخیل در روند آپوپتوز سلول های قلب درسرم 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 تبریزدر سال ۱۳۹۶توسط Real time PCR بررسی و با همان تعداد فرد سالم مقایسه شد. تحلیل آماری با نرم افزار SPSS (version19) و با به کار بردن t-test انجام شد. .مقادیر $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.*

یافته‌ها: *سطح بیان miR-499 در بیماران مبتلا به MI در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($P=۰/۰۰۷$). بیان miR-499 در افراد چاق و نرمال تفاوت معنی‌داری از نظر آماری نداشت ($P=۰/۰۶$).*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که بیان ژن miR-499 در افراد دچار MI بیشتراز افراد سالم است و بیان آن می‌تواند 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

بیماری‌های قلبی و عروقی شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر در اکثر کشورهای جهان هستند (۱). طی چند دهه گذشته بیماری سرخرگ‌های 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 چه‌بهتر آن‌ها در افراد مبتلابه این عوامل، سن ابتلا به بیماری تنگی سرخرگ‌های کرونر و مخصوصاً سکته حاد قلبی در این‌گونه کشورها افزایش‌یافته است (۲، ۳). مرگ‌ومیر بیماری‌های قلبی-عروقی در کشورهای توسعه‌یافته روبه کاهش نهاده، ولی در کشورهای درحال‌توسعه و همچنین ایران به دلیل افزایش امید به زندگی، سهم بیماری‌های قلبی-عروقی در میان عوامل منتهی به مرگ در حال افزایش است و طبق پیش‌بینی سازمان جهانی بهداشت، عامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر دنیا، در سال ۲۰۲۰ خواهد بود (۴). بیماری‌های عروق کرونر قلب طیف گسترده‌ای دارند که یک سر آن آسیب قابل‌برگشت میوکارد (آنژین پایدار یا ناپایدار یا درد قفسه سینه) و انتهای دیگر آن انفارکتوس حاد میوکارد (آسیب غیرقابل‌برگشت قلب که منجر به جایگزینی بافت قلبی غیرزنده با بافت اسکار

آدرس نویسنده مسئول: اهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، استادیارگروه 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

فیبروتیک و غیرقابل انقباض) است. عواملی که در ارتباط با افزایش خطر ایجاد بیماری عروق کرونر قلب هستند را می‌توان به سه دسته بزرگ واصلی 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 پیشنهادشده (مصرف ناکافی ویتامین‌های ب کمپلکس، هیپرانسولینمی) 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، استاتین ها، آنژیوپلاستی، تعبیه استنت و مخصوصاً کاربرد ترومبولیتیک ها 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 مشخص‌شده 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 شناخته‌شده‌اند (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).miRNA ها باهدف قرار دادن mRNA ژن‌های هدف باعث خاموشی ژن‌ها می‌گردند. بسیاری از فرایندهای پاتولوژیکی ازجمله بیماری‌های قلبی و عروقی بابیان 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 درسرم 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 پزشک متخصص بستری در بیمارستان فوق تخصصی قلب شهید مدنی 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 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، cTnI، 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 EDATA 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 اندازه گیری کرد. هر واحد OD در طول موج ۲۶۰nm برابر با 40ng/ml از RNA تک رشته‌ای است.

سنتز cDNA

برای سنتز micro RNA cDNA 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 ازویروس گرفته شده صاحب دم poly A از انتهای 3 شده، سپس توسط پرایمر مخصوص کیت از تمام RNA های کوچک cDNA ساخته شد. مرحله اول در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه و واکنش مرحله دوم در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه انکوبه شد.

Real-time-PCR

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

جدول ۱. شرایط دمایی PCR

مرحله	زمان	دما
واسرشتگی اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
واسرشتگی	۱۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
اتصال و گسترش		۶۰ درجه سانتی‌گراد
	۶۰ ثانیه	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 Accesion: 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	78±3
قد (سانتی‌متر)	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 نمونه‌ها برای Real-time PCR در حجم نهایه 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$\Delta\Delta$ct -2 اقدام به بررسی میزان نمونه‌ها شد.

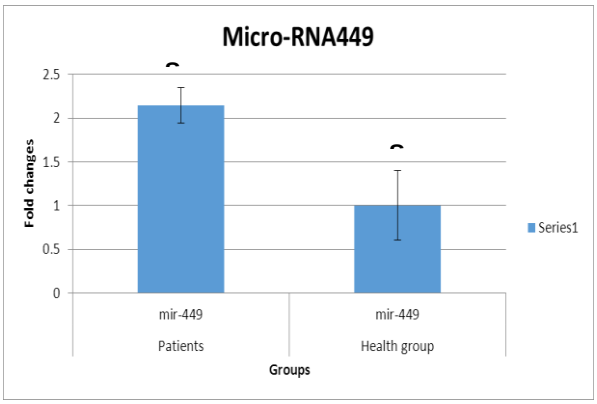
در این مطالعه برای حصول اطمینان از صحیح سنتز cDNA، PCR برای miR-U6 به عنوان ژن کنترل داخلی انجام شد. برای نرمال سازی بیان ژن‌ها در نمونه‌های کنترل و تومور با توجه به اینکه پرایمرهای مورد استفاده به صورت کاملا تجاری هستند و طبق ادعای شرکت سازنده دارای حداکثر بازدهی در طول واکنش هستند از فرمول ct= Δ(target)-ct(control)ct استفاده شد. سپس در هر یک از دو گروه برای درک چگونگی تغییرات بیان ژن‌ها Δct محاسبه شده برای هر یک از نمونه‌ها در فرمول 2-$\Delta\Delta$ct برای هر یک وارد شد تا بیان دقیق هر نمونه مشخص شود. در نهایت داده‌های 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 ژن‌های 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 برای تمام ژن‌ها 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 داده‌ها از نرم افزار SPSS.version19 و t-test استفاده شد. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

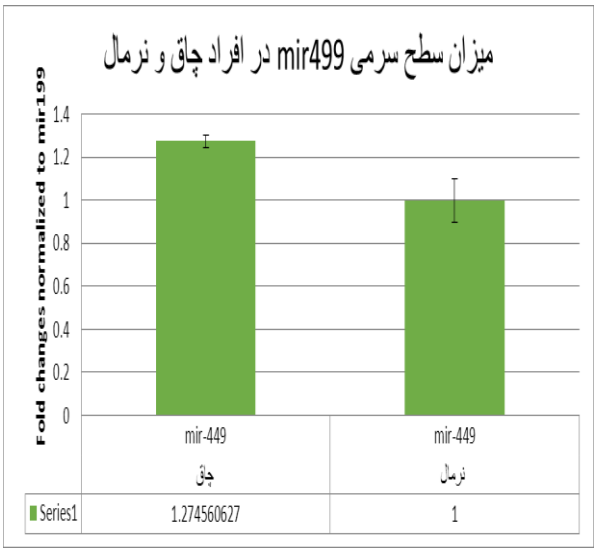
یافته‌ها

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 سانتی‌گراد نشان داده شد. میانگین سنی مردان و زنان گروه بیماران مورد مطالعه به ترتیب ۷۵±۴ و ۶۸±۲ سال بود. میانگین سنی مردان و زنان گروه سالم به ترتیب ۴۰±۱ و ۴۲±۲ 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 که‌اختلاف معناداری بین دو گروه مشاهده شد(P-value=0.007) . نتایج نشان داد این miRNA در افراد چاق و نرمال تفاوتی ندارد (P-value=0.06).



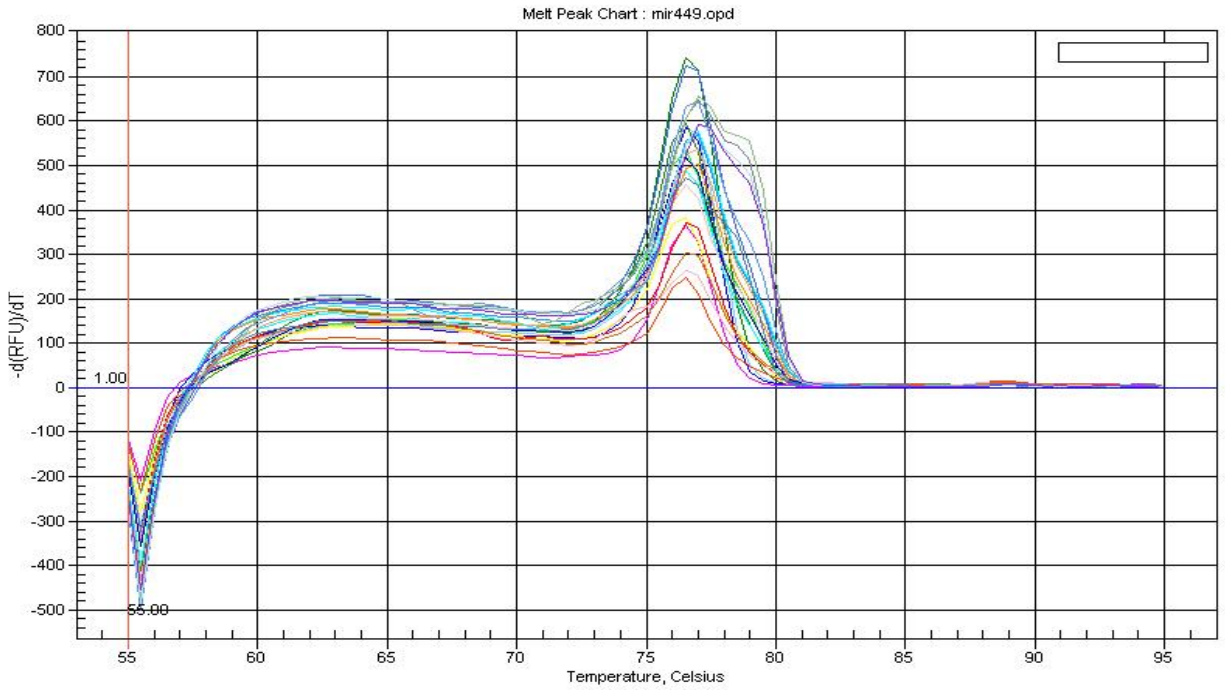
نمودار ۱. بیان سطح miR-499 در خون افراد بیماری و کنترل. همه ct های به دست آمده بر miR-U6 نرمالایز شده است. (P-value=0.007)



نمودار ۲. بیان سطح miR-499 در افراد چاق و نرمال. همه ct های به دست آمده بر miR-U6 نرمالایز شده است. (P-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 ازبین‌رفتن جریان خون و وقوع یک ایسکمی شدید در آن قسمت از قلب روی می‌دهد (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. عمده‌ترین دلیل سکته بسته شدن رگ‌های تغذیه‌کننده قلب است. سکته قلبی نوعی عارضه فراگیر است که هرساله باعث مرگ هزاران تن می‌گردد (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). به‌طور یقین این بیماری خیلی وخیم است و سالیانه تنها در آمریکا، در سال ۲۰۰۴ میلادی، بیش از ۱۵۰۰۰۰ نفر از این عارضه جان باختند (۱۹). بنابراین تشخیص سریع این بیماری برای پیشگیری از مرگ هزاران نفر الزامی است. تست‌های 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 به‌طور عمده در اوائل دهه ۱۹۵۰ کشف شدند، از جمله آنزیم‌های ترانس آمیناز که بعدها به‌عنوان GOT و GPT در عضله‌ی قلب شناخته‌شدند. در بررسی بیماران بستری نشان داده شد که سطح ترانس آمینازها بعد از سکته قلبی به‌سرعت افزایش می‌یابد. چون این آنزیم‌ها به مقدار کافی در عضله اسکلتی و بافت‌های دیگر نیز وجود دارند استفاده از ترانس آمینازها به‌عنوان مارکرهای قلبی زیاد دوام نداشت. بعدها ترانس آمینازها همراه لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز برای تشخیص‌های قلبی معرفی شدند (۲۰). مهم ترین تست آزمایشگاهی برای تشخیص بیماری‌های قلبی اندازه گیری تروپونین است. تروپونین (Tn) یک کمپلکس تنظیمی از ۳ پروتئین است که در فواصل منظم در رشته‌های نازک عضله مخطط قرارگرفته است. تست ایمنوشیمیایی تروپونین برای بیماری‌های قلب می‌تواند به‌طور ۱۰۰٪ اختصاصی عمل کند. میزان تروپونین قلبی ۲۴ ساعت بعد از سکته قلبی به بالاترین سطح خود می‌رسد. ویژگی و حساسیت بالای تروپونین قلبی باعث شده است که این آنزیم یک تست اختصاصی در بیماری‌های CHD و MI در سراسر جهان در نظر گرفته شود (۲۱). ازآنجایی‌که سطح سرمی بیومارکرهایی که برای بیماری‌های قلبی و تشخیص MI استفاده می‌شود تنها بعد از MI و یا بیماری‌ها در ساعت‌های اولیه بالا می‌رود؛ بنابراین نمی‌توان در تشخیص زودهنگام این بیومارکرها را استفاده کرد. بنابراین دانشمندان به دنبال پیدا کردن مارکرهای ژنتیکی به‌جای مارکرهای بیوشیمیایی هستند. نشانگرهای تشخیصی ژنتیکی در مقایسه با مارکرهای



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

بیوشیمیایی از کارایی بالایی برخوردار هستند و تشخیص دقیق‌تری را ارائه می‌دهند. ازجمله این مارکرها می‌توان 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 به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی برای انواع مختلفی از بیماری‌ها در حال مطالعه است. امروزه روشی که برای تشخیص زودهنگام مورداستفاده قرار می‌گیرد استفاده از میکرو RNAها هست که آن‌ها دارای طولی برابر ۲۵-۱۸نوکلئوتید هستند (۲۲). میکروRNAها بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه‌ی آن‌ها، کنترل می‌کنند. این ساختارهای مولکولی در کنترل فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک سلولی شرکت می‌کنند. شناسایی میکروRNAها و مولکول‌های هدف آن‌ها، افق روشنی را برای شناخت مسیرهایی که منجر به بیماری‌ها می‌شوند، فراهم کرده است. ازاین‌رو می‌توان از این ترکیبات به‌عنوان نشان گرهای زیستی بالقوه در تشخیص، پیش‌بینی و درمان بیماری‌ها به خصوص بیماری‌های قلبی استفاده کرد. فابیولا و همکارانش در 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 موش‌ها و سپس اندازه‌گیری سطح سرمی انواع میکروRNAها متوجه شدند که *miR-499* از افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در ساعت‌های اولیه برخوردار بود (۲۳). مطالعه‌ای که توسط لی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ انجام شد نشان داد که *miR-499* از آپوپتوز سلول‌های قلبی با استفاده از هدف قرار دادن ژن پروتئین *PDCD4* می‌شود (۲۵) *miR-499 می‌تواند* 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 دوره‌های استراحت دنبال می‌شود که فرصتی برای بازسازی و تجدید سازگارنه بافت است. می‌دانیم که miRs در حقیقت سرکوب کننده‌های ژن است و از طریق اتصال بهmRNA موجب تخریب یا مهار ترجمه آن ها می‌شود (۲۶،۲۷). mRNA هدف miR ممکن است فاکتورهای فعال کننده رونویسی یا سرکوب کننده رو نویسی باشند که این mRNA را ژن هدف می نامند. از ژن‌های هدف می‌توان *به purβ* و*Thrap1* اشاره کرد (۲۸) فاکتور *purβ. سرکوب کننده بیان* αMHC است. ناحیه غیر ترجمه mRNA3 *purβ* دارای یک جایگاه اتصالی برای *miR-499* است، به این معنی که این ژن توسط *miR-499* مهار می‌شود (۲۹). مقادیر ایزوفرم αMHC در زمان نارسایی قلبی و هیپرتروفی پاتولوژیکی کاهش می‌یابد، به طوری که تقریبا غیر قابل ردیابی هستند (۳۰). به نظر می‌رسد فعالیت بدنی از

طریق افزایش بیان *miR-499* موجب افزایش بیان αMHC می‌شود، به این صورت که miR-499، ژن هدف خود یعنی purβ را سرکوب می‌کند. کاهش میزان purβ (سرکوب کننده بیان αMHC) موجب افزایش بیان ژن αMHC 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 βMHC و پاسخ برنامه ژن میوفیبریل به هایپرتیروئیدیسم نقش کلیدی بازی می‌کند (۲۸). افزایش هورمون تیروئید باعث افزایش بیان αMHC 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 ازعوامل مهم در توسعه و پیشرفت بیماری است. همچنین به این نتیجه رسیدندکه miRهای 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 میکرو RNAهای گردشی یک انتخاب بالقوه برای نشانگرها در تشخیص انفارکتوس حاد قلبی و پیش‌آگهی با حساسیت و 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 به عنوان عامل تشخیصی و همچنین در تعیین پیش آگهی 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.

REFERENCES

1. Last J, Cummigs 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≤ 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.