

## فهرست مندرجات

ذ	فهرست کوتاه نوشته ها.....
ز	چکیده.....
۱	فصل اول: مقدمه و اهداف.....
۲	۱-۱- مقدمه.....
۲	۱-۱-۱- اندوتلین -۱، ماهیت و نقشهای آن در بدن.....
۴	۱-۱-۲- سنتز اندوتلین-۱.....
۵	۱-۱-۳- گیرنده های اندوتلین -۱.....
۷	۱-۱-۴- فشارخون بالا.....
۸	۱-۱-۵- گرفتگی عروق کرونر.....
۸	۱-۱-۶- پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی (SNP).....
۹	۱-۱-۷- جایگاه rs5370 بر روی ژن انسان.....
۹	۱-۱-۸- جایگاه rs10478694 بر روی ژن انسان.....
۱۰	۲-۱- عنوان تحقیق.....
۱۰	۳-۱- بیان مسئله.....
۱۰	۴-۱- اهداف طرح.....
۱۰	۱-۴-۱- هدف کلی طرح.....
۱۱	۲-۴-۱- اهداف فرعی طرح.....
۱۲	۳-۴-۱- اهداف کاربردی طرح.....
۱۳	فصل دوم: بررسی متون.....
۱۴	۱-۲- مقدمه.....
۱۴	۱-۱-۲- اندوتلین-۱ و فشارخون بالا.....
۱۵	۲-۱-۲- اندوتلین-۱ و گرفتگی عروق کرونر.....
۱۶	۳-۱-۲- پلی مورفیسیم(rs5370) و فشارخون بالا.....
۱۷	۴-۱-۲- پلی مورفیسیم(rs10478694) و فشارخون بالا.....
۱۹	فصل سوم: مواد و روشها.....

۲۰	۱-۳- وسایل.....
۲۰	۲-۳- دستگاهها.....
۲۱	۳-۳- جامعه مورد مطالعه.....
۲۲	۴-۳- نمونه گیری.....
۲۲	۵-۳- استخراج DNA با استفاده از روش Salting out.....
۲۴	۶-۳- تعیین غلظت DNA.....
۲۵	۷-۳- بررسی پلی مورفیسم rs5370 به روش PCR-RFLP.....
۲۶	۱-۷-۳- توالی محصول PCR ژن اندوتلین-۱ در جایگاه rs5370.....
۲۶	۲-۷-۳- بررسی فراوانی ژنوتیپهای پلی مورفیسم rs5370 به روش RFLP.....
۲۷	۸-۳- تکثیر پلی مورفیسم rs10478694 به روش RFLP-PCR.....
۲۸	۱-۸-۳- توالی محصول PCR ژن اندوتلین-۱ در جایگاه rs10478694.....
۳۰	۹-۳- سنجش میزان پلاسمایی اندوتلین-۱.....
۳۳	<b>فصل چهارم: یافته ها</b> .....
۳۴	۱-۴- نتایج الکتروفورز محصولات PCR و هضم توسط آنزیمها.....
۳۹	۱-۴- میزان پلاسمایی اندوتلین-۱.....
۴۱	۲-۴- پلی مورفیسم rs5370.....
۴۲	۳-۴- پلی مورفیسم rs10478694.....
۴۵	۴-۴- ارتباط اندوتلین-۱ با درجه گرفتگی عروق کرونر.....
۴۶	۵-۴- بررسی ارتباط توزیع ژنوتیپهای دو پلی مورفیسم مورد بررسی با تعداد عروق مسدود شده.....
۴۸	<b>فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری</b> .....
۴۹	۱-۵- بحث.....
۵۴	۲-۵- نتیجه گیری.....
۵۴	۵-۳- پیشنهادات.....
۵۵	فهرست منابع.....

## فهرست جدول ها

- جدول ۱-۳) لیست وسایل مورد نیاز..... ۲۰
- جدول ۲-۳) مشخصات دستگاههای مورد استفاده در این پژوهش..... ۲۰
- جدول ۳-۳) گروه های مورد مطالعه..... ۲۱
- جدول ۴-۳) پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن rs5370..... ۲۵
- جدول ۵-۳) غلظت مواد مورد استفاده جهت تکثیر ژن rs5370..... ۲۵
- جدول ۶-۳) شرایط دمایی مورد استفاده برای تکثیر ژن rs5370..... ۲۵
- جدول ۷-۳) غلظت مواد مورد استفاده جهت هضم محصول ژن rs5370..... ۲۶
- جدول ۸-۳) پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن rs10478694..... ۲۸
- جدول ۹-۳) شرایط دمایی مورد استفاده برای تکثیر ژن rs10478694..... ۲۸
- جدول ۱-۴) شاخصهای مرکزی و پراکندگی متغیرهای کمی به تفکیک گروههای مورد مطالعه..... ۳۶
- جدول ۲-۴) توزیع متغیرهای کیفی در بین چهارگروه مورد مطالعه..... ۳۸
- جدول ۳-۴) فراوانی ژنوتیپها و آللهای مربوط به پلی مورفیسم rs5370..... ۴۱
- جدول ۴-۴) فراوانی ژنوتیپها و آللهای مربوط به پلی مورفیسم rs10478694..... ۴۳
- جدول ۵-۴) بررسی ارتباط نوع ژنوتیپهای مربوط به پلی مورفیسم rs10478694 با میزان اندوتلین-۱ به تفکیک چهار گروه مورد مطالعه..... ۴۴
- جدول ۶-۴) بررسی ارتباط اندوتلین-۱ با شاخص گرفتگی عروق ((GensiniScore) با استفاده از به تفکیک دو گروه..... ۴۵
- جدول ۷-۴) بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs5370 با تعداد عروق کرونری مسدود شده به تفکیک دو گروه..... ۴۶
- جدول ۸-۴) بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs10478694 با تعداد عروق کرونری مسدود شده به تفکیک دو گروه..... ۴۶

## فهرست اشکال و نمودارها

- شکل ۱-۱) ایزوفرمهای اندوتلین..... ۲
- شکل ۱-۲) ساختار اندوتلین-۱..... ۳
- شکل ۱-۳) شمایی از نحوه ی عملکرد اندوتلین از طریق گیرنده های **ETA** و **ETB** در سلولهای اندوتلیال و ماهیچه صاف..... ۶
- شکل ۱-۴) مقایسه مکانیسم عمل اندوتلین از طریق گیرنده های **ETA** و **ETB** در دو حالت سلامت و ناکارامدی اندوتلیال..... ۷
- شکل ۳-۱) محل برش آنزیم **Cac8i** در ژن اندوتلین-۱..... ۲۷
- شکل ۳-۲) محل برش آنزیم **Bsl1** در ژن اندوتلین-۱..... ۲۹
- شکل ۳-۳) جایگاه اثر آنزیمهای **Bsl1** و **Cac8i**..... ۲۹
- شکل ۴-۱) باندهای تشکیل شده پس از الکتروفورز محصول **PCR** ژن **rs5370** و **rs10478694**..... ۳۴
- شکل ۴-۲) باندهای تشکیل شده پس از اثر آنزیم **Cac8i** بر روی محصول **PCR** ژن **rs5370**..... ۳۵
- شکل ۴-۳) باندهای تشکیل شده پس از اثر آنزیم **Bsl1** بر روی محصول **PCR** ژن **rs10478694**..... ۳۶
- نمودار ۴-۱) مقایسه میزان پلاسمایی اندوتلین-۱ در بین چهار گروه مورد مطالعه..... ۴۰

## فهرست کوتاه نوشته ها

Abbreviation	Word
ASN	Asparagine
BMI	Body Mass Index
Bp	Base pair
CA	Coronary Atherosclerosis
CAD	Coronary Artery Disease
CHD	Coronary Heart Disease
Chol	Cholesterol
CSnp	Coding single nucleotide poly morphism
CRP	C-reactive Protein
DBP	Diastolic blood pressure
ECE	Endothelin Converting Enzyme
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic
ETDA	Ethylenediaminetetraacetic
ET	Endothelin
ET-1	Endothelin-1
ETA	Endothelin receptor A
ETB	Endothelin receptor B
FBS	Fasting Blood Sugar
HDL	High density lipoprotein
H+A+	Hypertensive with Atherosclerosis
H-A+	Non-Hypertensive with Atherosclerosis
H+A-	Hypertensive with no Atherosclerosis
H-A-	Non-Hypertensive with no Atherosclerosis(control group)
LDL	Low density lipoprotein
IL-6	Interleukin-6
IPAH	Idiopathic Pulmonary Artery Hypertension
K	Potassium
LDL	Low density lipoprotein
Na	Sodium
NLB	Neucleolysis buffer

NO	Nitric Oxide
PAH	Pulmonary Artery Hypertension
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction fragment-length PCR
Rpm	Rates per minute
SBP	Systolic blood pressure
SMCs	Smooth Muscle Cells
SNP	Single nucleotide polymorphism
UTR	Untranslated Region

## چکیده

مقدمه: اندوتلین-۱ که به وسیله سلولهای اندوتلیال عروقی ترشح می‌شود، به عنوان مهم ترین تنگ کننده عروقی شناخته شده است. برخی مطالعات اثر مستقیم این پپتید و فرمهای خاصی از ژن تولید کننده آن را در بروز بعضی از بیماریهای سیستم قلبی-عروقی نشان داده اند. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین سطح پلاسمایی اندوتلین-۱ و دو پلی مورفیسم از ژن آن (rs10478694, rs5370) با ایجاد فشار خون بالا و تنگی عروق کرونر انجام شد.

روش: در این مطالعه ۱۲۸ زن و ۱۳۲ مرد با میانگین سنی  $56 \pm 10/5$  و شاخص توده بدنی  $25.4 \pm 9/1$  انتخاب و در ۴ گروه دسته بندی شدند. افراد دارای فشار خون بدون گرفتگی عروق کرونر H+A-، افراد دارای فشار خون و گرفتگی عروق کرونر H+A+، افراد بدون فشار خون و دارای گرفتگی عروق کرونر H-A+، افراد بدون فشار خون و بدون گرفتگی عروق کرونر H-A- یا به عبارتی گروه کنترل. سپس ۱۰ سی سی خون در حالت ناشتا در لوله حاوی EDTA گرفته و پس از جداسازی پلاسما جهت اندازه گیری میزان اندوتلین-۱، مابقی ویال حاوی خون بیماران برای استخراج DNA در دمای  $70-^{\circ}$  درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میزان پلاسمایی اندوتلین-۱ با استفاده از روش الیزا اندازه گیری شد. DNA ژنومیک به روش رسوب زدایی

---

<sup>1</sup> Body mass index (BMI)

نمک، جداسازی و ژنوتیپهای مربوط به هر پلی مورفیسم با استفاده از روش RFLP-PCR تعیین شدند. برای آنالیز آماری از نرم افزار spss ۲۲ استفاده شد.

یافته ها: میانگین سطح پلاسمایی اندوتلین-۱ در گروه H+A+ نسبت به سایر گروهها به طور معنی داری بیشتر بود. در بررسی پلی مورفیسم rs5370 مشخص شد که فراوانی آلل T در گروه H-A+ به طور معنی داری از سایر گروهها بیشتر است. در بررسی پلی مورفیسم rs10478694 در افراد دارای فشار خون بالا فراوانی آلل 3A بیشتر از افراد سالم است. میزان اندوتلین-۱ در گروههای مختلف مورد مطالعه با شاخص Gensini Score ، تعداد عروق کرونری مسدود شده و هیچ کدام از ژنوتیپهای دو پلی مورفیسم rs5370 و rs10478694 ارتباط معنی داری را نشان نداد.

نتیجه گیری: طبق یافته های این مطالعه، اندوتلین-۱ با خطر بروز بیماری فشارخون و ایجاد گرفتگی در عروق کرونر ارتباط مستقیم دارد. آلل T از پلی مورفیسم rs5370 در ایجاد آترواسکلروز موثر بوده و می تواند یک فاکتور خطر در بروز آترواسکلروز تلقی شود. به همین ترتیب آلل 3A برای بروز فشار خون بالا فاکتور خطر محسوب می شود.

**کلمات کلیدی:** اندوتلین-۱ ، فشار خون بالا ، گرفتگی عروق کرونر ، rs1046872 ، rs5370، پلی

مورفیسم تک نوکلئوتیدی



# فصل اول:

مقدمه و اهداف

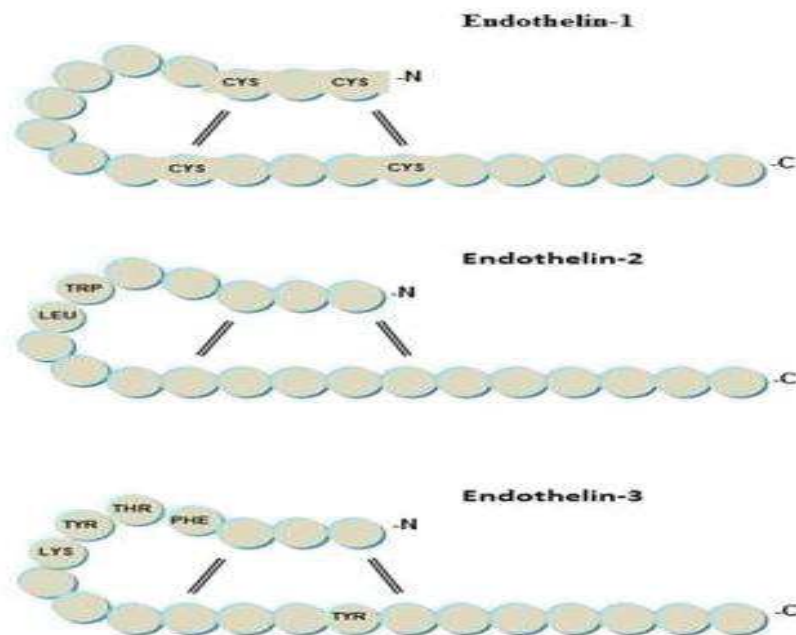
## ۱-۱- مقدمه

## ۱-۱-۱- اندوتلین ۱- ماهیت و نقشهای آن در بدن

اندوتلینها<sup>۱</sup> خانواده ای از پپتیدهای ۲۱ اسید آمینه ای متشکل از سه ایزوform ET-1، ET-2 و ET-3

هستند که اثراتشان را از طریق فعال سازی دو گیرنده‌ی متصل به G-پروتئین به نام ETA و ETB

اعمال می‌کنند (شکل ۱-۱)(۱).



شکل ۱-۱) ایزوformهای اندوتلین (۲).

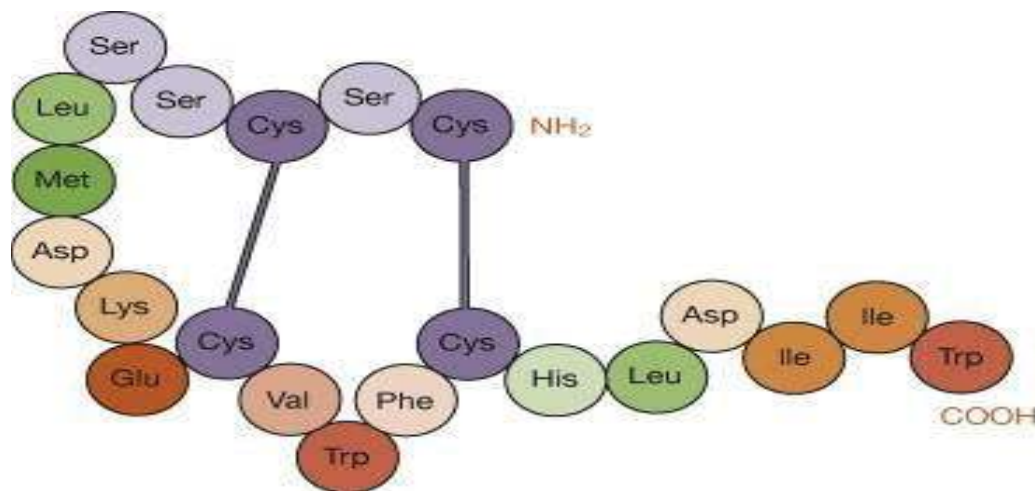
اعضای این خانواده اولین بار در سال ۱۹۸۵ از سلولهای اندوتلیال کشت داده شده‌ی خوک

استخراج و تخلیص شدند. بعد از آن محققین اثرات فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک اندوتلین را

مورد بررسی قرار دادند و اولین اثرات یافت شده برای این پپتید در ارتباط با سیستم قلبی-عروقی

<sup>۱</sup> Endothelins

گزارش شد (۳). اعضای این خانواده علاوه بر اثراتی که در سیستم قلبی-عروقی ایفا می‌کنند، در فرایندهای دیگری مثل تکامل جنین، انقباض برونشها، رشد پروستات، گوارش، عملکرد اندوکراین و کارسینوژنز هم نقش دارند (۴). اندوتلین واسطه‌ی مهمی در بسیاری از روندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک از جمله اختلالات قلبی-عروقی، بیماریهای تنفسی، بیماریهای کلیوی و... محسوب می‌شود. علاوه بر این نقش آن در پدیده‌های مهم دیگری از جمله بیولوژی سرطان، بهبود زخم و انتقالات عصبی نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۵). تولید انواع گوناگون ET در اندامهای مختلف بدن دیده شده است. ET-1 فراوانترین و مهمترین عضو از این خانواده است که در سلولهای عروق یافت می‌شود (شکل ۱) (۶).



شکل ۱-۲ ساختار اندوتلین ۱-۱ (۷).

ET-1, ET-2, و ET-3 هر سه از یک ماریپچ آلفا و دو پیل دی سولفیدی تشکیل شده اند و تفاوت

آنها فقط در چند اسید آمینه محدود است و همچنین در سلولهای مختلف به میزان متفاوت بیان و به