

Study of the AGT M235T polymorphism as a potential genetic marker for the development of cardiac complications in hypertensive patients

Dr. Faisal Radwan*
Dr. Haitham yazagi**
Dr. Eyas Alkhayer***
Mais yousif****

(Received 15 / 6 / 2024. Accepted 19 / 8 / 2024)

□ ABSTRACT □

Background: Cardiovascular diseases caused by hypertension constitute a major burden on the health care system around the world, and efforts have recently focused on searching for the genetic factors that cause them. The M235T polymorphism of the angiotensinogen gene (AGT) has received much attention due to its association with hypertension and cardiac damage in many countries. Therefore, we aimed in this study to investigate the prevalence and importance of this polymorphism in the development of heart disease in a segment of Syrian hypertensive patients.

Materials and methods: This study included 40 participants of both sexes (25 of hypertensive patients with a cardiac complications and 15 healthy controls). Data were collected and the safety of the participants' cardiovascular system was examined. DNA was extracted from blood samples using the column method. The genotyping of AGT M235T polymorphism based on PCR-RFLP. STATA was used for the statistical study.

Results: After amplifying the required sequence of the AGT gene using PCR technology, we obtained a single fragment with a length of 98 bp, and after digestion using the restriction enzyme BstFNI (RFLP technology), the genotypes of the AGT M235T polymorphism were distinguished based on the length of the fragments formed as follows: MM (98 bp) , TT (77 bp), MT (98 bp and 77 bp), and the frequencies of the genotypes (TT, MT, MM) were respectively in the patient group (56%, 32%, 12%), and in the controls group (20%, 13.33%, 66.6%), and the frequency of the TT genotype in patients was five times higher than in controls, with significant statistical significance, and the frequency of the T allele in the patient group was higher than in the controls.

Conclusion: The presence of the M235T polymorphism was associated with cardiac complications in patients with hypertension, and the TT genotype was the most frequent in these patients, and it can be considered as a potential genetic marker for the development of cardiovascular diseases in them.

Keywords: M235T polymorphism - angiotensinogen – genotype - hypertension - cardiac complications.



Copyright :Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* Assistant Professor -Faculty of Human Medicine -Tishreen University-Lattakia -Syria

**Professor -Faculty of Human Medicine -Tishreen University -Lattakia -Syria

*** Assistant Professor- Faculty of Human Medicine -Tishreen University-Lattakia -Syria

**** PhD student, -Faculty of Human Medicine -Tishreen University -Lattakia -Syria

دراسة التعدد الشكلي AGT M235T كعلامة وراثية محتملة لتطور الاختلالات القلبية عند مرضى ارتفاع الضغط

د. فيصل رضوان *

د. هيثم يازجي **

د. إياس الخير ***

ميس يوسف ****

(تاريخ الإيداع 15 / 6 / 2024. قبل للنشر في 19 / 8 / 2024)

□ ملخص □

الخلفية: تشكل الأمراض القلبية الوعائية الناجمة عن ارتفاع ضغط الدم عبئاً كبيراً على منظومة الرعاية الصحية في جميع أنحاء العالم، وقد تم تركيز الجهود مؤخراً على البحث عن العوامل الجينية المسببة لها. حظي التعدد الشكلي M235T لجين الأنجيوتنسينوجين AGT على الكثير من الاهتمام نظراً لارتباطه بارتفاع الضغط والأذية القلبية في العديد من البلدان، لذا هدفتنا في هذه الدراسة للتحري عن انتشار وأهمية هذا التعدد الشكلي في تطور الأمراض القلبية لدى شريحة من مرضى ارتفاع الضغط السوريين.

المواد والطرق: شملت الدراسة 40 مشاركاً من الجنسين (25 ممن لديهم ارتفاع الضغط مع أحد الاختلالات القلبية و15 من الشواهد الأصحاء)، تم جمع البيانات وفحص سلامة الجهاز القلبي الوعائي للمشاركين، وأجري استخلاص الحمض النووي من عينات الدم باستخدام طريقة الأعمدة، اعتمد التتميط الجيني للتعدد الشكلي AGT M235T على تقنية PCR-RFLP، واستخدم برنامج STATA لإجراء الدراسة الإحصائية.

النتائج: بعد تضخيم التسلسل المطلوب من جين AGT باستخدام (تقانة PCR) حصلنا على شذفة وحيدة بطول bp98، وبعد الهضم باستخدام انزيم التقييد BstFNI (تقانة RFLP) تم تمييز الأنماط الجينية للتعدد الشكلي AGT M235T اعتماداً على طول الشدافات المتشكلة كالتالي: MM (98 bp)، TT (77 bp)، MT (98 bp و 77 bp)، وعند مجموعة الشواهد (20%، 13.33%، 66.6%)، وكان تواتر النمط الجيني TT عند المرضى أعلى بخمس مرات منه عند الشواهد مع دلالة إحصائية هامة، كما كان تواتر الأليل T عند مجموعة المرضى أعلى من مجموعة الشواهد.

الخلاصة: ارتبط تواجد التعدد الشكلي M235T مع الاختلالات القلبية عند مرضى ارتفاع الضغط، وكان النمط الجيني TT الأكثر تواتراً لدى هؤلاء المرضى، ويمكن اعتباره كعلامة وراثية محتملة لتطور الأمراض القلبية الوعائية لديهم.

الكلمات المفتاحية: التعدد الشكلي M235T - الأنجيوتنسينوجين - التتميط الجيني - ارتفاع التوتر الشرياني - الاختلالات القلبية.

حقوق النشر: مجلة جامعة تشرين - سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04



* أستاذ مساعد - كلية الطب البشري - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية

** أستاذ - كلية الطب البشري - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية

*** مدرس - كلية الطب البشري - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية

**** طالبة دكتوراه - كلية الطب البشري - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية mais.yousif55@tishreen.edu

مقدمة:

شهدت السنوات الأخيرة تطوراً كبيراً في تقنيات الطب الجزيئي والهندسة الوراثية التي استخدمت لتحسين العلاج والسيطرة على الأمراض السريرية، كما تم استكمال مشروع المجين البشري The Human Genome Project الذي اعتبر أحد أهم وأعظم الإنجازات العلمية خلال القرن الواحد والعشرين، وشكل هذا الاكتشاف بوابة العبور إلى عصر جديد من البيولوجيا الرقمية عالية الإنتاجية [1].

يعتبر ارتفاع ضغط الدم Hypertension (HTN) وباءً عالمياً لا تزال أبعاده مجهولة، ووفقاً لأحدث إحصائيات منظمة الصحة العالمية لعام 2021 يقدر أن 1.28 مليار بالغ في جميع أنحاء العالم مصابون بـ HTN، وتشير الدراسات الوبائية إلى أن معدل الانتشار في تزايد مستمر، ولا سيما في البلدان ذات الدخل المتوسط والمنخفض كمنطقة الشرق الأوسط وشمال أفريقيا، حيث تعاني البلدان من فجوة في الوضع الاقتصادي ومشاكل أخرى مثل اللاجئين والحرب. لقد شكلت هذه القضايا تحديات خطيرة للقدرة على إدارة الأمراض المزمنة خاصة في هذه البلدان، ومن المتوقع أن يبلغ عدد المصابين ما يقارب 1.5 مليار بحلول عام 2025 [2].

تأتي خطورة (HTN) من كونه المسبب الأول والرئيسي للأمراض القلبية الوعائية cardiovascular diseases (CVDs) والحوادث المميتة الناجمة عنها بمختلف أشكالها بما في ذلك: (أمراض الشرايين الاكليلية، احتشاء القلب، قصور القلب، تضخم البطين الأيسر، أمراض القلب الدسامية، اللانظميات القلبية بما في ذلك الرجفان الأذيني، بالإضافة إلى الحوادث الوعائية الدماغية الاقفارية والنزفية، أمراض الشرايين المحيطية، الموت المفاجئ ومرض الكلى في مراحله النهائية)، وقد تم اثبات هذا الارتباط من خلال دراسات أجريت على مجموعات عمرية وعرقية مختلفة [2، 3]، حيث تتطور هذه الاختلالات عند المرضى على الرغم من تلقيهم العلاج، مما قد يشير إلى فشل خافضات الضغط المستخدمة في تأمين الضبط المثالي لضغط الدم، لربما يعود ذلك إلى المتغيرات الجينية في الجينوم البشري، ويشكل أساسي التعددات الشكلية أحادية النكليوتيد Single nucleotid polymorphisms (SNPs)، والتي قد تحدث في الجينات المشفرة لمكونات الأنظمة التي تتحكم في ضغط الدم مثل نظام الرينين أنجيوتنسين ألدوستيرون RAAS، نظام الصوديوم، نظام النور أدرينالين وغيرها، وذلك باعتبار أن العامل الوراثي يلعب دوراً كبيراً فيما يزيد عن 25-60% من حالات HTN [4]، ويتجلى ذلك من خلال زيادة احتمال الإصابة به في حال وجود قصة عائلية لدى أحد أو كلا الوالدين [5].

بعد دراسة الأساس الجيني لـ HTN باستخدام تقانات الهندسة الوراثية، تبين وجود ما يزيد عن 30 جيناً من الجينات المرشحة المعروفة سابقاً وتلك المرشحة الجديدة التي تساهم في زيادة القابلية للإصابة بارتفاع ضغط الدم، حيث كشفت دراسات الارتباط على مستوى الجينوم (GWAS) عن وجود أكثر من 1,477 من (SNPs) الشائعة، التي تؤدي إلى اختلاف النمط الظاهري لضغط الدم، وتؤهب للإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية [6].

من بين الجينات المتهمه بالتسبب بارتفاع ضغط الدم والأذيات القلبية الوعائية المرتبطة به، حظيت تلك التي تشفر مكونات نظام الرينين أنجيوتنسين ألدوستيرون RAAS على الإهتمام الأكبر، وهذا يعود إلى تورطه على نطاق واسع في الآلية المرضية، وكذلك إلى حقيقة أن مكوناته تلعب دوراً أساسياً في تنظيم توازن الأوعية الدموية، بالإضافة إلى الدور الذي تلعبه مثبطات الإنزيم المحول للأنجيوتنسين وحاصرات مستقبلات الأنجيوتنسين في الإدارة العلاجية لارتفاع ضغط الدم [7].

تساهم التعددات الشكلية الحاصلة في جين الأنجيوتنسينوجين AGT في التسبب بارتفاع ضغط الدم واختلاطاته القلبية عبر عدة آليات [8]، وقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن الطفرات المغلوطة missense mutations التي تحدث في منطقة الاكسون 2 هي الأكثر أهمية فيزيولوجية، ومن أكثرها شيوعاً التعدد الشكلي M235T [9].

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث:

يلعب العامل الوراثي دوراً رئيسياً في قابلية الإصابة بـ HTN وتطور اختلاطاته القلبية الخطيرة التي تعتبر المسبب الرئيسي للوفيات على مستوى العالم، وتمثل عبئاً عالمياً كبيراً على منظومة الرعاية الصحية، حيث تتسبب بأكثر من 10 ملايين حالة وفاة و218 مليون حالة حياة معدلة بسبب الإعاقة [2]. يعتبر جين AGT من أهم الجينات المنظمة لضغط الدم، وقد ارتبطت تعدداته الشكلية وبشكل أساسي M235T مع حدوث اضطراب في ضغط الدم والجهاز القلبي الوعائي في العديد من الدراسات.

لا توجد دراسة في سوريا حول انتشار الشكل المورثي AGT M235T عند مرضى ارتفاع ضغط الدم وعلاقته مع الاختلاطات القلبية لديهم، تعتبر هذه الدراسة الأولى من نوعها والتي قد تساهم مستقبلاً في التوجه إلى العلاج الدوائي المناسب الذي يساهم في تأمين الضبط المثالي لضغط الدم ووقاية المريض من الحوادث القلبية الوعائية.

هدف البحث:

الكشف عن التعدد الشكلي AGT M235T وإمكانية اعتباره كعلامة وراثية محتملة لتطور الاختلاطات القلبية عند مرضى ارتفاع الضغط في مدينة اللاذقية.

طرائق البحث ومواده

مجموعة الدراسة:

شملت مجموعة الدراسة 40 مشاركاً (25 من المرضى المقبولين في وحدة العناية المشددة القلبية وقسم الداخلية القلبية في مشفى تشرين الجامعي في اللاذقية، و15 من الشواهد الأصحاء المراجعين للعيادة القلبية)، وذلك خلال الفترة الممتدة بين شهري أيار وكانون الأول من العام 2023.

شملت معايير الاشتمال مجموعة المرضى الذين شخّصت إصابتهم بارتفاع ضغط الدم الأساسي أو ممن تلقوا مسبقاً علاجاً بخافضات الضغط مع وجود واحد أو أكثر من الاختلاطات القلبية التالية (ضخامة جدران البطين الأيسر، قصور القلب، رجفان أذيني، احتشاء قلب، مرض الشرايين الكليلية).

أما معايير الاستبعاد فكانت (الإصابة بأمراض القلب والدسامات الخلقية، الروماتيزم، الأورام، الأسباب الثانوية لارتفاع ضغط الدم، الانتان، الحمل، الداء السكري، عدم الحصول على الموافقة المستنيرة، الأورام، اللانظميات القلبية الأخرى غير الرجفان الأذيني، أمراض الكبد، الصدمات النفسية خلال الأسبوعين السابقين).

أما مجموعة الشواهد فقد تضمنت مجموعة من الأفراد الأصحاء الذين أثبت الفحص السريري سلامة الجهاز القلبي الوعائي لديهم، مع التأكيد على عدم وجود قصة عائلية لارتفاع الضغط أو إصابة سابقة بالأمراض القلبية وعائية.

البيانات والفحوصات السريرية:

بعد جمع البيانات الديموغرافية من جميع المرضى والشواهد الأصحاء كالعمر والجنس والتدخين وغيرها، تم قياس الوزن والطول وذلك لحساب مؤشر كتلة الجسم باستخدام المعادلة التالية: مؤشر كتلة الجسم = BMI (الوزن (كغ)/مربع الطول (م²)).

تم تشخيص الإصابة بارتفاع الضغط بناء على توصيات الجمعية الأوروبية لارتفاع ضغط الدم عام 2018 (ESC/ESH Guidelines)، وذلك إذا كانت قيم الضغط الانقباضي أكبر من 140 مم زئبقي، و/ أو الانبساطي أكبر من 90 مم زئبقي [10]، بعد استبعاد الأسباب الثانوية لارتفاع الضغط.

أما فيما يخص الاختلالات القلبية فقد شخصت من قبل طبيب القلبية اعتماداً على النتائج السريرية حيث تم تقييم ضخامة البطين الأيسر left ventricular hypertrophy (LVH) عبر إيكو القلب بإجراء قياسات لسماكة الجدران وحساب مؤشر ضخامة البطين LVH index (LVHI) [11]، وجرى أيضاً تقييم قصور القلب من خلال تخطيط الصدى، أما الرجفان الأذيني فقد تم تشخيصه من خلال ECG بعد نفي اضطرابات نظم القلب الأخرى.

وقمنا بانتقاء المرضى المصابين باحتشاء القلب ومرض القلب التاجي (CAD) Coronary artery disease من المقبولين في قسم العناية المشددة ممن عانو من أعراض سريرية وتخطيطية تشير لنقص التروية القلبية، حيث تم تأكيد وجود احتشاء القلب من خلال التحاليل المخبرية و ECG، أما الإصابة بـ CAD حددت من خلال وجود تضيق بنسبة 70 % في واحد على الأقل من الشرايين التاجية الرئيسية للقلب بعد إجراء تصوير الأوعية الغازية (القطرة القلبية) و حقن المادة الظليلة [12].

الاعتيان ومكان العمل:

استخدمت المحاقن المعقمة للحصول على 1.5-3 مل من الدم الوريدي من كل مشارك في الدراسة وذلك ضمن الوحدة أو القسم المعني، حيث تم وضع الدم في أنابيب حاوية على EDTA وإرساله إلى المخبر المركزي ضمن مشفى تشرين الجامعي في اللاذقية، وذلك بعد أخذ الموافقة المستنيرة المكتوبة من قبل جميع المشاركين.

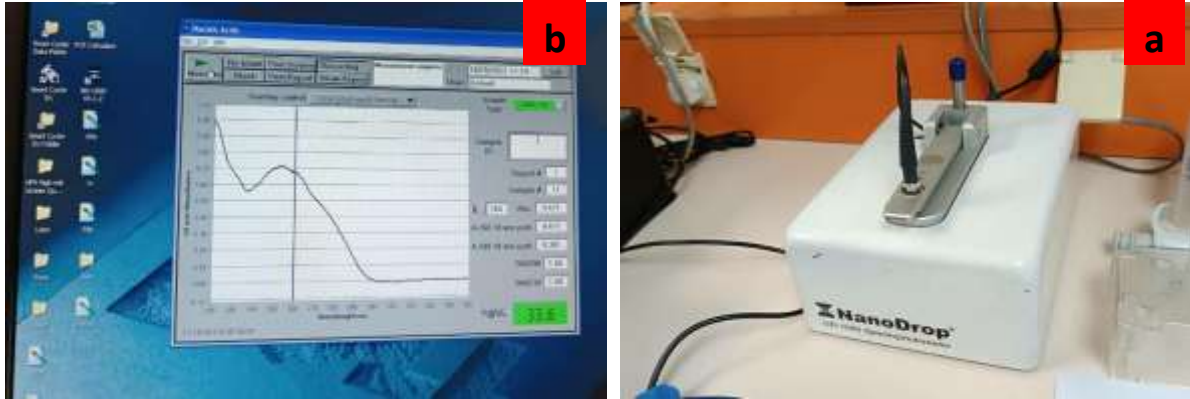
جرى حفظ العينات بدرجة حرارة 2-8 درجة مئوية إلى صباح اليوم التالي على الأكثر، حيث تم نقلها ضمن حاوية مبردة إلى مشفى الأسد الجامعي في دمشق، ليتم بعدها إجراء جميع مراحل استخلاص الحمض النووي، وتفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)، وتعدد أشكال أطوال شدة الاقتران (RFLP)، وذلك في وحدة البيولوجيا الجزيئية ضمن المخبر المركزي لمشفى الأسد الجامعي في دمشق.

استخلاص الحمض النووي الجينومي:

تم استخلاص DNA من 200 ميكروليتر من الدم الكامل بطريقة أعمدة الكروماتوغرافيا عالية الألفة، التي تحتوي على أغشية ترشيح معالجة ومصممة ترتبط بفعالية وألفة عالية مع DNA بوجود الأملاح بتركيز عال، وذلك باستخدام كيت GF-1, Blood DNA Extraction kit, Vivantis Malaysia، وأجريت كافة الخطوات بواسطة بروتوكول خاص وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة، مع اتباع شروط التخزين المناسبة للكواشف، بعد الانتهاء من عملية الاستخلاص قمنا بالاحتفاظ بـ Template DNA بالدرجة -20° م إلى حين الاستخدام.

قياس تركيز ونقاوة عينات الحمض النووي المستخلص:

جرى ذلك باستخدام مقياس الطيف الضوئي Nanodrop ND-1000 spectrophotometer الموضح بالشكل (1)، بالاعتماد على قياس الامتصاصية الضوئية لنواتج الاستخلاص عند الأطوال الموجية 260 و 280 نانومتر، حيث تراوحت النقاوة بين 1.7 و 2، بينما كانت تراكيز الحمض النووي للعينات بين 25 و 120 نانوغرام / ميكرو لتر.



الشكل (1): (a) - جهاز Nanodrop المستخدم، (b) - نتيجة تركيز ونقاوة إحدى عينات DNA المستخلص (التركيز 33 نغ/ميكرو لتر، النقاوة 1.86).

الكشف عن التعدد الشكلي AGT M235T باستخدام تقانة تفاعل سلسلة بوليميراز الدنا متعدد أشكال طول شدف الأقطاع polymerase Reaction chain-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP):

تصميم البادئات (المشارع):

تم تصميم البادئات في شركة ماكروجين Macrogen (كوريا الجنوبية)، وذلك وفق التسلسل التالي: المشرع الأمامي (Forward primer): 5'-AGA ACT GGA TGT TGC TGC TG-3'، المشرع العكسي (Reverse Primer): 3'-TGC TGT CCA CAC TGG CTC GC-5'، حيث قمنا باختيار تسلسل البادئات الذي استخدمه تشينغ Cheng وزملاؤه في دراستهم [13]، وجرى التحقق من خواصها ونوعيتها وخواصها باستخدام برامج Primer3.

تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR:

أجري تفاعل PCR باستخدام جهاز الدوار الحراري Eppendorf Nexus GSX1 thermocycler، والبادئات التي اختيرت سابقاً، بالإضافة إلى العتيدة 2X ViRed Taq Master Mix من شركة Vivantis الماليزية. كما يوضح الشكل (2).

اعتمدنا في دراستنا على Gradient PCR، وتم ذلك باستخدام شروط مختلفة للدوار الحراري من حيث درجات الحرارة والمدة الزمنية، وكذلك تجربة استخدام تراكيز مختلفة من كل من البادئات وقالب الدنا ومحاولة تعزيز التفاعل من خلال بعض الإضافات مثل كلور المغنيزيوم، إلى أن وصلنا إلى الشروط المثلى للتفاعل وهي:

شروط الدوار الحراري: التسخن الأولي (الحرارة 94 °C، المدة 2 دقيقة)، التسخن (94 °C، 30 ثانية، 30 دورة)، التلدين (60 °C، 30 ثانية، 30 دورة)، الاطالة (72 °C، 30 ثانية، 30 دورة)، الاطالة النهائية (72 °C، 5

دقائق). أما تراكيز الكواشف فكانت؛ المزيج الرئيسي *mastr mix* (الحاوي على 0.4 Mm من $dNTPs$ و 3 Mm من المغنيزيوم و 0.4 وحدة من انزيم *Taq DNA polymerase*)، المشرع الامامي (بتركيز 21 بيكومول)، المشرع العكسي (بتركيز 21 بيكومول)، قالب الحمض النووي *Template DNA* (بتركيز 50 نانوغرام/ميكروليتر)، وكان حجم مزيج التفاعل النهائي *final reaction volume* (20 ميكروليتر)، بتطبيق الشروط السابقة حصلنا على منتج التضخيم المطلوب.



الشكل (2): (a) - العتيدة *2X ViRed Taq Master Mix* و المشرعين الأمامي **1** والعكسي **2** ،
(b) - جهاز الدوار الحراري *Eppendorf Nexus GSX1 thermocycler*.

الرحلان الكهربائي على هلام الآغروز لنواتج PCR:

لإظهار منتج تضخيم PCR قمنا بالترجيل على هلام الآغروز 1.5% باستخدام جهاز رحلان كهربائي على الهلام *Agarose Gel Electrophoresis (AGE)* ، بوجود (الدائرة 0.5 X TBE)، سلم قياس الدنا 100 bp DNA ladder، بروميد الايثيديوم).

جرى حقن سلم قياس الدنا في البئر الأول، وحقنت العينات في الآبار التالية بترتيب معلوم، حيث استخدام 2 ميكروليتر من ناتج تفاعل PCR الحاوي مسبقاً على صباغ التحميل، ومزجت بشكل جيد ثم حقنت في الآبار، وتم إجراء الترحيل الكهربائي على الهلام باستخدام نظام AGE الأفقي وذلك باستطاعة 120 فولط ولمدة 35 دقيقة، أجري بعد ذلك تصوير الهلام عبر وضعها في حجرة الأشعة فوق البنفسجية UV لإظهار العصابات.



الشكل (3): (a) - هلام الآغروز بعد تعبئة العينات في الآبار وبدء الترحيل ، (b) - حجرة UV المستخدمة لإظهار العصابات، (c) - برنامج تصوير الهلام على الكمبيوتر يظهر العصابات المتشكلة

هضم DNA المضخم باستخدام انزيم الاقتطاع (التقييد) Restriction enzyme:

تم اختيار انزيم التقييد المناسب BstFN I (FnuD II) لشركة Vivantis الماليزية، والذي يقوم بقطع الحمض النووي عند التسلسل التالي المحدد بالشكل (4).



الشكل (4): موقع الاقتطاع restriction site الذي يميزه انزيم BstFN I

كانت التراكيز المستخدمة لتحضير المزيج اللازم لعملية الهضم لكل تفاعل كالتالي: 2.5 ميكروليتر من ناتج تضخيم PCR، 0.5 وحدة دولية من إنزيم BstFN I، 1 ميكروليتر من الوعاء الخاص بالانزيم Buffer V5، وذلك وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة للإنزيم، مع الحرص على بقاء كل من ناتج التضخيم والانزيم على الحامل المبرد. أضيفت المكونات السابقة لبعضها ضمن أنبوب ابيندورف ومزجت بواسطة الممص بلطف ثم ثقلت لعدة ثواني وذلك لجمع المكونات عن أطراف الأنبوب، قمنا بعدها بحضن الأنبوب في الحاضنة بالدرجة 37 °م طوال الليل over night إلى صباح اليوم التالي حيث أجري الكشف عن نواتج الهضم.



الشكل (5): (a) - أنزيم التقييد BstFN I و الوعاء Buffer V5، (b) - الحاضنة بعد ضبطها على الحرارة 37 °م

الرحلان الكهربائي لنواتج الهضم:

تم إجراء الرحلان بنفس الطريقة المذكورة مسبقاً ولكن باستخدام هلامة الآغاروز ذات التركيز 4% بدلاً من 1.5 %، جرى بعدها إظهار العصابات بوضع الهلامة في حجرة الاظهار بواسطة الأشعة فوق البنفسجية ثم تصويرها.

الدراسة الاحصائية:

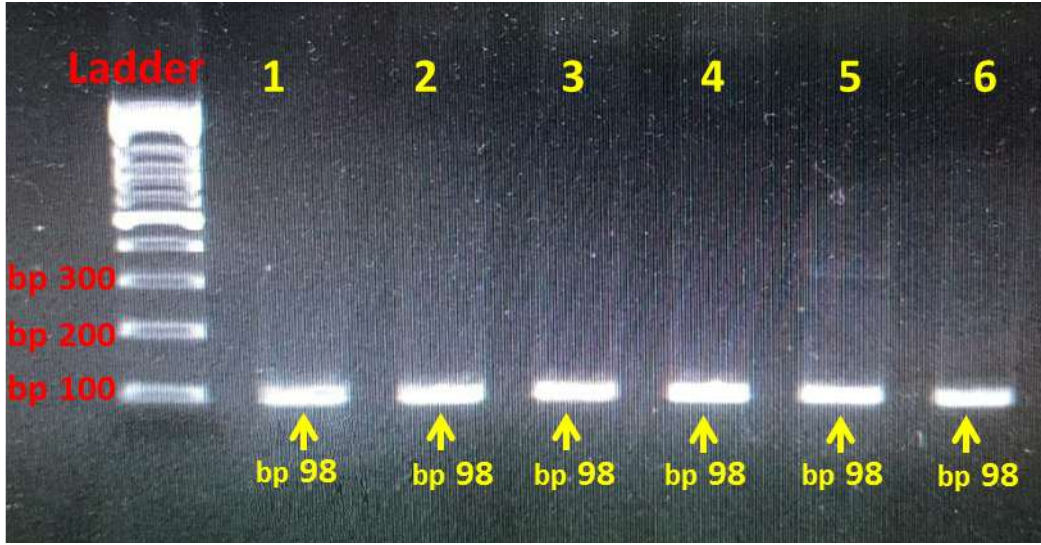
أجري التحليل الاحصائي باستخدام برنامج STATA، تم استخدام المتوسط والانحراف المعياري لتلخيص البيانات الكمية، وتم تطبيق t-test للقيم المستقلة لاختبار الفروق الاحصائية بين حالات المرضى والشواهد، و استخدام اختبار كاي مربع Chi-square لتحديد درجة الأهمية للاختلافات في الأنماط الجينية وتواتر الأليلات بين المجموعتين، تم تحديد الأهمية السريرية على أنها p-value أقل من 0.05.

النتائج والمناقشة

النتائج:

نتائج تفاعل تضخيم جين الأنجيوتنسينوجين باستخدام PCR:

عند تطبيق الشروط المتبعة في تجربة Cheng et al [13] لتضخيم التسلسل ذاته من الجين المعني باستخدام التسلسل نفسه من البادئات، لم نحصل على الأمبليكون بالشكل المطلوب، حيث قمنا بتعديل الظروف والوصول إلى الشروط المثلى التي ذكرت سابقاً، والتي حصلنا بنتيجتها على شذفة وحيدة واضحة من الدنا بطول 98 bp، كما هو موضح في الشكل (6)



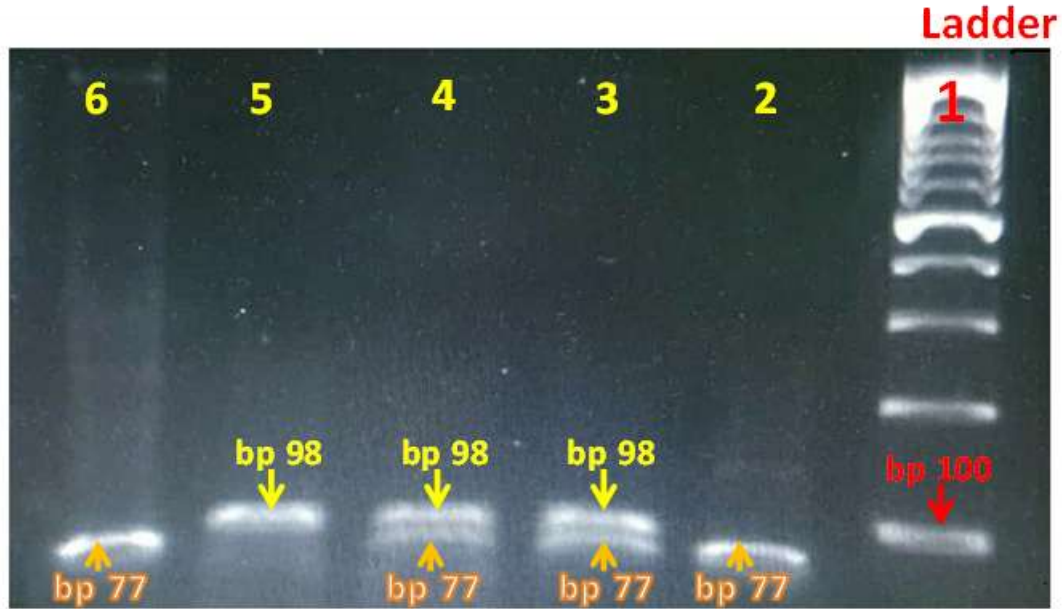
الشكل (6): ناتج تفاعل PCR على هلامه الآغاروز لتضخيم الشذفة المطلوبة من جين الأنجيوتنسينوجين. يظهر DNA ladder (bp100) في البئر الأول واصماً شاهداً لقياس طول شذف الدنا، بينما تمثل بقية الآبار (من 2 إلى 7) نواتج تفاعل PCR والتي يبلغ طول كل منها 98 bp حيث يشار لها بالأسهم الصفراء.

نواتج تفاعل الهضم باستخدام انزيم BstFN I:

يؤدي وجود التعدد الشكلي AGT M235T إلى خلق موقع قطع للأنزيم BstFN I و نكون هنا أمام 3 حالات: الحالة الأولى هي حالة تماثل الزيجوت مع وجود الطفرة وخلق موقع التقييد في كلا الأليلين الأبويين حيث يحصل القطع مؤدياً لإعطاء شذفتين إحداهما بطول 77 bp والثانية بطول 21 bp ونكون هنا أمام النمط الجيني TT، أما الحالة الثانية فهي تماثل الزيجوت مع غياب الطفرة و غياب موقع التقييد حيث لا يحصل القطع ونحصل هنا على عصابة واحدة بطول 98 bp ونكون أمام النمط MM، أما الحالة الثالثة فهي تخالف الزيجوت الناجم عن وجود الطفرة وموقع التقييد في أحد الأليلين الأبويين وغيابها من الآخر لنحصل على 3 شذف ذات أطول مختلفة هي (98، 77، 21) bp وتمثل هذه الحالة النمط الجيني MT.

إن الفرق بين أطول شذف الاقتران الناتجة (98 و 77) قليل ولايتجاوز 21 bp حيث قد تتوضع الشذف السابقة ملاصقة لبعضها معطية عصابة واحدة، مما دفعنا لزيادة مدة الترحيل لضمان فصلها عن بعضها، وذلك أدى إلى عدم وضوح الشذفة 21، ولذا تم تجاهلها واعتمدنا في تقييم الأنماط الجينية على العصابتين 98 bp و 77 bp، حيث

يدل تواجدهما معاً على أن النمط MT، ويشير وجود عصابة وحيدة بطول 98 bp على أن النمط MM، أما العصابة الوحيدة ذات الطول 77 bp فهي تشير إلى النمط TT. يظهر الشكل (7) مختلف الأنماط الجينية الناتجة على هلام الأغاروز.



الشكل (7): العصابات الناجمة عن استخدام انزيم القطع BstFNI.

يظهر الشكل شدة الاقتطاع مفصولة باستخدام AGE، يظهر البئر (1) سلم قياس الدنا (100 bp ladder) كواصم شاهد لقياس طول شدة الـ DNA، تمثل الأبار 2 و 6 النمط الجيني TT متمائل الزيجوت حيث تظهر عصابة واحدة بطول 77 bp، وتمثل الأبار 3 و 4 النمط الجيني MT متخالف الزيجوت حيث تظهر عصابتان إحداهما بطول 77 bp والأخرى بطول 98 bp، أما البئر رقم 5 فهو يمثل النمط MM متمائل الزيجوت والذي تظهر فيه عصابة واحدة بطول 98 bp.

مقارنة الخصائص الديموغرافية بين مجموعتي الدراسة:

شملت مجموعة المرضى 25 فرداً، 59% منهم من الذكور و 41% من الإناث، وكان توزع الجنس متقارباً مع مجموعة الشواهد الأصحاء والتي بلغ عددها 15 مشاركاً، حيث كانت نسبة الذكور 62% ونسبة الإناث 38%. بلغ متوسط العمر 10.29 ± 57.32 لدى مجموعة المرضى و 12.2 ± 56.2 في مجموعة الشواهد. كان كل من مؤشر كتلة الجسم BMI وقيم الضغط الانقباضي أعلى عند مجموعة المرضى مقارنة بمجموعة الشواهد واعتبرت القيمة هامة إحصائياً، في حين لم تكن فروقات الضغط الانبساطي ذات دلالة إحصائية، كما يتضح من الجدول (1).

الجدول رقم (1): مقارنة الخصائص الديموغرافية بين مجموعتي المرضى والشواهد.

المتغير	مجموعة المرضى (n=25)	مجموعة الشواهد (n=15)	P-value
BMI	27	23.23	P = 0.0033
الضغط الانقباضي	140	107.18	P = 0.0002
الضغط الانبساطي	76	73.13	P = 0.5398

يشير الرمز BMI إلى مؤشر كتلة الجسم، تعتبر P-value أقل من 0.05 ذات دلالة إحصائية

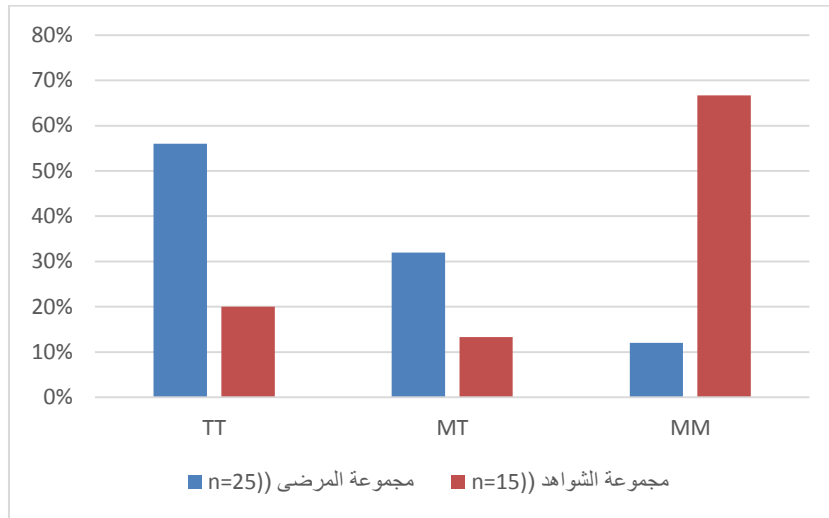
توزيع الأنماط الجينية والأليلات بين مجموعتي المرضى والشواهد:

كانت تواترات الأنماط الجينية TT، MT، و MM لدى مجموعة المرضى 56%، 32%، و 12%، على التوالي، بينما كانت في مجموعة الشواهد 20%، 13.33%، و 66.67%، على التوالي. لوحظ اختلاف هام في تعدد الأشكال الجينية بين المجموعتين، حيث كان النمط الجيني متماثل للواقع TT عند المرضى أعلى بخمس مرات تقريباً منه في مجموعة الشواهد (OR = 5.0909، CI = 1.14-22.62، P = 0.0325)، كما كان تواتر النمط الجيني MT أعلى عند مجموعة المرضى مقارنة بالشواهد، بينما لوحظ أن النمط الجيني MM أعلى عند مجموعة الشواهد. وأظهر تواتر الأليلات تأثيراً هاماً بين المجموعتين، حيث كان وجود الأليل T أعلى بتسع مرات تقريباً في مجموعة المرضى (OR = 9.3333، CI = -5.10-168.47، P = 0.0002) مقارنة بالشواهد الطبيعيين (الجدول 2).

الجدول رقم (2): مقارنة توزيع الأنماط الجينية والأليلات بين مجموعتي المرضى والشواهد.

P-value	OR :CI % 95	مجموعة الشواهد (n=15)	مجموعة المرضى (n=25)	النمط الجيني
P = 0.0325	5.0909	3 (20%)	14 (56%)	TT
P = 0.1999	3.0588	2 (13.33%)	8 (32%)	MT
P = 0.0011	0.0682	10 (66.67%)	3 (12%)	MM
P = 0.0002	9.3333	3 (20%)	22 (88%)	T allele
P = 0.0325	0.1964	12 (80%)	11 (44%)	M allele

ملاحظة: تعتبر P-value > 0.05 ذات دلالة إحصائية



الشكل (8): مخطط ترسمي لتواتر الأنماط الجينية (MM، TT، MT) لدى مجموعتي المرضى والشواهد.

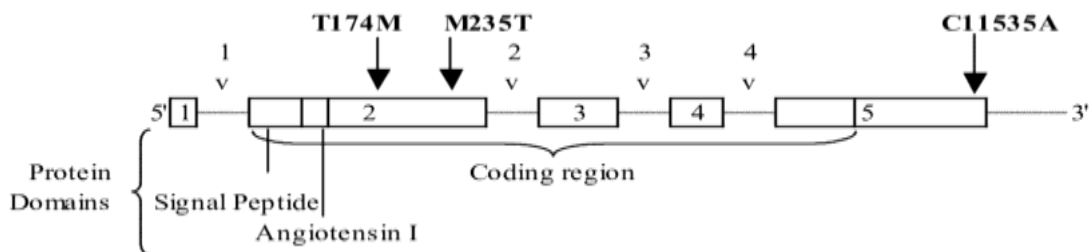
المناقشة:

شكل علم الجينوم الخاص بضغط الدم واحداً من أكبر التحديات في مجال البحث بسبب التباين الكبير في وراثة المرض واختلاف الاستجابة العلاجية والأنماط الظاهرية لدى المرضى، وذلك بعد الاكتشافات المتتالية في عصر الجينوم الواسع، والتي هدفت إلى البحث عن المتغيرات الجينية أحادية النكليوتيد الشائعة المتورطة بـ HTN وأذية الأعضاء الانتهازية المرافقة له ويشكل أساسي الاختلالات القلبية المميّنة [14].

من بين الجينات المتورطة بارتفاع ضغط الدم واختلالاته استحوذ جين الأنجيوتنسينوجين AGT gene على أهمية بالغة، وهو يقع على الذراع الطويل للصبغي الأول (على العصابة 42.3)، ويتألف من خمس إكسونات و أربع انترونات، ويقوم بتشفير مركب الأنجيوتنسينوجين AGT الذي ينتج من الكبد، ويعتبر الطليعة البدئية الفريدة لبدء تفعيل مسار RAAS، حيث يخضع لانقسامات متتالية معطياً العديد من ببتيدات الانجيوتنسين والتي يعتبر الأنجيوتنسين II أبرزها، حيث يقوم هذا المركب بتحفيز التقبض الوعائي و كذلك إنتاج الألدوستيرون من الغدة الكظرية الذي يعمل على إعادة امتصاص الماء والشوارد من الأنبوب البعيد في الكلية وبالتالي زيادة كمية السوائل في الجسم وتؤدي هذه العوامل إلى ارتفاع الضغط، كما يمارس الأنجيوتنسين II تأثيراً مباشراً على عوامل النمو المهمة لتطور الكلية لذلك كان من المتوقع أن وجوده يلعب دور أساسي للتنبؤ بحدوث ارتفاع الضغط عند الأطفال وفي الأعمار الباكرة، كما يرتبط بإعادة تشكيل وأذية القلب [8، 15].

اكتشف لـ جين AGT عدة SNPs تلعب دوراً رئيسياً في التسبب بارتفاع الضغط الشرياني وتمارس العديد من التأثيرات المرضية على الجهاز الكلوي والأوعية الدموية وتأثيرات على مراحل نمو العضلة القلبية [16]، كما لعب وجود هذه الأشكال المورثية دوراً رئيسياً في الاستجابة العلاجية للأدوية الخافضة للضغط وبالتالي احتمال حدوث الأمراض القلبية الوعائية، على سبيل المثال ساهم الاميلويدبين بالضبط المثالي للضغط وانخفاض نسبة الإصابة القلبية التاجية عند الأمريكيين من أصل افريقي المصابين بـ HTN والحاملين للأليل rs1122576 لـ جين AGT بينما فشلت المدرات ومثبطات ACE بذلك [17].

اعتبر التعدد الشكلي M235T من أهم المتغيرات الجينية لـ جين AGT، و الذي يرمز له أيضاً بـ T704C أو rs699، وهو ينجم عن استبدال النكليوتيد T في الموضع 704 من الاكسون الثاني بواسطة النكليوتيد C، يؤدي هذا بدوره إلى استبدال الحمض الأميني الميثيونين M في الموضع 235 بالحمض البديل له وهو الثريونين T [18]، ينجم عن هذا التغيير استبدال الأليل M235 البري wild allele بالأليل T253 الطافر mutant allele، والذي قد يحدث لدى أحد أو كلا الأليلين الأبويين [16].

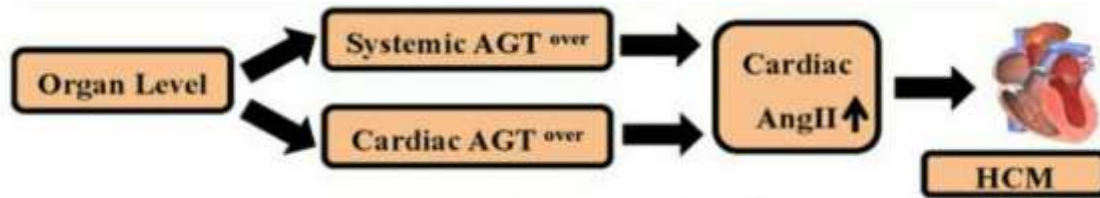


الشكل (1) المتغيرات الجينية الشائعة لـ جين مولد الانجيوتنسين AGT

في دراستنا، كان تواتر الأنماط الجينية الطافرة MT و TT أعلى عند مرضى ارتفاع الضغط المصابين بالاختلالات القلبية مقارنة بالشواهد الاصحاء، حيث ارتبط تواجد الأليل T مع حدوث هذه الاختلالات، وتعزى هذه العلاقة إلى تأثيرات التعدد الشكلي M235T، الذي يؤدي إلى زيادة إنتاج عوامل النسخ وزيادة في التعبير الجيني لـ جين AGT مسبباً ارتفاع المستويات البلازمية لبروتين الأنجيوتنسينوجين AGT ، وزيادة إنتاجه الكبدي والمحلي ضمن خلايا عضلة القلب، والذي يمارس تأثيرات سلبية على القلب [19].

يتم تحديد توزع التخليق الحيوي لـ AGT بشكل أساسي بواسطة الحمض الريبي النووي المرسل (mRNA) الخاص به، لأنه AGT يمكن إفرازه في الحيز خارج الخلوي [20]، حتى الآن لا يزال مصدر AGT مثيراً للجدل، واعتبر الكبد المصدر الرئيسي له، إلا أن العديد من الدراسات أشارت إلى إمكانية اصطناعه محلياً داخل أنسجة القلب، حيث تم قياس AGT mRNA في المزارع الخلوية للخلايا العضلية القلبية الوليدية والأرومات الليفية للفئران، ولوحظ أن كلا النوعين من الخلايا لديه القدرة على إنتاج AGT [21]، كما لوحظ وجود AGT mRNA في العضلة الأذينية وعضلات نظام التوصيل وجدار البطين الأيسر في أنسجة القلب البشري، وكان التعبير عنه أكثر بروزاً في العضلات تحت الشغاف منه في العضلات الوسطى أو النخابية [22]، كما تم اكتشافه في القلوب المريضة لدى المصابين باحتشاء القلب واعتلال القلب الضخامي، مما يشير إلى أن AGT منتشر على نطاق واسع داخل القلب كله [23].

يمكن أن يؤدي فرط التعبير الجهازي أو القلبي عن AGT إلى حدوث تفعيل مزمن لـ RAAS، والذي ينجم عنه زيادة مستويات الانجيوتنسين 2 القلبي، والذي بدوره يعزز من تضخم عضلة القلب من خلال زيادة نمو الخلايا العضلية وزيادة ثخانة الجدار العضلي للبطين الأيسر ونقص استيعابه للدم [19].



الشكل () : تأثير AGT الجهازي أو القلبي على عضلة القلب
(AGT): مولد الأنجيوتنسين ، (Ang II): أنجيوتنسين 2، (HCM): تضخم عضلة القلب

يؤدي التفعيل المزمن طويل الأمد لـ RAAS الناجم عن وجود AGT M235T إلى إجهاد عضلة القلب، وزيادة تكاثر الأرومات الليفية فيها عن طريق تحفيز مستقبلات الانجيوتنسين AT2، وينجم عن ذلك فقدانها لمرونتها ووظيفتها مع مرور الوقت، مما يؤدي لقصور في عملها وحدث المضاعفات كالرجفان الأذيني والسكتات القلبية والموت المفاجئ، كما تؤدي زيادة مستويات الانجيوتنسين 2 إلى حدوث موت الخلايا المبرمج في الأوعية وتعزيز الاحتفاظ بالبروتين الدهني منخفض الكثافة LDL بالشرابين التاجية وأكسدته وتشكل الخلايا الرغوية وتطور المرض القلبي الوعائي وتصلب الشرايين [9, 6]. وهذا يفسر ارتباط وجود الأليل T بشدة مع مرض القلب التاجي والاختلالات القلبية الأخرى في دراستنا.

أجريت العديد من الدراسات للتحرري عن المتغير الجيني AGT M255T وعلاقته بالاختلالات القلبية، وتوافقت العديد منها مع نتائج دراستنا مع اختلاف الطريقة المتبعة للكشف عن الطفرة. في الدراسة التي قام بإجرائها Tran وزملاؤه

عام 2021 حول علاقة AGT M235T مع ضخامة البطين الأيسر عند المرضى الفيتامينيين المصابين بارتفاع الضغط، استخدمت طريقة tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain (ARMS-PCR) للكشف عن الطفرة، وكان منتج PCR بطول 282 bp، حيث تم تحديد وجود الأليل T و M بناء بظهور العصابات 204 و 118 bp، ارتبط النمط المورثي TT مع مؤشر كتلة البطين الأيسر أكثر من النمط MT [24]، وفي الدراسة الرومانية التي قام بإجرائها الباحث Mocan للتحري عن علاقة RAAS SNPs مع الاستجابة المورفولوجية القلبية التكيفية عند مرضى ارتفاع الضغط، كانت الطريقة المستخدمة للكشف عن التعدد الشكلي M235T هي PCR-RFLP، وتم الحصول على منتج جيني بطول 165 pb، أما انزيم التقييد المستخدم فهو TthI III، وتم تحديد وجود الأليل M235 بظهور الشدفة 165 bp، والأليل T235 بظهور الشدفتين بطول 141 و 24 bp، في هذه الدراسة ارتبط الأليل T للتعدد الشكلي AGT M235T مع خلل وظيفة البطين الأيسر، و كان لدى الأشخاص ذوي النمط الجيني TT و MT زيادة بمقدار 2.24 ضعف في خطر الإصابة بضعف الوظيفة الانبساطية والاسترخاء غير الطبيعي للبطين الأيسر [11].

في الدراسة البحثية التي أجريت من قبل Hongyan وزملاؤه عام 2020 والتي شملت 29 مقالة تم جمعها من خلال قواعد بيانات عدة مثل pubmed و Web of science و EMBASE وغيرها، وذلك للتحري عن علاقة التعددات الشكلية في جين AGT و الليياز البطني EL مع مرض القلب التاجي، ووتوصلت الدراسة إلى أن الأليل T والنمط TT للتعدد الشكلي AGT M235T تعتبر عامل خطورة لتطوير CAD عند السكان الصينيين وذوي الأصل القوقازي [18]. ارتبط المتغير الجيني AGT M235T مع اعتلال القلب الضخامي HCM لدى السكان الآسيويين في دراسة Zhen وزملاؤه، حيث تم جمع الأدبيات من عدة مواقع بحثية [25].

في الدراسة التي أجريت في الصين عام 2020 من قبل Kuken وزملاؤه تم الكشف عن الطفرة باستخدام تقانة السلسلة DNA sequencing، وكان طول المنتج الجيني لتفاعل PCR هو 165 bp، حيث أفادت نتائج الدراسة إلى وجود ارتباط بين التعدد الشكلي AGT M235T و تطور الرجفان الأذيني لدى مجموعات الهان والأويغور العرقية في شينجيانغ [26]. قام الباحث Azova بإجراء دراسة في روسيا حول امكانية اعتبار RAAS SNPs كعلامات وراثية محتملة لتطور عودة التضيق في مكان تركيب الدعامة عند مرضى الداء التاجي المستقر، استخدمت تقنية real-time PCR للكشف عن RAAS SNPs، بالنتيجة اعتبرت كل من التعددات الشكلية rs2368564 ل جين الرنين والنمط TT للتعدد الشكلي AGT M235T عوامل خطورة لعودة التضيق، بينما اعتبر النمط الجيني متغاير الزيجوت AGT rs4762 كعامل وقاية [27].

تناقضت دراستنا مع الدراسة التي أجريت في تركيا من قبل Olcay وآخرون حول علاقة التعدد الشكلي AGT M235T مع ضخامة البطين الأيسر عند مرضى ارتفاع الضغط المعالجين، حيث لم يكن هذا التعدد الشكلي مفيداً للتنبؤ بكتلة البطين الأيسر أو وظيفته أو تضخمه أو توسعه [28]، تساهم عدة عوامل في تباين النتائج بين مختلف المجتمعات، حيث يتأثر توزيع تردد التعدد الشكلي AGT M235T بالفوارق الإقليمية والعرقية، بالإضافة إلى اختلاف منهجية الدراسة المتبعة، والتحيز في الاختيار، واختلاف معايير الاشتمال والاستبعاد.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

ارتبط تواجد التعدد الشكلي M235T لـ جين الأنجيوتنسينوجين ونمطه المورثي متماثل الزيجوت TT مع الاختلالات القلبية كمرض القلب التاجي وضخامة البطين الأيسر واحتشاء وقصور القلب عند مرضى ارتفاع الضغط، ومن الممكن اعتباره كعلامة خطورة وراثية محتملة لتطور هذه الاختلالات عند مرضى ارتفاع الضغط في مدينة اللاذقية.

التوصيات:

- 1- إجراء دراسات مستقبلية حول:
 - انتشار التعددات الشكلية الأخرى لـ جين AGT لدى مرضى ارتفاع الضغط المصابين بالاختلالات القلبية في مدينة اللاذقية.
 - علاقة التعدد الشكلي M235T مع الاختلالات العينية والكلى والدماغية عند مرضى ارتفاع الضغط.
 - الخيارات العلاجية الأكثر فعالية لمرضى ارتفاع الضغط الحاملين للمتغير الجيني AGT M235T.
- 2- إجراء دراسة مماثلة على عدد عينات أكبر لدعم النتائج التي توصلنا إليها.

References

1. Gibbs, R.A., *The Human Genome Project changed everything*. Nature Reviews Genetics, 2020. **21**(10): p. 575-576.
2. Sunil Nadar, G.L., *Hypertension (Oxford Cardiology Library) 3E*. 2023: p. 289.
3. Kjeldsen, S.E., *Hypertension and cardiovascular risk: General aspects*. Pharmacological Research, 2018. **129**: p. 95-99.
4. Manosroi, W. and G.H. Williams, *Genetics of human primary hypertension: focus on hormonal mechanisms*. Endocrine reviews, 2019. **40**(3): p. 825-856.
5. Niiranen, T.J., et al., *Risk for hypertension crosses generations in the community: a multi-generational cohort study*. European heart journal, 2017. **38**(29): p. 2300-2308.
6. Padmanabhan, S. and A.F. Dominiczak, *Genomics of hypertension: the road to precision medicine*. Nature Reviews Cardiology, 2022. **18**(4): p. 235-250.
7. Tchelougou, D., et al., *Renin-angiotensin system genes polymorphisms and essential hypertension in Burkina Faso, West Africa*. International journal of hypertension, 2015. **2015**.
8. Dhalla, N.S., S.K. Bhullar, and A.K. Shah, *The Renin Angiotensin System in Cardiovascular Disease*. Vol. 24. 2023: Springer Nature.
9. Jeunemaitre, X., et al., *Angiotensinogen variants and human hypertension*. Current Hypertension Reports, 1999. **1**: p. 31-41.
10. Williams, B., et al., *2018 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension*. Blood Pressure, 2018. **27**(6): p. 314-340.
11. Mocan, O., et al., *Association between polymorphisms of genes involved in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the adaptive morphological and functional responses to essential hypertension*. Biomedical Reports, 2021. **15**(4): p. 1-12.
12. Mirahmadi, M., et al., *Association of rs5051 and rs699 polymorphisms in angiotensinogen with coronary artery disease in Iranian population: A case-control study*. Medicine, 2024. **103**(11): p. e37045.

- .13 Cheng, J.-L., A.-L. Wang, and J. Wan, *Association between the M235T polymorphism of the AGT gene and cytokines in patients with hypertension*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2012. **3**(3): p. 509-512.
- .14 Lip, S. and S. Padmanabhan, *Genomics of blood pressure and hypertension: extending the mosaic theory toward stratification*. *Canadian Journal of Cardiology*, 2020. **36**(5): p. 694-705.
- .15 Bhullar, S.K. and N.S. Dhalla, *Angiotensin II-induced signal transduction mechanisms for cardiac hypertrophy*. *Cells*, 2022. **11**(21): p. 3336.
- .16 Shahid, M., et al., *Genetic polymorphism in angiotensinogen and its association with cardiometabolic diseases*. *Metabolites*, 2022. **12**(12): p. 1291.
- .17 Rysz, J., et al., *Pharmacogenomics of Hypertension Treatment*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(13): p. 3733.
- .18 Zhao, H., et al., *Gene polymorphism associated with angiotensinogen (M235T), endothelial lipase (584C/T) and susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis*. *Bioscience Reports*, 2020. **40**(7): p. BSR20201414.
- .19 Xu, Y., J. Rong, and Z. Zhang, *The emerging role of angiotensinogen in cardiovascular diseases*. *J Cell Physiol*, 2021. **236**(1): p. 68-78.
- .20 Wu, C., et al., *Molecular and Pathophysiological Features of Angiotensinogen: A Mini Review*. *N Am J Med Sci (Boston)*, 2011. **4**(4): p. 183-190.
- .21 Dostal, D.E., et al., *Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(4 Pt 1): p. C838-50.
- .22 Sawa, H., et al., *Expression of the angiotensinogen gene and localization of its protein in the human heart*. *Circulation*, 1992. **86**(1): p. 138-46.
- .23 Sawa, H., et al., *Distribution of angiotensinogen in diseased human hearts*. *Mol Cell Biochem*, 1994. **132**(1): p. 15-23.
- .24 Tran, T.T., et al., *Association between AGT M235T and left ventricular mass in Vietnamese patients diagnosed with essential hypertension*. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2021. **8**: p. 608948.
- .25 Zhen, Z., et al., *Angiotensinogen M235T polymorphism and susceptibility to hypertrophic cardiomyopathy in Asian population: A meta analysis*. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 2020. **21**(4): p. 1470320320978100.
- .26 Kuken, B., et al., *Relationship between M235T and T174M polymorphisms in angiotensinogen gene and atrial fibrillation in Uyghur and Han populations of Xinjiang, China*. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2020. **13**(8): p. 2065.
- .27 Azova, M., et al., *Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system as risk factors for the development of in-stent restenosis in patients with stable coronary artery disease*. *Biomolecules* **11** (5), 763 (2021). 2021.
- .28 Olcay, A., et al., *Angiotensinogen M235T polymorphism and left ventricular indices in treated hypertensive patients with normal coronary arteries*. *Anatolian Journal of Cardiology/Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 2007. **7**(3): p. 105-110.