

Short Communication

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

Elaheh Moosavi¹, Samaneh Enayati², Sepideh Borhan², Maryam Mehrpooya³,
Mahsa Mohammad Amoli²

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

¹ Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

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

³ 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 دآمیناز با coronary-in-stent restenosis در افراد

مبتلا به بیماری عروق کرونر دریافت کننده استنت دارویی

الهه موسوی^۱، سمانه عنایتی^۲، سپیده برهان^۲، مریم مهرپویا^۳، مهسا محمد آملی^۲

چکیده

مشکل اصلی به کارگیری استنت در درمان گرفتگی‌های آترواسکلروتیک 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 ۹۱ 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 دآمیناز، آترواسکلروزیس، G22A، استنت دارویی، آنژیوپلاستی با بالون، واریانت

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۹؛ ۲۷(۴): ۳۸۵-۳۹۱.

دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۶ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۰۵

^۱ گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات اختلالات متابولیک، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم سلولی و مولکولی غدد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ گروه کاردیولوژی، بخش کاردیولوژی 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: ۰۲۱۸۸۲۲۰۰۷۳ نمایر: ۰۲۱۸۸۲۲۰۰۷۳ پست الکترونیکی: amolimm@tums.ac.ir

مقدمه

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 آنژیوپلاستی عروق کرونر (percutaneous transluminal coronary angioplasty) می‌باشد. تعبیه 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 پری کوتانئوس (PCI^۱)، به دلیل تکثیر بافت نئواینتیما پس از آسیب شریانی است. گرفتگی لومن ۵۰ درصد یا بیشتر به عنوان تنگی مجدد تعریف می‌شود. تنگی مجدد داخل استنت یا ISR^۲ 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 نئواینتیما، هیپرتروفیک و تکثیر سلول‌های ماهیچه صاف عروقی (VSMC^۳) و بازآرایی ساختار عروق آغاز می‌شود. در گرفتگی لومنی جداره رگ فرایند تشکیل نئواینتیما به عنوان یک پاسخ التهابی به ترمیم زخم به ویژه در بافت عروق تظاهر پیدا می‌کند (۳).

آدنوزین یک مولکول سیگنال اندوژن است که طی دوره ایسکمی به درون جریان خون آزاد می‌شود (۴). آدنوزین با فعالسازی چهار زیرگونه از گیرنده‌های آدنوزینی 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 اندوتلیوم 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).

¹ Percutaneous coronary intervention

² In- Stent Restenosis

³ Vascular Smooth Muscle Cell

آدنوزین دامیناز (ADA) یک آنزیم مهم در کاتالیز آدنوزین به اینوزین است. افرادی که به‌طور 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 G22A (rs73598374) تبدیل نوکلئوتید G به A در موقعیت ۲۲ از اگزون شماره یک منجر به جانشینی آسپارژین به جای آسپارتیک‌اسید بر روی کدون هشتم ژن می‌شود. این جانشینی منجر به تغییر در بیان ژن ADA می‌شود (۶). در مطالعه‌ای گزارش شده که ژنوتیپ GA نسبت به ژنوتیپ GG منجر به کاهش ۳۰-۲۰٪ 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 قدامی چپ (LAD)، سیرکامفلکس (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 بود، از مطالعه خارج شدند؛ در نهایت مقایسه بین دو گروه بیماران شامل ۴۰ بیمار مورد با ISR (+) و گروه شاهد بدون ISR (-) با تعداد ۵۱ نفر انجام گرفت. از کلیه شرکت‌کنندگان در مطالعه رضایت نامه آگاهانه اخذ گردید.

بررسی آماری

تمام یافته‌های آماری با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون مربع کا و تست T صورت گرفت و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ 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 ژنوتیپ AG، GG و AA را نشان می‌دهد. توزیع آلل‌ها و ژنوتیپ‌های واریانت G22A ژن آدنوزین دامیناز در افراد ISR+ با گروه ISR- مقایسه شد. درصد فراوانی آللی برای واریانت G22A در جدول ۲ نشان داده شده است. در واریانت rs73598374 فراوانی آللی A و G در افراد فاقد ISR به ترتیب ۳۶/۳٪ و ۳۶/۷٪ و در گروه واجد ISR به ترتیب برابر با ۳۸/۸٪ و ۶۱/۲٪ می‌باشد. توزیع فراوانی آللی واریانت G22A در جدول ۲ ارائه شده است. در سطح آللی بین دو گروه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0.05$, OR=۱/۱۱, ۹۵٪ CI=۰/۶-۲/۰).

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 ۵۰٪ 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 ضد فشار خون یا افراد با میانگین فشار خون $\leq 140/90$ mm Hg به عنوان افراد با فشار خون بالا در نظر گرفته شدند. دیابت بر اساس معیار انجمن دیابت آمریکا (۶) یعنی گلوکز ناشتای خون (≤ 126 mg/dl (FBS¹) یا قند خون دو ساعته ≤ 200 mg/dl و یا مصرف داروهای خوراکی هائپوگلیسمیک تأیید گردید. سطح کلسترول سرمی ≤ 200 mg/dl، یا مصرف داروهای کاهنده کلسترول به عنوان هایپرکلسترولمی تعریف گردید. سندرم متابولیک بر اساس NCEP ATP III تعریف شد (۹).

آنالیز مولکولی واریانت G22A

از شرکت‌کنندگان در مطالعه ۵ سی سی خون وریدی در لوله‌های ونوجکت EDTA گرفته شد. سپس از نمونه خون کامل DNA ژنومی به روش فل‌گوانیدین استخراج گردید (۱۰). غلظت و خلوص DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ و نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ nm به جذب نوری در طول موج ۲۸۰nm ارزیابی گردید. برای تعیین واریانت دو آللی در اگزون ۱ ژن آدنوزین دامیناز از روش PCR-RFLP استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه ژنی به طول ۳۴۴ جفت باز که در برگرفته جایگاه واریانت G22A از پرایمر پیشرو 5'-GCCCGTTAAGAAGAGCGTGG-3' و معکوس 5'-CCCATTGTCCCTGATTAGCCC-3' استفاده گردید. محصولات PCR توسط آنزیم محدود کننده به نام TaqI (Fermentase ER0671) برش زده شد که پس از هضم آنزیمی در صورتی که آلل G هموزیگوت وجود داشته باشد، قطعه ۱۹۶ bp و ۱۴۸ bp و در حضور آلل A هموزیگوت قطعه ۳۴۴ bp ایجاد می‌کند. آلل G/A هتروزیگوت هم منجر به ایجاد سه قطعه به طول های ۳۴۴، ۱۹۶ و ۱۴۸ جفت باز می‌شود. در نهایت محصولات هضم شده توسط آنزیم بر روی ژل آگارز ۳٪ که با DNA Safe (SinaColon) Stain رنگ‌آمیزی شده بود مشاهده گردید.

¹ Fasting Blood Sugar

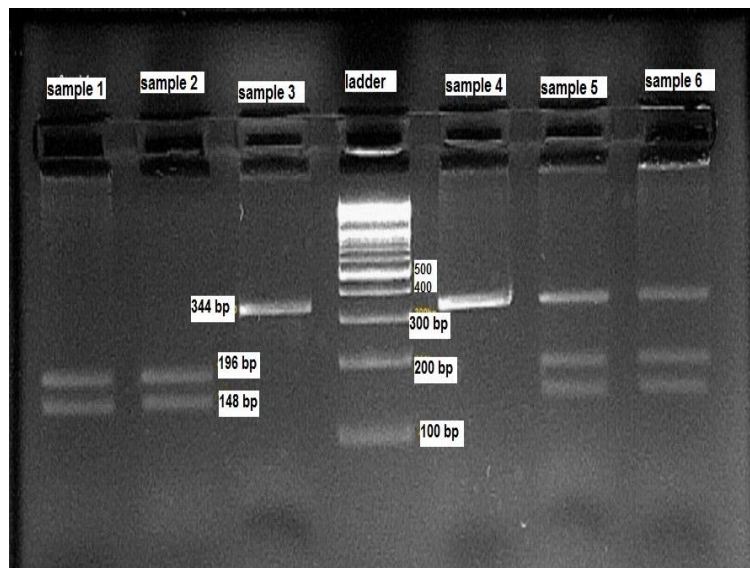
جدول ۱- اطلاعات بالینی و دموگرافیک افراد ISR+ و ISR-

متغیرهای بالینی و دموگرافیک	ISR- تعداد (درصد)	ISR+ تعداد (درصد)	سطح معنی داری
جنس (مذکر)	۵۰/۹ (%۲۷)	۶۹/۸ (%۳۰)	۰/۰۶
مصرف سیگار	۳۷/۷ (%۲۰)	۳۹/۵ (%۱۷)	۰/۳
فشار خون بالا	۶۴/۲ (%۳۴)	۵۸/۱ (%۲۵)	۰/۵
دیابت نوع ۲	۳۲/۱ (%۱۷)	۳۲/۶ (%۱۴)	۰/۹
هایپرلیپیدمی	۳۵/۸ (%۱۹)	۴۱/۹ (%۱۸)	۰/۶
سابقه خانوادگی بیماری‌های قلبی زودرس	۵/۷ (%۳)	۱۱/۶ (%۵)	۰/۳
سندرم متابولیک	۳۵/۸ (%۱۹)	۲۷/۹ (%۱۲)	۰/۳

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

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)	
A/G (freq)	۱۷ (%۳۳/۳)	۱۳ (%۳۲/۵)	۰/۹۴۴
G/G (freq)	۲۴ (%۴۷/۱)	۱۸ (%۴۵)	
A (freq)	۳۷ (%۳۶/۳)	۳۱ (%۳۸/۸)	۰/۷۳۲
G (freq)	۶۵ (%۶۳/۷)	۴۹ (%۶۱/۲)	



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

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. درحالی‌که 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 آلل A در افراد ISR+ نسبت به افراد ISR- بالاتر می‌باشد، اگر چه این اختلاف معنی‌دار نبود.

اگرچه تاکنون ژن ADA در ISR بررسی نشده است و مطالعه پیش رو اولین 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 هتروزیگوسیتی واریانت rs73598374، فعالیت کاتالیتیکی را کاهش می‌دهد، درحالی‌که 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 (۱۳) (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 آللی و ژنوتیپی واریانت rs73598374 ژن آدنوزین دامیناز، با بیماری نارسایی قلبی حاد یافت نشد (۷).

محدودیت‌های این مطالعه در هنگام تفسیر نتایجش باید مورد توجه قرار گیرد. آدنوزین با چندین آنزیم از جمله ADA، آدنوزین کیناز و ۵- نوکلئوتیداز 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 آلل 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

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

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, Hendler 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 Jr 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)