



Short Communication

## Association of G22A variant of Adenosine Deaminase gene with coronary in-stent restenosis in coronary artery patients receiving drug-eluting stent

Elaheh Moosavi<sup>ID1</sup>, Samaneh Enayati<sup>ID2</sup>, Sepideh Borhan<sup>ID2</sup>, Maryam Mehrpooya<sup>ID3</sup>,  
Mahsa Mohammad Amoli<sup>ID2</sup>

### ABSTRACT

In-stent restenosis (ISR) is regarded as the main problem in the utilization of stents in the treatment of coronary artery atherosclerotic stenosis in percutaneous coronary intervention (PCI). This study investigated the possible role of the G22A variant of the *Adenosine Deaminase* gene (ADA) in the development of ISR. In this study, 91 patients who underwent PCI were divided into two groups of case with ISR ( $n=40$ ) and control without ISR after six months from stenting ( $n=51$ ). The case and control groups were matched in terms of age and gender. The genotypes of the G22A variant in the samples were examined by the molecular method of PCR-RFLP and electrophoresis. The results were statistically analyzed using t-test, and the results showed that the frequency of allele A of variant G22A in the (+ISR) group was higher than that in the (-ISR) group. However, there was no significant relationship between the distribution of allele and genotype frequency of this variant with the incidence of ISR ( $P>0.05$ ).

**Keywords:** Adenosine Deaminase Gene, Atherosclerosis, Drug-Eluting Stent, G22A, Percutaneous Coronary Intervention, Variant



**Citation:** Moosavi E, Enayati S, Borhan S, Mehrpooya M, Mohammad Amoli M. [Association of G22A variant of Adenosine Deaminase gene with coronary in-stent restenosis in coronary artery patients receiving drug-eluting stent]. J Birjand Univ Med Sci. 2020; 27(4): 385-391. [Persian]

**DOI** <http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.107>

**Received:** December 13, 2020

**Accepted:** May 09, 2020

<sup>1</sup> Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Metabolic Disorders Research Center, Endocrinology and Metabolism Research Institute, Cellular and Molecular Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Interventional Cardiology Department, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding author:** Metabolic Disorders Research Center, Endocrinology and Metabolism Research Institute, Cellular and Molecular Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: +982188220073      Fax: +982188220073      Email: amolimm@tums.ac.ir

## بررسی ارتباط واریانت G22A ژن آدنوزین دامیناز با coronary-in-stent restenosis در افراد مبتلا به بیماری عروق کرونر دریافت کننده استنت دارویی

الهه موسوی<sup>۱</sup>, سمانه عنایتی<sup>۲</sup>, سپیده برهان<sup>۲</sup>, مریم مهرپویا<sup>۳</sup>, مهسا محمدآملی<sup>۴</sup>

### چکیده

مشکل اصلی به کارگیری استنت در درمان گرفتگی‌های آترواسکلروزیک عروق کرونر در روش‌های مداخله غیرجراحی شریان کرونر از راه پوست (PCI) بروز تنگی مجدد درون استنت (ISR) است. در این مطالعه به بررسی نقش احتمالی واریانت G22A ژن ADA در بروز ISR پرداخته‌ایم. در این مطالعه ۶۱ بیمار که تحت PCI قرار گرفته بودند، در دو گروه مورد با بروز ISR (۴۰ نفر) و شاهد عدم بروز ISR پس از ۶ ماه از زمان استنت‌گذاری (۵۱ نفر) وارد شدند. دو گروه مورد و شاهد از نظر سن و جنسیت مطابقت همسان شدند. ژنوتیپ‌های واریانت G22A در نمونه‌ها با روش مولکولی PCR-RFLP و الکتروفورز بررسی شد و نتایج حاصل با استفاده از آزمون آماری t-test تجزیه و تحلیل آماری شد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد فراوانی آلل A واریانت G22A در گروه ISR+ بیشتر از ISR- می‌باشد. البته بین توزیع فراوانی آللی و ژنوتیپی این واریانت با بروز ISR ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0.05$ ).

**واژه‌های کلیدی:** آدنوزین دامیناز، آترواسکلروزیس، G22A، استنت دارویی، آنزیوپلاستی با بالون، واریانت

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرونی، ۱۳۹۹: ۳۷-۴۲.

دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۶ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۰۵

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات اختلالات متابولیک، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم سلولی و مولکولی غدد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه کار迪ولوژی، بخش کار迪ولوژی مداخله‌ای، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

**نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات اختلالات متابولیک، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم سلولی و مولکولی غدد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

آدرس: تهران، خیابان کارگر شمالی، خیابان جلال آل احمد، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۰۲۱۸۸۲۰۰۷۳ نامبر: ۰۲۱۸۸۲۲۰۰۷۳ پست الکترونیکی: amolimm@tums.ac.ir

## مقدمه

آدنوزین دامیناز (ADA) یک آنزیم مهم در کاتالیز آدنوزین به اینوزین است. افرادی که به طور مادرزادی نقص در این آنزیم را دارند، نقص در هر دو سیستم ایمنی هومورال و سلولی دیده می‌شود. شایع‌ترین واریانت کارکردی ژن آدنوزین دامیناز، G22A می‌باشد. در واریانت (rs73598374) G22A تبدیل نوکلئوتید G به A در موقعیت ۲۲ از اگزون شماره یک منجر به جانشینی آسپارژین به جای آسپارتیک‌اسید بر روی کونو هشتم ژن می‌شود. این جانشینی منجر به تغییر در بیان ژن ADA می‌شود (۶). در مطالعه‌ای گزارش شده که ژنتیپ GA نسبت به ژنتیپ GG منجر به کاهش ۲۰-۳۰٪ فعالیت آنزیمی می‌شود و ممکن است باعث افزایش غلظت آدنوزین بافتی شود (۶). با وجود نقش کلیدی مولکول آدنوزین در مکانیسم بیماری‌های قلبی عروقی (۷، ۸)، مطالعات اندکی از تاثیر ژن آدنوزین دامیناز با این گروه از بیماری‌ها انجام شده است، لذا هدف از این مطالعه بررسی ارتباط واریانت G22A با بروز ISR در بیماران دریافت کننده استنت دارویی است.

## روش تحقیق

در این مطالعه مورد-شاهدی بین سپتامبر ۲۰۱۴ و مارس ۲۰۱۶، ۹۱ بیمار پی در پی، به صورت آینده‌نگر در مطالعه قرار گرفتند. بیماران سابقه PCI را در یکی از شریان‌های بزرگ کرونر به عنوان مثال نزولی قدمای چپ (LAD)، سیرکمفلکس (LCX) یا شریان کرونر راست (RCA) داشتند. آنژیوگرافی بیماران در بخش آنژیوگرافی بیمارستان دکتر شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، توسط پزشک متخصص قلب انجام شده بود. بر اساس نتایج آنژیوگرافی بیماران در دو گروه دارای ISR و فاقد آن تقسیم شده‌اند و ISR در این مطالعه از نظر آنژیوگرافی به عنوان قطر تنگی بیش از ۵۰ درصد در بخش استنت یا لبه‌های آن پس از PCI تعریف شده است. بیمارانی که زمان بروز ISR در آن‌ها زودتر از شش ماه پس از استنت‌گذاری بودند، از مطالعه خارج شدند؛ در نهایت مقایسه بین دو گروه بیماران شامل ۴۰ بیمار مورد با ISR+ (ISR+) و گروه شاهد بدون ISR (ISR-) با تعداد ۵۱ نفر انجام گرفت. از کلیه شرکت‌کنندگان در مطالعه رضایت نامه آگاهانه اخذ گردید.

از درمان‌های بسیار مهمی که تحول چشمگیری در علم کاردیولوژی ایجاد کرده و نیاز بیماران مبتلا به عروق کرونر را به عمل جراحی پیوند عروق کرونر به میزان زیادی کاهش داد و یا جایگزین عمل جراحی پیوند عروق کرونر قلمداد شد، استفاده از استنت و یا آنتیوپلاستی عروق کرونر (transluminal coronary angioplasty) استنت، ریسک تنگی مجدد (Restenosis) را در انسداد کامل عروق کرونری کاهش می‌دهد (۱، ۲). تنگی مجدد یا کاهش قطر لومن پس از مداخله شریان کرونری پری‌کوتانئوس (PCI)، به دلیل تکثیر بافت نئوایتیما پس از آسیب شریانی است. گرفنگی لومن ۵۰٪ درصد یا بیشتر به عنوان تنگی مجدد تعریف می‌شود. تنگی مجدد داخل استنت یا ISR<sup>۳</sup> از لحاظ آنژیوگرافیک به حضور بیش از ۵۰٪ گرفتگی عروق در قسمت استنت گذاری شده تلقی می‌شود. در پاسخ به آسیب بالون یا استنت‌گذاری، التهاب در جداره عروق با تشکیل نئوایتیما هیپرتروفیک و تکثیر سلول‌های ماهیچه صاف عروقی (VSMC<sup>۴</sup>) و بازآرایی ساختار عروق آغاز می‌شود. در گرفتگی لومنی جداره رگ فرآیند تشکیل نئوایتیما به عنوان یک پاسخ التهابی به ترمیم زخم به ویژه در بافت عروق ظاهر پیدا می‌کند (۳).

آدنوزین یک مولکول سیگنال اندوژنر است که طی دوره ایسکمی به درون جریان خون آزاد می‌شود (۴). آدنوزین با فعالسازی چهار زیرگونه از گیرنده‌های آدنوزی که به A1، A2A، A2B و A3 شناخته می‌شوند، نقش فیزیولوژیک خود را اعمال می‌کند. فعال شدن گیرنده آدنوزین A1 واقع در سطح نوتروفیل‌ها سبب افزایش مهاجرت این سلول‌ها به محل آسیب و به دنبال آن اتصال و تجمع نوتروفیل‌ها در اندولیوم می‌شود. این نوتروفیل‌ها با آزادسازی رادیکال‌های اکسیژن سبب فعال شدن پلاکت‌ها و به دنبال آن تکثیر سلول‌های عضله صاف جدار عروق می‌شود. تنگی مجدد حاصل رشد بیش از حد این بافت می‌باشد. از این رو عملکرد آدنوزین در فعالسازی گیرنده A1 پیش-التهابی است (۵).

<sup>1</sup> Percutaneous coronary intervention

<sup>2</sup> In- Stent Restenosis

<sup>3</sup> Vascular Smooth Muscle Cell

### بررسی آماری

تمام یافته‌های آماری با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه فراوانی آل‌ها و ژنتیپ‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون مریع کا و تست T گرفت و مقادیر کمتر از  $0.05$  معنی‌دار تلقی گردید.

### یافته‌ها

اطلاعات بالینی و دموگرافیک افراد هر دو گروه در جدول ۱ خلاصه شده است. شکل (۱) تصویر ژل الکتروفورز می‌باشد که الگوی قطعات در سه ژنتیپ AG، GG و AA را نشان می‌دهد. توزیع آل‌ها و ژنتیپ‌های واریانت G22A ژن آدنوزین دامیناز در افراد ISR+ با گروه ISR- مقایسه شد. درصد فراوانی آلی برای واریانت G22A در جدول ۲ نشان داده شده است. در واریانت rs73598374 فراوانی آلی A و G در افراد فاقد ISR به ترتیب  $38/8\%$  و  $36/7\%$  و در گروه واحد ISR به ترتیب برابر با  $38/3\%$  و  $61/2\%$  می‌باشد. توزیع فراوانی آلی واریانت G22A در جدول ۲ ارائه شده است. در سطح آلی بین دو گروه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).  $OR = 1/11$ ,  $CI = 0.6 - 2.0$ .

### بحث

تنگی مجدد درون استنت را می‌توان به عنوان نوعی ترمیم اغراق‌آمیز عروق به دنبال آسیب‌های شریانی ناشی از PCI توصیف کرد که منجر به کاهش قطر لومن می‌شود. تنگی مجدد استنت یا ISR بیش از  $50\%$  باریک شدن لومن است که در پیگیری در آنژیوگرافی مشاهده می‌شود (۱۱).

اطلاعات بالینی و دموگرافیک بیماران شامل عوامل خطر، سوابق پزشکی و تظاهرات بالینی در پرسشنامه ثبت گردید. افراد با سابقه مصرف داروهای ضدفسار خون یا افراد با میانگین فشار خون  $\leq 140/90$  mm Hg ناشای خون ( $FBS \leq 126$  mg/dl) یا قند خون دو ساعتی  $\leq 200$  mg/dl و یا مصرف داروهای خوارکی هایپوگلایسمیک تأیید گردید. سطح کلسترول سرمی  $\leq 200$  mg/dl، یا مصرف داروهای کاهنده کلسترول به عنوان هایپرکلسترولمی تعریف گردید. سندروم متابولیک بر اساس NCEP ATP III تعریف شد (۹).

### آنالیز مولکولی واریانت G22A

از شرکت کنندگان در مطالعه ۵ سی سی خون وریدی در لوله‌های ونجکت EDTA گرفته شد. سپس از نمونه خون کامل DNA ژنومی به روش فنل گوانیدین استخراج گردید (۱۰). غلظت DNA و خلوص DNA با استفاده از دستگاه نانودرایپ و نسبت جذب نوری  $280\text{ nm}$  در طول موج  $260\text{ nm}$  به جذب نوری در طول موج  $260\text{ nm}$  ارزیابی گردید. برای تعیین واریانت دو آلی در اکزون ۱ ژن آدنوزین دامیناز از روش PCR-RFLP استفاده شد. توالی پرایمرهای مورداستفاده برای تکثیر قطعه ژنی به طول ۳۴۴ جفت باز که در برگیرنده جایگاه واریانت G22A از پرایمر پیشرو ۵'-  
GCCCGTTAACAGAGCGTGG-3' و معکوس ۵'-  
CCCATTGTCCCTGATTAGCCC-3' استفاده گردید. محصولات PCR توسط آنزیم محدود کننده بهنام TaqI (Fermentase ER0671) برش زده شد که پس از هضم آنزیمی در صورتی که آل G هموزیگوت وجود داشته باشد، قطعه  $196$  bp و در حضور آل A هموزیگوت قطعه  $344$  bp ایجاد می‌کند. آل G/A هتروزیگوت هم منجر به ایجاد سه قطعه به طول های  $344$  و  $196$  و  $148$  bp می‌شود. در نهایت محصولات DNA Safe هضم شده توسط آنزیم بر روی ژل آکارز  $3\%$  که با Stain (SinaColon) رنگ‌آمیزی شده بود مشاهده گردید.

<sup>1</sup> Fasting Blood Suger

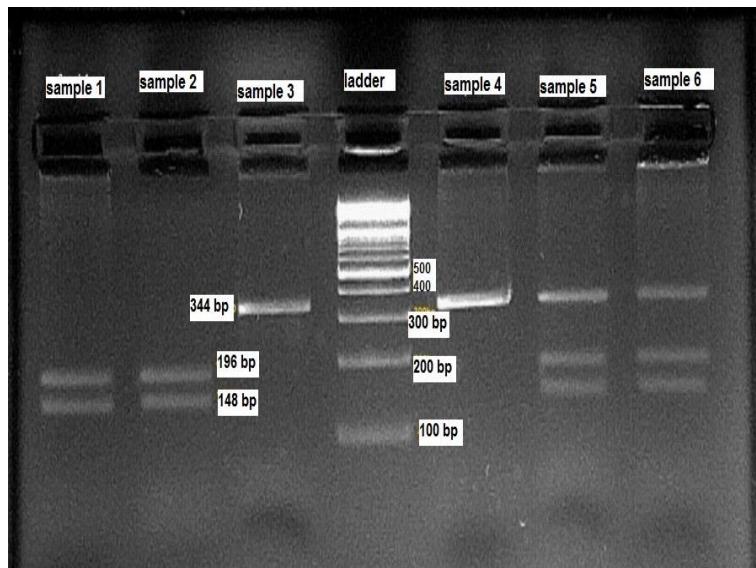
جدول ۱- اطلاعات بالینی و دموگرافیک افراد ISR+ و ISR-

متغیرهای بالینی و دموگرافیک	ISR- تعداد (درصد)	ISR+ تعداد (درصد)	سطح معنی داری
جنس (ذکر)	۵۰/۹ (%۲۷)	۶۹/۸ (%۳۰)	.۰۶
صرف سیگار	۳۷/۷ (%۲۰)	۳۹/۵ (%۱۷)	.۰۳
فشار خون بالا	۶۴/۲ (%۳۴)	۵۸/۱ (%۲۵)	.۰۵
دیابت نوع ۲	۳۲/۱ (%۱۷)	۳۲/۶ (%۱۴)	.۰۹
هایپرلیپیدمی	۳۵/۸ (%۱۹)	۴۱/۹ (%۱۸)	.۰۶
سابقه خانوادگی بیماری های قلبی زودرس	۵/۷ (%۰۳)	۱۱/۶ (%۰۵)	.۰۳
سندرم متابولیک	۳۵/۸ (%۱۹)	۲۷/۹ (%۱۲)	.۰۳

In- Stent Restenosis و ISR- گروه شاهد بدون: ISR+ گروه مورد با

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپ و آلل ADA در افراد ISR+ و ISR-

ژنوتیپ	ISR- (N=۵۱)	ISR+ (N=۴۰)	سطح معنی داری
A/A (freq)	۱۰ (%۱۹/۶)	۹ (%۲۲/۵)	.۰۴۴
A/G (freq)	۱۷ (%۳۳/۳)	۱۳ (%۳۲/۵)	
G/G (freq)	۲۴ (%۴۷/۱)	۱۸ (%۴۵)	
A (freq)	۳۷ (%۳۶/۳)	۳۱ (%۳۸/۸)	.۰۷۳۲
G (freq)	۶۵ (%۶۳/۷)	۴۹ (%۶۱/۲)	



تصویر ۱- قطعات حاصل از هضم آنزیمی توسط آنزیم TaqI، نمونه ۱ و ۴ (GG)، نمونه ۲ و ۳ (AA) و نمونه ۵ و ۶ (AG)

محدودیت‌های این مطالعه در هنگام تفسیر نتایجش باید مورد توجه قرار گیرد. آدنوزین با چندین آنزیم از جمله ADA، آدنوزین کیناز و ۵'-نوكلئوتیداز تولید و تجزیه می‌شود (۴). یک محدودیت فقدان بررسی جامع‌تر واریانت‌هایی است که به طور بالقوه با سطح آدنوزین مرتبط هستند. محدودیت دیگر، جمعیت محدود مورد مطالعه می‌باشد. همچنین ما قادر به مکانیسم اساسی نحوه اثر SNP مورد مطالعه بر ISR نبود.

### نتیجه‌گیری

در مطالعه کنونی فراوانی آل A در افراد با ISR+ نسبت به افراد ISR- بالاتر می‌باشد، اگرچه این اختلاف معنی‌دار نبود. این واریانت عملکردی ممکن است دارای پیوستگی با سایر واریانت‌های ژن آدنوزین دامیناز باشد، بنابراین لازم است که در آینده مطالعات گسترده‌تری با جمعیت بالاتر برای بررسی عملکرد این واریانت در کنار سایر واریانت‌های ژن ADA صورت گیرد. در ضمن مطالعه با حجم نمونه بیشتر و در جمعیت‌های مختلف می‌تواند به تأیید یافته‌های ما کمک کند.

### تقدیر و تشکر

این مطالعه با کد اخلاق طرح مصوب IR/TUMS/1392/EC-00325 از دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

### تضاد منافع

نویسنده‌گان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

آدنوزین یک نوکلئوزید اندوژن است که به دلیل ویژگی‌های ضدالتهابی، ضد آپوپتوز و آنتی‌اکسیدانی دارای نقش حفاظتی در قلب است و همچنین از طریق فعال‌سازی گیرنده‌های نوع A2A که در دیواره عروق واقع شده‌اند، تنظیم‌کننده جریان خون کرونری و میوکاردیال می‌باشد. در حالی که آدنوزین با اتصال به گیرنده A1 در سطح نوتروفیل‌ها سبب راهاندازی کموتاکسی می‌شود و در نتیجه مهاجرت نوتروفیل‌ها به محل آسیب را افزایش می‌دهد (۵).

واریانت رایج G22A در ژن آدنوزین دامیناز (۶) منجر به جایگزینی Asp8Asn و به دنبال آن تغییر در بیان و فعالیت کاتالیتیک آنزیم می‌شود (۶, ۱۲). در این مطالعه فراوانی ال A در افراد ISR+ نسبت به افراد ISR- بالاتر می‌باشد، اگرچه این اختلاف معنی‌دار نبود.

اگرچه تاکنون ژن ADA در ISR بررسی نشده است و مطالعه پیش رو اویلین مطالعه‌ای است که ارتباط واریانت G22A با بروز ISR را بررسی می‌نماید، اما مطالعات و نتایج مختلفی از نقش واریانت G22A بر روی قلب انجام شده است. در مطالعه‌ای توسط Riksen و همکارانش نشان دادند که هتروزیگوستی واریانت rs73598374، فعالیت کاتالیتیکی را کاهش می‌دهد، در حالی که نقش محافظتی در بیماری‌های قلبی عروقی ندارد (۱۲). در مطالعه‌ای توسط Safranow و همکارانش در سال ۲۰۰۷ مشخص شد که آلل A واریانت rs73598374، ممکن است حساسیت ژنتیکی به بیماری قلبی عروقی را کاهش دهد (۷). در مطالعه مورد شاهد توسط Hai و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در جمعیتی چینی شامل ۳۰۰ فرد مبتلا و ۴۰۰ فرد سالم، بر روی ارتباط واریانت‌های ژن آدنوزین دامیناز با خطر بیماری نارسایی قلبی حاد، ارتباطی بین توزیع فراوانی ال A و ژنتیکی واریانت rs73598374 ژن آدنوزین دامیناز، با بیماری نارسایی قلبی حاد یافت نشد (۷).

## منابع:

- 1- Bengtson JR, Mark DB, Honan MB, Rendall DS, Hinohara T, Stack RS, et al. Detection of restenosis after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty using the exercise treadmill test. *Am J Cardiol.* 1990; 65(1): 28-34. DOI: [10.1016/0002-9149\(90\)90021-R](https://doi.org/10.1016/0002-9149(90)90021-R)
- 2- Lotan C, Rozenman Y, Hendlar A, Turgeman Y, Ayzenberg O, Beyar R, et al. Stents in total occlusion for restenosis prevention. The multicentre randomized STOP study. *Eur Heart J.* 2000; 21(23): 1960-6. DOI: [10.1053/euhj.2000.2295](https://doi.org/10.1053/euhj.2000.2295)
- 3- Mitra A, Agrawal DK. In stent restenosis: bane of the stent era *J Clin Pathol.* 2006; 59(3): 232-9. DOI: [10.1136/jcp.2005.025742](https://doi.org/10.1136/jcp.2005.025742)
- 4- Sommerschild H, Kirkebøen K. Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion—an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2000; 44(9): 1038-55. DOI: [10.1034/j.1399-6576.2000.440903.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-6576.2000.440903.x)
- 5- Hayes E. Adenosine receptors and cardiovascular disease. *Cardiovasc Toxicol.* 2003; 3(1): 71-88. DOI: [10.1385/ct:3:1:71](https://doi.org/10.1385/ct:3:1:71)
- 6- Khodadadi I. Mini review from the molecular base to the diagnostic value of adenosine deaminase. *Avicenna J Med Biochem.* 2014; 2(2): 1. DOI: [10.17795/ajmb-24310](https://doi.org/10.17795/ajmb-24310)
- 7- He H-R, Li Y-J, He G-H, Wang Y-J, Zhai Y-J, Xie J, et al. The adenosine deaminase gene polymorphism is associated with chronic heart failure risk in Chinese. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(9): 15259-71. DOI: [10.3390/ijms150915259](https://doi.org/10.3390/ijms150915259)
- 8- Willems L, Reichelt ME, Molina JG, Sun C-X, Chunn JL, Ashton KJ, et al. Effects of adenosine deaminase and A1 receptor deficiency in normoxic and ischaemic mouse hearts. *Cardiovasc Res.* 2006; 71(1): 79-87. DOI: [10.1016/j.cardiores.2006.03.006](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.03.006)
- 9- Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman JI, Smith Jr SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation.* 2004; 109(3):433-8. DOI: [10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6)
- 10- Chacon-Cortes D, Griffiths LR. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *J Biorepos Sci Appl Med.* 2014; 2014; (2): 1-9. DOI: [10.2147/BSAM.S46573](https://doi.org/10.2147/BSAM.S46573)
- 11- Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'agostino RB, Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2014; 63(25 Part B): 2935-59. DOI: [10.1161/01.cir.0000437741.48606.98](https://doi.org/10.1161/01.cir.0000437741.48606.98)
- 12- Riksen NP, Franke B, van den Broek P, Naber M, Smits P, Rongen GA. The 22G> A polymorphism in the adenosine deaminase gene impairs catalytic function but does not affect reactive hyperaemia in humans in vivo. *Pharmacogenomics J.* 2008; 18(10): 843-6. DOI: [10.1097/FPC.0b013e328305e630](https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328305e630)
- 13- Safranow K, Rzeuski R, Binczak-Kuleta A, Czyzycka E, Skowronek J, Jakubowska K, et al. ADA\* 2 allele of the adenosine deaminase gene may protect against coronary artery disease. *Cardiology.* 2007; 108(4): 275-81. DOI: [10.1159/000099096](https://doi.org/10.1159/000099096)