

بررسی فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) در بیماران مبتلا به آترواسکلروز و افراد سالم

غلامرضا شهسوار^۱، نگار نوری یزدان^{۲*}، روح‌الله حیدری^۳، مهدی بیرجندی^۴

- ۱- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.
- ۲- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.
- ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.
- ۴- استادیار، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۲ / تابستان ۹۷ / مسلسل ۷۶

چکیده

دریافت مقاله: ۹۷/۱/۱۴ پذیرش مقاله: ۹۷/۲/۳۱

*** مقدمه:** در حال حاضر بیماری‌های عروق کرونری (CAD) از عمده‌ترین دلایل مرگ و میر افراد در سراسر دنیا است. اصلی‌ترین دلیل بروز CAD آترواسکلروز یا گرفتگی عروق است. در اتیولوژی این بیماری، فاکتورهای مختلفی از جمله فاکتورهای ژنتیکی نقش دارند. در این مطالعه فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) به عنوان یک فاکتور خطر در بروز بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش فعالیت ACE با افزایش سنتز آنژیوتانسین ۲ احتمالاً در ریسک ابتلا به آترواسکلروز نقش دارد.

*** مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مورد شاهدی، ۱۴۵ فرد سالم و ۱۵۴ فرد بیمار از بین مراجعه‌کنندگان به بخش قلب و عروق بیمارستان شهید مدنی شهر خرم‌آباد انتخاب شدند. عدم ابتلا به آترواسکلروز در افراد سالم و همین‌طور ابتلا به آترواسکلروز در افراد بیمار با آنژیوگرافی تأیید شد. گروه مورد و شاهد از نظر سن و جنس همسان‌سازی شدند. از هر فرد ۵ میلی‌لیتر خون گرفته و سرم آن جداسازی شد. فعالیت ACE با استفاده از سوبسترای HHL و با استفاده از تکنیک HPLC اندازه‌گیری شد.

*** یافته‌ها:** نتایج نشان دادند سطح فعالیت ACE در افراد بیمار مبتلا به آترواسکلروز نسبت به افراد گروه کنترل بیشتر است و این افزایش از نظر آماری معنادار است ($P < 0.05$).

*** بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده افزایش فعالیت ACE می‌تواند به عنوان یک فاکتور مستقل در بروز CAD نقش داشته باشد و می‌توان از آن در ارزیابی ریسک ابتلا به بیماری استفاده کرد.

*** واژگان کلیدی:** آنزیم مبدل آنژیوتانسین، فعالیت آنزیمی، بیماری عروق کرونری.

*آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی.

پست الکترونیک: Negar.noury@gmail.com

مقدمه

مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند بیماری‌های عروق کرونری (CAD) از اصلی‌ترین دلایل مرگ و میر در کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه هستند (۱). آترواسکلروز یا گرفتگی عروق، به عنوان یک بیماری التهابی شناخته می‌شود که می‌تواند عروق هر قسمت از بدن را تحت تأثیر قرار دهد. بروز آترواسکلروز در عروق قلبی از اصلی‌ترین دلایل ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی می‌باشد (۲). اصلی‌ترین فاکتورهای خطر بروز بیماری‌های قلبی عروقی شامل سن، جنس، فشار خون بالا، دیابت ملیتوس، هیپرلیپیدمیا، سیگار، مصرف الکل، سابقه خانوادگی ابتلا به CAD و چاقی هستند. در مطالعات Grech علاوه بر بررسی برخی از این فاکتورها، به نقش سیستم رنین-آنژیوتانسین به عنوان یکی از فاکتورهای خطر بروز CAD توجه شده است (۳). سیستم رنین آنژیوتانسین به عنوان یکی از سیستم‌های تنظیمی اصلی فیزیولوژی قلب و عروق در نظر گرفته می‌شود و در ترمیم سیستم قلبی عروقی، هموستاز سدیم و حفظ کشش عروقی نقش دارد. همین‌طور در رشد سلولی و ترمیم دیواره‌های عروقی آسیب دیده نقش دارد. ACE اصلی‌ترین نقش در سیستم رنین-آنژیوتانسین را ایفا می‌کند. بنابراین پیشنهاد شده است آنزیم ACE می‌تواند یک ژن کاندید برای اثر گذاشتن بر پروسه بروز بیماری‌های قلبی عروقی باشد (۴).

ACE یک متالوپروتئیناز وابسته به روی است که از طریق برداشتن توالی His-Leu از انتهای کربنی در تبدیل آنژیوتانسین I به آنژیوتانسین II نقش دارد. علاوه بر این ACE در تجزیه برادی کینین، یک گشاد کننده قوی رگ‌ها که نقش مهمی در تنظیم انقباض عروقی و عملکرد قلبی دارد، مؤثر است (۵). به نظر می‌رسد فعالیت ACE از طریق تولید آنژیوتانسین II می‌تواند در بروز CAD دخیل باشد. بررسی‌ها نشان داده است آنژیوتانسین II نقش

پیش‌التهابی مهمی در دیواره عروق دارد که همین امر باعث پیشرفت آترواسکلروز می‌شود. آنژیوتانسین II از طریق اتصال به رسپتورهای اختصاصی خود در سلول‌های اندوتلیال باعث افزایش بیان مولکول‌های چسبنده (۶)، کموکاین‌ها و سایتوکاین‌ها (۷) می‌شود. این مولکول‌ها باعث اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال (۸)، اکسیداسیون و جذب LDL (۹) و تکثیر سلول‌های ماهیچه‌ای صاف (۱۰) می‌شوند و در نهایت باعث پیشرفت آترواسکلروز و بروز CAD خواهند شد.

هدف از این مطالعه اندازه‌گیری فعالیت ACE در بیماران مبتلا به آترواسکلروز و افراد سالم و مقایسه بین این دو گروه بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع مورد شاهدهی بوده و در آن دو گروه بیمار و سالم مقایسه گردیدند. افراد مورد مطالعه شامل ۳۰۰ نفر بود که در دو گروه افراد بیمار (۱۵۴ نفر) و افراد سالم (۱۴۵ نفر) تقسیم شده بودند. روش نمونه‌گیری، انتخاب نمونه‌ها به صورت در دسترس بود. برای محاسبه حجم نمونه نیز از فرمول‌های آماری مقایسه نسبت‌ها استفاده شد. گروه بیمار شامل بیماران مراجعه کننده به بخش قلب و آنژیوگرافی بیمارستان شهید مدنی بیمارستان خرم‌آباد در سال ۹۵ هستند که بیماری آنان با گلد استاندارد تشخیصی آنژیوگرافی تأیید شد. گروه سالم نیز شامل بیماران مراجعه کننده به بخش قلب و آنژیوگرافی بیمارستان شهید مدنی بیمارستان خرم‌آباد در سال ۹۵ هستند که عدم ابتلا به بیماری و گرفتگی عروق در آنان با گلد استاندارد تشخیصی آنژیوگرافی تأیید شد. از بیماران رضایت‌نامه کتبی آگاهانه مبنی بر گرفتن نمونه خون و انجام آزمایشات تخصصی در این پروژه اخذ گردید. علاوه بر این برای هر یک از بیماران پرسشنامه‌ای حاوی اطلاعات فردی شامل سن، جنسیت، قد و وزن ثبت گردید. گروه مورد و شاهد از نظر سن و جنسیت

پتاسیم هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) با غلظت ۱۰ میلی مولار و متانول با $pH=3$ بود. استاندارد مورد استفاده در این سنجش هیپوریک اسید بود که دارای غلظت ۱/۲۵ میلی مولار بوده و در بافر بورات حل می‌شود.

یک واحد از فعالیت آنزیم به عنوان مقداری از آنزیم می‌باشد که هر دقیقه ۱ میکرومول هیپوریک اسید را از سوبسترای مورد استفاده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط استاندارد آزاد می‌کند. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه گردید. جهت تحلیل داده‌ها و مقایسه بین دو گروه از آزمون t مستقل استفاده شد. $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

میانگین سطح سرمی فعالیت ACE در گروه بیمار برابر با $40/33 \pm 49/69 \mu\text{mol}/\text{min.l}$ و در گروه کنترل برابر با $37/08 \pm 39/68 \mu\text{mol}/\text{min.l}$ بود. بر اساس این نتایج فعالیت ACE در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است که این افزایش از نظر آماری معنادار است ($P < 0.05$). (جدول ۱)

همسان‌سازی شدند. از تمامی افراد میزان ۵ میلی‌لیتر خون گرفته و سرم جداسازی شد. نمونه‌های سرم تا زمان اندازه‌گیری فعالیت ACE در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACE

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بر اساس متد Hiruchi (۱۱) و همکاران صورت گرفت. در این سنجش ۱۰ میکرولیتر سرم را درون چاهک‌های میکروپلیت ریخته و سپس ۴۰ میکرولیتر بافر سوبسترا، حاوی ۳mM سوبسترای HHL (Hip-His-Leu-sigma)، به آن اضافه کردیم. بعد از پایان زمان انکوباسیون (معمولاً ۳۰ دقیقه) ۱۵۰ میکرولیتر محلول متافسفریک ۳ درصد را به عنوان متوقف کننده واکنش اضافه کردیم. پس از این نمونه‌ها با دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و ۲۰ میکرولیتر از نمونه بالایی به داخل ستون HPLC تزریق گردید و میزان هیپوریک اسید آزاد شده از سوبسترا به وسیله دستگاه HPLC (Shimadzu) آنالیز شد. ستون استفاده شده Shimadzu با قطر ۱۵ میکرون و uv دستگاه مدل SPD-10A بود. فاز متحرک مورد استفاده مخلوط ۱:۱ از

جدول ۱. اندازه‌گیری میزان فعالیت ACE در بیماران مبتلا به آترواسکلروز و افراد سالم

P-Value	گروه کنترل	گروه بیمار	فاکتور مورد بررسی
۰/۰۲۶	$39/68 \pm 37/08$	$49/69 \pm 40/33$	فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین ($\mu\text{mol}/\text{min.l}$)

$P \leq 0.05$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شده است.

جدول ۲. مقایسه گروه بیمار و کنترل از نظر جنسیت

P-Value	جمع	گروه کنترل	گروه بیمار	گروه‌های مورد مطالعه
۰/۰۵۶	۱۴۳ (۴۷/۸)	۶۲ (۴۲/۸)	۸۱ (۵۲/۶)	مرد
	۱۵۶ (۵۲/۲)	۸۳ (۵۷/۲)	۷۳ (۴۷/۴)	زن
	۲۹۹ (۱۰۰)	۱۴۵ (۱۰۰)	۱۵۴ (۱۰۰)	جمع

با توجه به آزمون آماری کای دو، دو گروه از نظر جنس همگن می‌باشند ($P=0.056$).

جدول ۳. ویژگی‌های دموگرافیک گروه‌های مورد مطالعه

P-Value	گروه بیمار	گروه کنترل	فاکتورهای مورد بررسی
۰/۱۰۱	۵۷/۳۹ ± ۹/۹۸	۵۵/۵۷ ± ۱۰/۶۵	سن
۰/۰۴۵	۸۶/۱۵ ± ۷۸/۵۴	۷۳/۰۲ ± ۱۷/۱۸	وزن (Kg)
۰/۱۱۲	۱۶۵/۵۷ ± ۹/۰۸	۱۶۳/۶۱ ± ۱۱/۹۶	قد (Cm)
۰/۳۹	۳۱/۲۵ ± ۲۴/۳۷	۲۸/۸۱ ± ۲۴/۷۲	BMI
P < ۰/۰۰۱	۶۱/۵۸ ± ۱۰/۸۴	۵۴/۳۶ ± ۹۰/۵۳	سن تشخیص

۰/۰۵ ≤ P به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شده است.

آنژیوتانسین می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند آنژیوتانسین II علاوه بر افزایش حجم مایعات خون و جبران کاهش حجم شده، در افزایش بیان کموکاین‌ها، سایتوکاین‌ها و مولکول‌های چسبنده نقش دارد. با توجه به نقش این مولکول‌ها در ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال، افزایش فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین و به دنبال آن افزایش تولید آنژیوتانسین II می‌تواند به عنوان یک عامل آتروژنیک در نظر گرفته شود (۱۴). مطالعات همین طور نشان داده‌اند پیشرفت آترواسکلروز می‌تواند باعث القای ساخت ACE از سلول‌های مختلف شده و به عنوان یک فیدبک مثبت در تشدید عارضه نقش داشته باشد (۱۵).

با توجه به نتایج این مطالعه و مقایسه با نتایج تحقیقات مشابه می‌توان نتیجه گرفت سطح سرمی فعالیت ACE می‌تواند در خطر ابتلا به بیماری نقش داشته باشد و می‌تواند به عنوان فاکتوری در ارزیابی ریسک ابتلا به بیماری استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولان مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی و کلیه همکاران گرامی که در انجام این پژوهش یاری رساندند قدردانی به عمل می‌آید.

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود با استفاده از آزمون t مستقل، بین میانگین وزن و سن تشخیص بیماران مبتلا به آترواسکلروز و گروه کنترل تفاوت معناداری وجود دارد (P < ۰/۰۵)، ولی بین میانگین سن، قد و BMI اختلاف معناداری وجود ندارد.

بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی فاکتورهای خطر متعددی می‌توانند در بروز آترواسکلروز و CAD نقش داشته باشند. در این مطالعه نقش ACE و میزان فعالیت سرمی آن به عنوان فاکتور خطری در بروز بیماری بررسی شد.

نتایج این مطالعه نشان داد سطح فعالیت ACE در افراد بیمار نسبت به افراد سالم به طور معناداری بالاتر است. نتایج این مطالعه با تحقیقاتی که توسط ساحین و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی جمعیت ترکیه انجام شد مطابقت داشت. در این بررسی نیز افزایش فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین در افراد بیمار نسبت به افراد گروه کنترل مشاهده شد (۱۲). مطالعات فورستر و همکاران نیز که در سال ۱۹۹۷ و در جمعیت جامائیکا انجام شد نیز مشابه نتایج مشاهده شده در این مطالعه بود (۱۳).

آنزیم مبدل آنژیوتانسین، دکاپتید غیرفعال آنژیوتانسین را به اکتاپتید فعال آنژیوتانسین II تبدیل می‌کند که اصلی‌ترین محصول فعال سیستم رنین

References

- Mack M, Gopal A. Epidemiology, traditional and novel risk factors in coronary artery disease. *Heart Failure Clinics*. 2016; 12(1): 1-10.
- Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis. *Circulation J*. 2010; 74(2): 213-220.
- Grech ED. Pathophysiology and investigation of coronary artery disease. *BMJ*. 2003; 326(7397): 1027-1030.
- Guney AI, Ergec D, Kirac D, Ozturhan H, Caner M, Koc G, et al. Effects of ACE polymorphisms and other risk factors on the severity of coronary artery disease. *Genet Mol Res*. 2013; 12(4): 6895-6906.
- Ngo DH, Kang KH, Ryu B, Vo TS, Jung WK, Byun HG, et al. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*. 2015; 174: 37-43.
- Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K. The renin-angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflamm*. 2014; 67(2): 34-40.
- Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor- κ B (NF- κ B) transcription factor. *Mol Cell Biochem*. 2000; 212(1-2): 155-169.
- Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circulation Res*. 2016; 118(4): 620-636.
- Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Hayek T, Aviram M. Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001; 21(9): 1464-1469.
- Jiao Y, Yang Q. Downregulation of natriuretic peptide clearance receptor mRNA in vascular smooth muscle cells by angiotensin II. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2015; 29(3): 260-268.
- Horiuchi M, Fujimura KI, Terashima T, Iso T. Method for determination of angiotensin-converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography B: Biomed Sci Applications*. 1982; 233(1): 123-130.
- Sahin S, Ceyhan K, Benli I, Ozyurt H, Naseri E, Tumuklu MM, et al. Traditional risk factors and angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism in coronary artery disease. *Genet Mol Res*. 2015; 14(1): 2063-2068.
- Forrester T, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, Wilks R, Cooper R, Rotimi C, et al. The angiotensin converting enzyme and blood pressure in Jamaicans. *Am J Hypertension*. 1997; 10(5): 519-524.
- Sata M, Fukuda D. Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Med Investigation*. 2010; 57(2): 12-25.

15. Hoshida S, Kato J, Nishino M, Egami Y, Takeda T, Kawabata M, et al. Increased angiotensin-converting enzyme activity in coronary artery specimens from patients with acute coronary syndrome. *Circulation*. 2001; 103(5): 630-633.

Study of angiotensin converting enzyme (ACE) activity in patients with atherosclerosis and in healthy individuals

Shahsavari GH¹, Nouryazdan N^{*2}, Heidari R³, Birjandi M⁴

1. Assistant Professor of Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

2. Master of Science Clinical Biochemistry, Student Research Committee, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran. Negar.noury@gmail.com.

3. Associate Professor at Lorestan University of Medical Sciences, Razi Herbal Medicines Research Center, Khorramabad, Iran.

4. Assistant Professor of Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Health and Nutrition, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

Received: 3 April 2018 **Accepted:** 21 May 2018

Abstract

Background: Coronary artery disease (CAD) is currently the leading cause of death among people around the world. The main cause of CAD is atherosclerosis or vascular arrest. In the etiology of this disease, various factors, including genetic factors, are involved. In this study, the effect of angiotensin converting enzyme (ACE) as a risk factor was evaluated. Increasing ACE activity by enhancing the synthesis of angiotensin II is likely to contribute to the risk of atherosclerosis.

Materials and Methods: In this case-control study, 145 healthy individuals and 154 patients were selected from among patients referred to the Shahid Madani Hospital. Absorption of atherosclerosis in healthy individuals and atherosclerosis in patients with standardized angiography was confirmed. The case and control groups were matched for age and gender. A 5 ml sample of blood was taken from each person, and the serum was isolated. ACE activity was measured using HHL substrate and HPLC techniques.

Results: The results showed that the level of ACE activity in patients with atherosclerosis was higher than those in the control group and this increase was statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion: According to the results, increased ACE activity can be an independent factor in the incidence of CAD and can be used to assess the risk of disease.

Keywords: Angiotensin converting enzyme, Enzyme activity, Coronary Artery Disease.

***Citation:** Shahsavari GH, Nouryazdan N, Heidari R, Birjandi M: The study of angiotensin converting enzyme (ACE) activity in patients with atherosclerosis and healthy people. *Yafte*. 2018; 20(2):86-92.