

Comparison of AGTR1 rs5186 (A1166C) Polymorphism between Coronary Artery Disease Patients and Normal Subjects: a Case Control Study

Mohammad Mehdi Heidari¹, Shirin Ghasemi², Faeghe Haji hosseini², Mehdi Hadadzadeh³

Background and Aim: Coronary artery disease (CAD) is a multifactorial inherited disorder in which the arteries that blood to the heart muscle become hardened and narrowed. We aimed at investigating the role of rs5186 (*A1166C*) polymorphism the angiotensin II type 1 receptor (*AGTR1*) gene as risk factors in some Iranian CAD patients.

Materials and Methods: In this case-control study 137 samples were selected from 141 CAD Iranian patients, who had had CABG surgery. Besides, 137 healthy controls matched for age, sex, and ethnicity were taken. After extracting DNA of the blood samples, A1166C *AGTR1* gene polymorphism was studied using tetra-primer ARMS-PCR method. The results of a single tube T-ARMS-PCR were validated using DNA sequencing method. For genetic analysis dominant, co-dominant, and recessive models of multiple logistic regression were applied using SPSS software (V: 22).

Results: It was found that 67.4% of the cases belonged to AA genotype, genotypes amounted 26.9% to AC, and 5.7% to CC. A significant association of *AGTR1* polymorphisms with CAD was found.

Conclusion: Polymorphism A1166C *AGTR1* gene can have an effective role in increasing the risk of coronary artery disease; thus, it can be used in clinical studies.

Key Words: CAD, Gene polymorphism, rs5186, *AGTR1*, T-ARMS-PCR.

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2017; 24 (1): 10-18.

Received: August 9, 2016

Accepted: May 31, 2017

¹ **Corresponding Author;** Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran.

Email: Heidarimm@yazd.ac.ir

Tel: +983531233381

Fax: +9835138210644

² Department of Biology, Faculty of Science, Yazd University, Yazd, Iran.

³ Department of Cardiovascular Surgery, Afshar Hospital, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

مقایسه پلی مورفیسم (A1166C) rs5186 ژن *AGTR1* بیماران ایرانی مبتلا به عروق کرونری با افراد سالم: یک مطالعه مورد - شاهدی

محمد مهدی حیدری¹، شیرین قاسمی²، فائقه حاجی حسینی²، مهدی حدادزاده³

چکیده

زمینه و هدف: بیماری عروق کرونری (CAD)، بیماری چندعاملی وراثتی است و شریان‌هایی که تامین کننده خون به قلب هستند سخت و بایک می‌شوند. هدف از این مطالعه، بررسی پلی مورفیسم (A1166C) rs5186 ژن *AGTR1* به عنوان عامل خطر در بیماران ایرانی مبتلا به عروق کرونری بود.

روش تحقیق: در این مطالعه مورد-شاهدی، 141 بیمار مبتلا به آترواسکلروز عروق کرونری که در بیمارستان افشار یزد تحت عمل جراحی CABG قرار گرفته بودند و 137 فرد سالم به عنوان گروه شاهد، بررسی شدند. پس از استخراج DNA از نمونه‌های خونی، پلی مورفیسم (A1166C) rs5186 ژن *AGTR1* به روش Tetra-primer ARMS-PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای آنالیز داده‌های ژنتیکی (مدل‌های co-dominant, dominant, recessive) از آنالیز رگرسیون لجستیک چندگانه (Multiple logistic regression) توسط نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش 22) استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که 67/4% افراد دارای پلی مورفیسم AA، 26/9% دارای پلی مورفیسم AC و 5/7% دارای پلی مورفیسم CC بودند. نتایج نشان داد که پلی مورفیسم A1166C ژن *AGTR1* از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار در دو گروه بود. نتیجه‌گیری: پلی مورفیسم A1166C ژن *AGTR1*، احتمالاً نقش مؤثری در افزایش خطر ابتلا به بیماری عروق کرونری دارد و می‌تواند در مطالعات بالینی به کار رود.

واژه‌های کلیدی: بیماری عروق کرونری، پلی مورفیسم ژنی، rs5186 ژن *AGTR1*، T-ARMS-PCR.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1396؛ 24 (1): 10-18.

دریافت: 1395/05/19 پذیرش: 1396/03/10

¹ نویسنده مسؤل؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران.

تلفن: 035-31233381 شماره: 035-38210644 پست الکترونیکی: Heidarimm@yazd.ac.ir

² گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران.

³ بخش جراحی قلب، بیمارستان افشار، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

مقدمه

آترواسکلروز یا بیماری عروق کرونری (CAD)¹، یک بیماری شایع در جوامع امروزی می باشد که از نظر آماری بیشترین تعداد افراد مبتلا به بیماری های قلبی - عروقی و مرگ ناشی از آن را در قرن بیست و یک به خود اختصاص می دهد. به عبارتی این بیماری شکل غیر معمول از التهاب مزمن در دیواره سرخرگ هاست که ممکن است موجب سکته و یا بیماری های فرعی سرخرگی شود (1, 2). بروز آترواسکلروز به نوع زندگی فردی نیز بستگی دارد و عواملی چون: فشار خون، دیس لیپیدما، دیابت و همچنین عدم فعالیت فیزیکی، از عوامل تشدید کننده آن به حساب می آید. عملکرد نادرست متابولیسم لیپیدها، لیوپروتئین ها و همچنین آسیب به دیواره اندوتلیال از فاکتورهای بروز آترواسکلروز می باشند (3). آترواسکلروز یک بیماری چندعاملی است که در بروز آن، میانکنش بین فنوتیپ و محیط وجود دارد که البته عامل ژنتیک نقش مهمتری را در این میان ایفا می کند (4, 5).

بسیاری از مطالعات، ارتباطی قوی بین فاکتورهای ژنتیکی و بیماری CAD ارائه داده اند (6-8). یکی از این فاکتورهای ژنتیکی، پلی مورفیسم های ژنی در سیستم رنین - آنژیوتانسین آلدوسترون است که شامل: آنزیم های مبدل آنژیوتانسین (ACE)، رسپتور نوع 1 آنژیوتانسین II (AGTR1)، آنژیوتانسینوژن (AGT) و آلدوسترون سنتاز² (CYP11B2) می باشد (9, 10). تاکنون مطالعات زیادی، تأثیرات فیزیولوژیکی رسپتور نوع 1 آنژیوتانسین II را که به طور گسترده در اکثر اندامها شامل: کبد، غده فوق کلیه، مغز، ریه، کلیه، قلب و عروق دیده شده را اثبات کرده اند (11, 12). AGTR1 یک گیرنده وابسته به G پروتئین است که از 359 اسیدامینه تشکیل شده است. وزن تقریبی آن 40KD است و شامل هفت دُمین³ عرض غشایی می باشد. هفت دمین عرض غشایی، از طریق سه لوپ خارج سلولی و سه لوپ داخل

سلولی با هم مرتبط می شوند. ناحیه C-ترمینال غنی از سرین، ترئونین و تیروزین می باشد و سه جایگاه فسفریلاسیون پروتئین کیناز C (PKC) در این ناحیه قرار دارد (12, 13). ژن AGTR1 در موقعیت 25-3q23 واقع شده است و حدود 45 kb طول دارد. بر اساس توالی Refseq سایت NCBI شامل 4 اگزون و 3 اینترون است (14).

یکی از پلی مورفیسم های ژن AGTR1، تبدیل A به C در نوکلئوتید 1166 (A1166C, rs5186) واقع در ناحیه 3'-UTR این ژن می باشد که فاکتور پیشنهادی برای آترواسکلروز قلبی است (15). مطالعات نشان می دهد که ژنوتیپ CC به آنژیوتانسین II پاسخ بیشتری می دهد و با خطر ابتلا به بیماری های قلبی - عروقی مانند: هیپرتروفی بطن چپ، آنفارکتوس میوکارد و آنوریسم آئورت شکمی همراه است (16-19). از این رو هدف از این مطالعه، بررسی پلی مورفیسم (A1166C) rs5186 ژن AGTR1 به روش tetra-primer ARMS-PCR بود.

روش تحقیق

در این مطالعه موردی - شاهدی، تعداد 141 بیمار مبتلا به آترواسکلروز در محدوده سنی 45 تا 65 سال که از سال 1392 تا 1394 به بیمارستان افشار یزد ارجاع شده و تحت عمل جراحی CABG⁴ قرار گرفته بودند، به عنوان گروه مورد، انتخاب و بررسی شدند؛ همچنین 137 فرد سالم به عنوان گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. حجم نمونه با استفاده از فرمول $N = z^2 p(1-p) / d^2$ به دست آمد.

پس از انجام آنژیوگرافی و بر اساس رؤیت فیلم آن توسط متخصصین قلب و عروق، بیماران دارای گرفتگی بیش از 50% در حداقل یکی از عروق کرونری، به عنوان گروه مورد انتخاب شدند (جدول 1). افراد گروه کنترل همگی تحت آزمایش های لازم و معاینات کامل قرار گرفتند و پس از تأیید سالم بودن آنها، نمونه های خون این افراد مورد استفاده قرار

¹ Coronary Artery Disease (CAD)

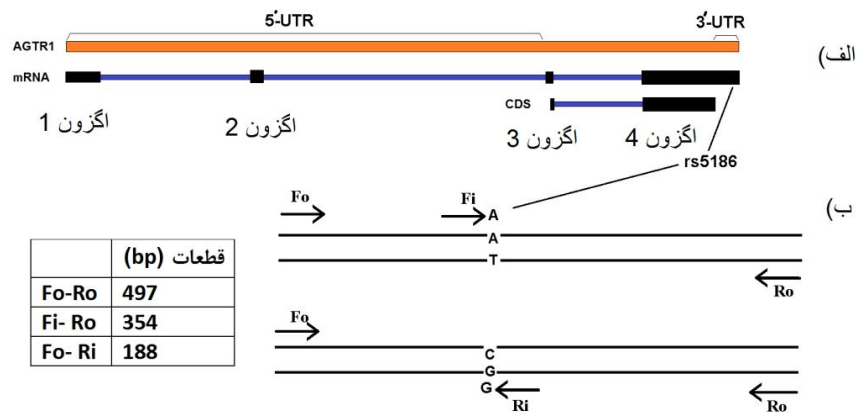
² Aldosterone synthase

³ Domain

⁴ Coronary artery bypass grafting

گرفت. در این مطالعه، جمع‌آوری نمونه‌های مورد و شاهد، با در نظر گرفتن همسانی فاکتورهای سن، جنس و نژاد انجام گرفت. به منظور نمونه‌گیری خون و انجام طرح، از کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد مجوز لازم اخذ شد؛ همچنین تمام افراد مورد مطالعه، رضایت‌نامه تدوین شده را آگاهانه امضا کردند. پلی‌مورفیسم (A1166C) rs5186 ژن *AGTR1* از بانک اطلاعاتی dSNP انتخاب شد (شکل 1- الف). چهار

پرایمر که در این مطالعه استفاده شد، توسط وب‌سایت: <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html> برای پلی‌مورفیسم A1166C ژن *AGTR1* طراحی گردید و با استفاده از برنامه BLAST در سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> از نظر همولوژی با ژنوم، مورد بررسی قرار گرفت. برای افزایش اختصاصیت پرایمرهای داخلی، سوئیمین نوکلئوتید از انتهای 3' دارای جفت اشتباه بود (جدول 2).



شکل 1- الف) نقشه ژن *AGTR1* انسانی و جایگاه پلی‌مورفیسم rs5186 و ب) قطعات حاصل از واکنش T-ARMS-PCR

جدول 1- مشخصات بالینی بیماران و افراد شاهد مورد مطالعه

متغیر	گروه بیمار (141 نفر)	گروه شاهد (137 نفر)	p-value
جنس مذکر	100(71%)	90(66%)	63/0
متوسط سن (سال)	52/3±7/3	51/4±6/2	51/0
استعمال سیگار	34(24%)	31(23%)	54/0
کلسترول تام (mg/dl) *	207/3±52/3	181/6±46/8	001/0
LDL-C (mg/dl)	124/9±44/3	112/7±44	215/0
HDL-C (mg/dl)	47/8±8/3	48/7±12/3	410/0
TGs (mg/dl) *	201/8±105/7	149/4±92/9	019/0
شاخص توده بدن (کیلوگرم/مترمربع) *	26/7±2/3	24/9±2/7	002/0
فشار خون سیستولی (mmHg) *	153/8±0/8	116/5±0/6	023/0
فشار خون دیاستولی (mmHg) *	96/2±0/5	79/7±0/2	016/0

جدول 2- توالی و موقعیت پرایمرهای طراحی شده برای واکنش T-ARMS-PCR

ژن (شناسه پلی‌مورفیسم)	توالی پرایمر	اندازه محصولات PCR
AGTR1 (SNP ID: rs5186)	Fo: 5'- TGAGCACGCTTTCCTACCGC-3'	باند کنترل (479 bp)
	Ro: 5'- CCTTTGGAAACTGGACAGAAC-3'	آل A (354 bp)
	Fi: 5'-AGCACTTCACTACCAAATGAACA-3'	آل C (188 bp)
	Ri: 5'-TTCAATTCTGAAAAGTAGCTGAG-3'	

استخراج DNA از 200 میکرولیتر خون با روش استاندارد رسوب نمکی انجام شد و برای اطلاع از مقدار کمی ژنوم استخراج شده، از روش اسپکتروفتومتری با نور ماوراءبنفش استفاده شد (20). واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل 50 نانوگرم DNA الگو، 5 پیکومول از هر یک از پرایمرهای خارجی (Fo و Ro)، 10 پیکومول از پرایمرهای داخلی (Fi و Ri) و محلول X1، با کمک دستگاه PCR Master Mix (شرکت یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) انجام گرفت. برنامه زمانی و دمایی واکنش Touchdown PCR به این صورت انجام گرفت: دناتوراسیون اولیه در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 2 دقیقه و به دنبال آن 10 سیکل دمایی متشکل از دمای دناتوراسیون 95 درجه سانتی گراد به مدت 20 ثانیه، دمای اتصال از درجه حرارت 70 تا 61 درجه سانتی گراد (به صورت کاهشی 1 درجه سانتی گراد به ازای هر سیکل) و مرحله گسترش به مدت یک دقیقه در درجه حرارت 72 درجه سانتی گراد. سپس 25 سیکل انتهایی هر چرخه شامل سه مرحله حرارتی: مرحله واسرشتی اولیه (در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه)، مرحله اتصال آغازگر به الگو (در دمای 60 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه) و مرحله گسترش (در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه) بود. در نهایت برای اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر و تعیین ژنوتیپ هر نمونه، محصولات PCR روی ژل آگاروز 2/5 درصد الکتروفورز شدند (شکل 2). در نهایت برای تأیید نتایج، تعدادی از نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن (کره) ارسال گردید.

تجزیه و تحلیل توالی با استفاده از نرم افزار Chromas Lite صورت گرفت. هم‌ردیفی توالی به کمک نرم افزار آنالیزی MEGA 4، با توالی مرجع ژن انسانی (Gene Bank ID: NG-008468) مقایسه شد. تأثیر تغییر نوکلئوتیدی بر خمش RNA در سر 3' با استفاده از سایت Vienna RNA folding انجام گرفت (<http://rna.tbi.univie.ac.at>). از آنالیز رگرسیون لجستیک چندگانه (Multiple logistic regression) برای آنالیز داده‌های ژنتیکی (مدل‌های Co-dominant, Dominant, Recessive)، توسط نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش 22) استفاده گردید. سطح معنی‌داری کمتر از 0/05 انتخاب شد.

یافته‌ها

در این مطالعه 141 بیمار با گرفتگی 50% عروق کرونری و میانگین سنی $52/3 \pm 7/3$ و 137 فرد سالم با میانگین سنی $51/4 \pm 6/2$ مورد بررسی قرار گرفتند (جدول 1). فراوانی آللی پلی مورفیسم AGTR1 در بیماران CAD⁺ و کنترل برای آلل A به ترتیب: 80/9% و 90/9% و برای آلل C (موتانت) به ترتیب: 19/1% و 9/1% مشاهده شد. نتایج این مطالعه اختلاف معنی‌داری بین گروه مورد و شاهد برای آلل C نشان داد ($P=0/001$ و $95\% CI=1/41-3/97$, $OR=2/39$).

در مدل وراثت Dominant، فراوانی بالاتری از نظر آماری برای ژنوتیپ‌های AC و CC در گروه مورد در مقابل گروه شاهد (به ترتیب 32/6% در مقابل 17/5% و $P=0/004$) در مقایسه با گروه‌های دارای ژنوتیپ AA با نسبت شانس 2/28 ($95\% CI=1/29-4/00$) مشاهده شد (جدول 3).

مدل وراثتی Recessive نیز فراوانی بالاتری را از نظر آماری برای ژنوتیپ‌های AA و AC در گروه مورد در مقابل گروه شاهد (به ترتیب 94/3% در مقابل 99/3% و $P=0/049$) در مقایسه با گروه‌های دارای ژنوتیپ CC با نسبت شانس 8/18 ($95\% CI=1/01-66/31$) نشان داد (جدول 3).

جدول 3- فراوانی ژنوتیپی و آلی پلی مورفیسم A1166G ژن AGTR1 در افراد مورد مطالعه

ژنوتیپها	مورد (141 نفر)	شاهد (137 نفر)	OR(95% CI)	سطح معنی داری
AA	95 (67/4%)	113 (82/5%)	1 (رفرنس)	-
AC	38 (26/9%)	23 (16/8%)	1/96 (1/09-3/52)	0/024
CC	8 (5/7%)	1 (0/7%)	9/51 (1/16-77/45)	0/035
AA	95 (67/4%)	113 (82/5%)	-	-
AC+ CC	46 (32/6%)	24 (17/5%)	2/28(1/29-4/00)	0/004
AA+AC	133 (94/3%)	136 (99/3%)	-	-
CC	8 (5/7%)	1 (0/7%)	8/18(1/01-66/31)	0/049
A	228 (80/9%)	249 (90/9%)	-	-
C	54 (19/1%)	25 (9/1%)	2/39(1/41-3/97)	0/001

بحث

سیستم رنین-آنژیوتانسین، یک سیستم هورمونی است که به عنوان تنظیم کننده اصلی فشار خون عمل می کند و تأثیرات فیزیولوژیکی متفاوتی بر ارگان های بدن دارد و می تواند در عملکردهای متعددی از جمله تنظیم سیکل سلولی دخالت کند. AGTR1 یک گیرنده غالب در این سیستم می باشد و کاندید مناسبی به عنوان یک عامل تأثیرگذار در بیماری عروق کرونری است (21).

He و همکاران در مطالعه خود در سال 2010، بعد از بررسی 1906 شرکت کننده از ناحیه شمال چین، چندین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در سیستم رنین - آنژیوتانسین در ارتباط با فشار خون بالا را بررسی کردند. بر اساس این مطالعه تنوع ژنتیکی در سیستم رنین - آنژیوتانسین از جمله پلی مورفیسم A1166C در ژن AGTR1 با پاسخ فشار خون بالا آشکار شد (22).

Jin و همکاران در سال 2012، فرضیه ای را براساس حضور پلی مورفیسم A1166C در ژن AGTR1 مطرح کردند. طبق این فرضیه، حجم بطن چپ با پلی مورفیسم A1166C ژن AGTR1 وابستگی دارد. در واقع حضور پلی مورفیسم C در mRNA، جفت شدن خود را با

microRNA-155، دچار اختلال کرده و باعث پایداری mRNA و افزایش بیان تولید پروتئین AGTR1 در شرایط آزمایشگاهی می شود. در ارزیابی این فرضیه، 708 فرد که به صورت تصادفی از جمعیت سفید اروپایی انتخاب شده بودند، شرکت داشتند. در این آزمایش ساختار بطن چپ از طریق اکوکاردیوگرافی و پلی مورفیسم A1166C ژن AGTR1 و همچنین آلدوسترون 24 ساعته ادرار بررسی شد. در این مطالعه، نتایج فراوانی ژنوتیپها به صورت AA 49/1%، AC 42/8% و CC 8/1% مشاهده شد (23).

در این مطالعه برای بررسی پلی مورفیسم A1166C ژن AGTR1 از تکنیک tetra- primer ARMS- PCR استفاده شد. برتری این تکنیک نسبت به تکنیک هایی مانند: PCR-RFLP، SSCP، و ARMS-PCR، عدم نیاز این روش به آنزیم های محدود کننده و رادیوایزوتوپها می باشد؛ همچنین این تکنیک قادر به تشخیص ژنوتیپ اختصاصی در یک واکنش PCR بدون نیاز به دستورزی پس از PCR می باشد.

در مطالعه حاضر، آنالیز داده ها بر اساس مدل های ژنتیکی Co-dominant، Dominant و Recessive انجام گرفت. نتایج نشان داد که پلی مورفیسم A1166C ژن AGTR1 از

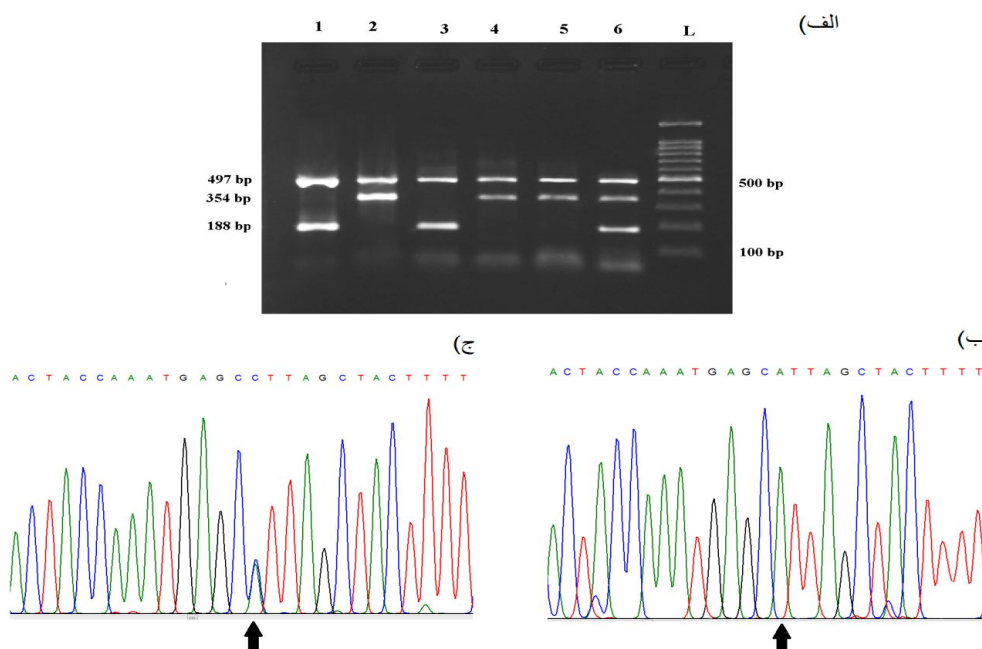
مطالعه، علاوه بر تعیین فراوانی این پلی مورفیسم و تأثیر آن بر بیماری عروق کرونری، از طریق تعیین توالی تعدادی از نمونه‌های جمعیت مورد مطالعه، صحت و دقت استفاده از روش tetra primer ARMS PCR نیز ارزیابی شد. نتایج مطالعه حاضر انطباق 100% را بین نتایج T-ARMS-PCR و تعیین توالی نشان داد (شکل 3).

نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار در دو گروه بود (جدول 3). در این مطالعه از نظر فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم A1166C به ترتیب: 67/4% افراد دارای پلی مورفیسم AA، 26/9% دارای پلی مورفیسم AC و 5/7% دارای پلی مورفیسم CC بودند.

همچنین بررسی تأثیر این پلی مورفیسم بر ساختار انتهای mRNA 3' خمش اشتباه را نشان داد (شکل 2). در این



شکل 2. تأثیر پلی مورفیسم A1166C ژن AGTR1 بر خمش انتهای 3' RNA. الف) ساختار 3'-UTR نرمال. ب) ساختار 3'-UTR موتانت.



شکل 3: الف) ژل الکتروفورز آگاروز واکنش T-ARMS-PCR پلی مورفیسم A1166C ژن AGTR1. لاین‌های 2، 4 و 5 نمونه هموزیگوت AA و لاین 6 نمونه هتروزیگوت AC و لاین‌های 1 و 3 نمونه‌های هموزیگوت CC می‌باشد. ب) توالی نمونه هموزیگوت نرمال (AA)، ج) توالی نمونه هتروزیگوت (AC).

نتیجه گیری

افراد بیشتر پیشنهاد می‌گردد؛ چرا که افزایش کمیّت باعث کاهش ضریب خطای موجود در نتایج به‌دست‌آمده می‌شود.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر، می‌توان استنباط کرد که پلی‌مورفیسم A1166C ژن *AGTR1* نقشی مؤثری در افزایش خطر ابتلا به بیماری عروق کرونری دارد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از طرح مصوب در دانشگاه یزد با کد اخلاق IR.SSU.REC.1395.223 می‌باشد. بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه و نیز از تمام افراد شرکت‌کننده در مطالعه، اعلام می‌داریم.

با توجه به اهمیّت پلی‌مورفیسم‌ها در ابتلا به انواع بیماری‌ها از جمله آترواسکلروز، پیشنهاد می‌شود که بررسی‌های بیشتری بر روی آنها انجام شود. همچنین با توجه به کم‌بودن جامعه آماری تحقیق حاضر، بررسی بر روی تعداد

منابع:

- 1- Kovarnik T, Kral A, Skalicka H, Skalicka L, Dostal O, Kralik L, et al. Prediction of coronary vessel involvement on the basis of atherosclerosis risk factor analysis. *Bratisl Lek Listy*. 2013; 114(7): 413-7.
- 2- Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(23): 2129-38.
- 3- Boudoulas KD, Triposciadis F, Geleris P, Boudoulas H. Coronary Atherosclerosis: Pathophysiologic Basis for Diagnosis and Management. *Prog Cardiovasc Dis*. 2016; 58(6): 676-92.
- 4- Ganesh SK, Arnett DK, Assimes TL, Basson CT, Chakravarti A, Ellinor PT, et al. Genetics and genomics for the prevention and treatment of cardiovascular disease: update: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2013; 128(25): 2813-51.
- 5- O'Donnell CJ, Nabel EG. Genomics of cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2011; 365(22): 2098-109.
- 6- Heidari MM, Khatami M, Hadadzadeh M, Kazemi M, Mahamed S, Malekzadeh P, et al. Polymorphisms in NOS3, MTHFR, APOB and TNF-alpha Genes and Risk of Coronary Atherosclerotic Lesions in Iranian Patients. *Res Cardiovasc Med*. 2016; 5(1): e29134.
- 7- Heidari MM, Foruzannia SK, Khatami M, Hadadzadeh M, Emami Meybodi M. Apolipoprotein E gene polymorphism in Iranian coronary atherosclerosis patients candidate for coronary artery bypass graft. *Iran J Basic Med Sci*. 2013; 16(7): 841-4.
- 8- Khatami M, Heidari MM, Hadadzadeh M, Scheiber-Mojdehkar B, Bitaraf Sani M, Houshmand M. Simultaneous Genotyping of the Rs4762 and Rs699 Polymorphisms in Angiotensinogen Gene and Correlation with Iranian CAD Patients with Novel Hexa-primer ARMS-PCR. *Iran J Public Health*. 2017; 46(6): 811-9.
- 9- MacGregor GA, Markandu ND, Roulston JE, Jones JC, Morton JJ. Maintenance of blood pressure by the renin-angiotensin system in normal man. *Nature*. 1981; 291(5813): 329-31.
- 10- Kim HK, Lee H, Kwon JT, Kim HJ. A polymorphism in AGT and AGTR1 gene is associated with lead-related high blood pressure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015; 16(4): 712-9.
- 11- Vinson GP, Ho MM, Puddefoot JR. The distribution of angiotensin II type 1 receptors, and the tissue renin-angiotensin systems. *Mol Med Today*. 1995; 1(1): 35-9.
- 12- Guo DF, Sun YL, Hamet P, Inagami T. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Res*. 2001; 11(3): 165-80.
- 13- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292(1): C82-97.

- 14- Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, et al. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Engl J Med*. 1994; 330(23): 1629-33.
- 15- Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension*. 1994; 24(1): 63-9.
- 16- Ulgen MS, Ozturk O, Yazici M, Kayrak M, Alan S, Koc F, et al. Association between A/C1166 gene polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor and biventricular functions in patients with acute myocardial infarction. *Circ J*. 2006; 70(10): 1275-9.
- 17- Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A, et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet*. 1994; 344(8927): 910-3.
- 18- Chistiakov DA, Kobalova ZhD, Tereshchenko SN, Moiseev SV, Nosikov VV. [Polymorphism of vascular angiotensin II receptor gene and cardiovascular disorders]. *Ter Arkh*. 2000; 72(4): 27-30. [Russian]
- 19- Makeeva OA, Puzyrev KV, Pavliukova EN, Koshel'skaia OA, Golubenko MV, Efimova EV, et al. [ACE and AGTR1 genes polymorphisms in left ventricular hypertrophy pathogenesis in humans]. *Mol Biol (Mosk)*. 2004; 38(6): 990-6. [Russian]
- 20- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215.
- 21- Kato N, Tatara Y, Ohishi M, Takeya Y, Onishi M, Maekawa Y, et al. Angiotensin-converting enzyme single nucleotide polymorphism is a genetic risk factor for cardiovascular disease: a cohort study of hypertensive patients. *Hypertens Res*. official journal of the Japanese Society of Hypertension. 2011; 34(6): 728-34.
- 22- Kelly T, Hixson J, Rao D, Mei H, Rice T, Jaquish C, et al. Genome-wide Linkage and Positional Candidate Gene Study of Blood Pressure Response to Dietary Potassium Intervention: the genetic epidemiology network of salt sensitivity study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010; 3(6): 539-47.
- 23- Jin Y, Kuznetsova T, Thijs L, Schmitz B, Liu Y, Asayama K, et al. Association of left ventricular mass with the AGTR1 A1166C polymorphism. *Am J Hypertens*. 2012; 25(4): 472-8.