بیان mRNA ژن VEGF در بیماران مبتلا به گرفتگی عروق کرونر

امین البرزی[۱*]، مهسا محمد آملی[۲]، پروین امیری[۲]، باقر لاریجانی[۲]، صدف صبا[۲]، جواد توکلی بزاز[۳]

چکیده

مقدمه: این مقاله برای سنجش میزان بیان mRNA ژن VEGF (vascular endothelial growth factor) در سلول‌های تک هسته‌ای تحریک نشده در خون محیطی برای بیماران مبتلا به CAD (coronary artery disease) و بیماران بدون عارضه CAD است. همچنین ما پلی‌مورفیسم C/A را در ژن VEGF در ناحیه ۲۵۷۸- که می‌تواند در میزان بیان mRNA این ژن موثر باشد را بررسی کردیم.

روش‌ها: ما ۵۰ بیمار که ابتلای آنها به CAD با آنژیوگرافی به تایید رسیده است را به عنوان مورد و ۵۰ نفر را که عدم ابتلای آنها به CAD نیز با آنژیوگرافی مشخص شده را به عنوان شاهد در نظر گرفتیم. بیان mRNA ژن VEGF توسط Real-time-PCR بررسی شد و ژنوتیپ VEGF در ناحیه ۲۵۷۸- نیز توسط تکنیک ARMS-PCR مطالعه گردید.

یافته‌ها: بیان mRNA ژن VEGF به طور معنی‌داری در بیماران CAD^+ در مقایسه با افراد CAD^- کاهش پیدا می‌کند(P=۰/۰۱). فراوانی آلل C و ژنوتیپ CC در ناحیه ۲۵۷۸- در بیماران CAD^+ افزایش پیدا می‌کند.

نتیجه‌گیری: هموزیگوت بودن برای ژنوتیپ CC به طور معمولی در افراد CAD^+ (۳۰٪) بیش از افراد CAD^- (۱۸٪) مشاهده شد، اما این تفاوت معنی‌دار نیست (P=۰/۱)، و به هر حال یک تمایلی برای کاهش بیان mRNA ژنVEGF وقتی که بیماران حامل ژنوتیپ AA در ناحیه ۲۵۷۸- بودند، در مقایسه با افراد حامل AC یاCC مشاهده شد. بیان ژنVEGF در بیماران CAD^+ کاهش می‌یابد و پلی‌مورفیسم C/A در ناحیه ۲۵۷۸- بیانVEGF را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

واژگان کلیدی: VEGF، CAD، بیان ژن، آترواسکلروزیس

ترجمه انگلیسی این مقاله در مجله Molecular Biology Reports دوره ۳۹، شماره ۹، در سال ۲۰۱۲ به چاپ رسیده است.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- بخش ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نشانی: تهران، میدان پونک، انتهای بلوار اشرفی اصفهانی، حصارک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تلفن: ۰۹۳۷۹۲۰۱۰۶۶، نمابر: ۰۲۱-۴۴۸۱۶۱۱۰، پست الکترونیک: aminalborzi65@yahoo.com

تاریخ دریافت:۹۰/۱۱/۱۵ **تاریخ درخواست اصلاح: ۹۰/۱۲/۲۵** **تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۲/۱۹**

مقدمه

بیماری‌های قلبی عامل مهم مرگ و میر در دنیا هستند. این موضوع اصلی‌ترین پیامد آترواسکلروزیس است. بنابراین جلوگیری از آترواسکلروزیس یک اقدام مهم کلینیکی است [۱]. به هر حال آترواسکلروزیس یک بیماری چند عاملی است، یک بیماری پلی‌ژنتیک که بیش از چهار درصد ژن در آن دخیل هستند [۲].

VEGF مانند پری سیت‌ها، اپی‌تلیوم رنگ‌دانه رتینول، ماکروفاژها و سلول‌های T به عنوان یک فاکتور نفوذپذیر رگی است و توسط اندوتلیوم عروق تولید می‌شود [۳]. در کنار القای نفوذپذیری، VEGF یک میتوژن برای سلول‌های اندوتلیوم عروق است [۴].

گیرنده‌های VEGF (VEGF R.1.2) به طور اختصاصی بر روی سلول‌های اندوتلیال یافت شده‌اند. (VEGFR-2(FLT نفوذپذیری زیاد عروق، رگزایی را باعث می‌شود و VEGFR-2(FLK) علاوه بر نفوذپذیری عروق و رگزایی را نیز هدایت می‌کند [۳].

VEGF همچنین سنتزکلاژن، شروع رگزایی توسط پاک‌سازی ماتریکس، سهولت در مهاجرت سلول‌ها و رشد سلول‌های اندوتیال را باعث می‌شود [۵]. بسیاری از مطالعات افزایش سطح سرم VEGF را در بیماران مبتلا به سندرم حاد کرونر نشان می‌دهد [۶].

آنالیز بیان ژن VEGF می‌تواند به عنوان یک ابزار برای سنجش فنوتیپی این بیومارکر در پیشبرد یا عدم پیشبرد CAD به کار رود. ژنVEGF به طول ۱۴kb بر روی کروموزوم ۶ است و شامل ۸ اگزون و۷ انترون می‌باشد [۷]. مطالعات زیادی آشکار کرده‌اند که پلی‌مورفیسم VEGF ممکن است سطح بیان mRNA را تحت تاثیر قرار دهد [۸] همچنین تعدادی از مطالعات ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن VEGF و شرایط متفاوت [۱۱-۹] شامل نفروپاتی دیابتی [۱۲] و رتینوپاتی دیابتی [۱۳] را بررسی کرده‌اند در مطالعه حاضر، بیانmRNA ژنVEGF را در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در بیماران CAD^+ و CAD^- بررسی کرده‌ایم، در دومین قدم، ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن در ناحیه ۲۵۷۸- و سطح بیان mRNA یVEGF را در جمعیت ایرانی مبتلا بهCAD مورد بررسی قرار دادیم.

روش‌ها

این مطالعه بر روی بیمارانی انجام شد که شکایت عمده آنها، درد در قفسه سینه بود و تمام این افراد در بیمارستان شریعتی تهران آنژیوگرافی شدند (از بهمن ماه ۸۷ تا فروردین ۸۹) و نتایج آن توسط کاردیولوژیست تفسیر گردید، اگر افراد در سه تا از عروق کرونر بیش از ۵۰٪ گرفتگی داشتند گروه مورد (CAD^+) و اگر عروق نرمال داشتند به عنوان گروه کنترل (CAD^-) در نظر گرفته شدند.

مواردی با سابقه مصرف دارو برای تنظیم فشار خون یا میانگین فشار خون بالاتر از ۱۴۰/۹۰mmHg به عنوان افراد دارای فشار خون در این مطالعه محسوب شدند، همچنین بیمارانی که در آنها دیابت و افزایش چربی خون بر پایه ضوابط انجمن دیابت آمریکا [۱۴] و ضوابط مرکز ملی آموزش درمان کلسترول [۱۵] تشخیص داده شد، مورد توجه قرار گرفتند.

سیگار کشیدن و سابقه داشتن سکته قلبی یا MI (Myocardial Infarction) ثبت شد. سابقه سکته قلبی به وسیله مطالعات پزشکی گزارش شده بر پایه ضوابط سازمان بهداشت جهانی شامل تغییرات الکتروکاردیوگرافی استاندارد، تغییر یا بالا رفتن آنزیم‌های قلبی [۱۶] یا سوابق بستری در بیمارستان بررسی شد.

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران تصویب و با رضایت کامل ییماران انجام شد. تعداد ۲۰ نفر CAD^+ و ۲۰ نفر CAD^- که ابتلا یا عدم ابتلای آنان با آنژیوگرافی مشخص شده بود به صورت تصادفی برای آنالیز بیان mRNA ژنVEGF انتخاب شدند که از لحاظ سن، جنس و نمایه توده بدنی همسان بودند.

آنالیز Real time PCR

آنالیز بیان ژن VEGF در سلول‌های خونی تک هسته‌ای خون محیطی تحریک نشده که از ۵cc خون هپارینه استخراج شده بر روی هر بیمار انجام گردید. پس از گذاشتن یک شیب غلظتی برای لنفوسیت و استخراج آن، RNA طبق پروتوکل با کمک تری پیور استخراج شد. ۱ng از RNA برای سنتز cDNA با هگزامر پرایمر انجام شد (Roch) برای انجام Real time PCR برای هر نمونه

cDNA، از HPRT بـه عنـوان کنتـرل داخلـی و از VEGF استفاده شد.

پرایمر مورد استفاده برای VEGF

پرایمر رفت: ۳′- AGCCTTGCCTTGCTGCTCTAC - ۵′
پرایمر برگشت: ۳′-TGATGATTCTGCCCTCCTCCTT-۵′

پرایمر مورد استفاده برای HPRT

پرایمر رفت: ۳′- CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT -۵′
پرایمربرگشت: ۳′-AGACGTTCAGTCCTGTCCATAA-۵′
تمام واکنش‌ها برای Real time PCR حاوی ۲۰µl مخلـوط شامل: ۵ng از cDNA، ۱۰µl از SYBER، ROX، پرایمـر و آب مقطر.
شرایط PCR به این صـورت اسـت، یـک مرحلـه فعالیـت پلی‌مراز اولیه در ۹۵ درجه به مدت ۲ دقیقه، در ۴۰ سـیکل تحت شرایط ۹۵ درجه برای ۵ ثانیـه، ۵۳ درجـه بـرای ۴۰ ثانیه، سپس دمای ذوب رسم می‌شود که نشان دهنـده یـک پیک ویژه برای هر نمونه است و نشان دهنده شـکل‌گیـری پرایمر دایمرها است.

استخراج DNA و مشخص کردن ژنوتیپ

DNA های مربوط به نمونه‌های خونی مورد و شاهد که بـا EDTA مخلوط شد با روش Salting out استخراج شـدند. تکنیک ARMS – PCR بـرای شناسـایی پلـی‌مورفیـسم ژن VEGF در موقعیت ۲۵۷۸- استفاده شد، البته سکانس‌هـای پرایمر و اندازه محصول PCR قبلاً مورد بررسی قرار گرفته است [۱۲]. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۲٪ که بـا ۵µl ایتدیوم بروماید رنگ شده مشاهده گردید. ژنوتیـپ‌هـا با حضور یا غیاب توالی PCR شده بـر روی ژل مـشخص می‌شوند.

آنالیز آماری

میزان ارتباط بین آلل‌ها یا ژنوتیپ‌های مختلف پلی‌مورفیسم ژن VEGF با نـسبت احتمـال (OR یـا odds ratios) و بـا درجه اطمینان ۹۵٪ تخمین زده می‌شود. تمام آنالیزها توسط نرم‌افزار STATA, SPSS انجام شد و مقـدار $P \leq ۰/۰۵$ بـه عنوان تفاوت معنی‌دار قلمداد گردید. میزان بیان ژن VEGF با ژن مرجع HPRT مقایـسه گردیـد و آنـالیز اطلاعـات بـا استفاده از روش $۲^{\Delta\Delta ct}$ انجام شـد. بـرای مـشخص نمـودن معنی‌دار بودن یا نبودن تفاوت بیان ژن بین گـروه کنتـرل و تست از آنالیز t-test استفاده شد.

یافته‌ها

ویژگی‌های اصلی افراد مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. بیماران مبتلا به CAD مسن‌تر از کسانی هـستند که ناهنجاری عروق کرونر مبتلا نیستند. همچنـین فراوانـی عوامل خطرساز مربـوط بـه عـروق قلبـی در افـراد CAD^+ نسبت به افراد CAD^- افزایش نشان می‌دهد.

مقایـسه بیـان mRNA ژن VEGF در بیمـاران CAD^+ و بیماران CAD^-

بیان mRNA ژنVEGF بـه طـور معنـی‌دار در بیمـاران در CAD^+ نسبت بـه بیمـاران CAD^- کـاهش نـشان مـی‌دهـد (P=۰/۰۱) (شکل ۱).

مقایسه فراوانی ژنوتیپ و آلل C/A در ناحیه ۲۵۷۸- ژن VEGF در بیماران CAD^+ و بیماران CAD^-

فراوانی ژنوتیپ و آلل پلی‌مورفیسم C/A در ناحیـه ۲۵۷۸- از ژن VEGF در افـراد CAD^+ و CAD^- سـنجیده شـده همان طور که در جدول ۲ نشان داده شـده اسـت فراوانـی آلل C و ژنوتیـپ CC در بیمـاران CAD^+ در مقایـسه بـا CAD^- بیـشتر اسـت. در ایـن راسـتا افـراد مبـتلا بـهCAD^+) بیشتر دارای ژنوتیـپ CC بودنـد. (۳۰٪ بیمـاران CAD^+ در مقابل ۱۸٪ بیماران CAD^-)، اما ایـن تفـاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (P=۰/۱) (جدول ۲).

تطابق بیان mRNA ژن VEGF با ژنوتیپ‌های C/A در ناحیه ۲۵۷۸-

ما در مطالعه خود دریافتیم که افراد هموزیگوت CC در ناحیه ۲۵۷۸- بیان کمتری از mRNA ژن VEGF را نسبت به هتروزیگوت‌ها یا هموزیگوت‌های AA در این ناحیه دارند و این با نتیجه به دست آمده که نشان داد در افراد CAD^+ بیان ژن VEGF کمتر از افراد CAD^- است مطابقت دارد. در این راستا همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است میزان بیان ژن VEGF در افراد حامل ژنوتیپ AA در مقایسه با افراد AC و CC بالاتر است.

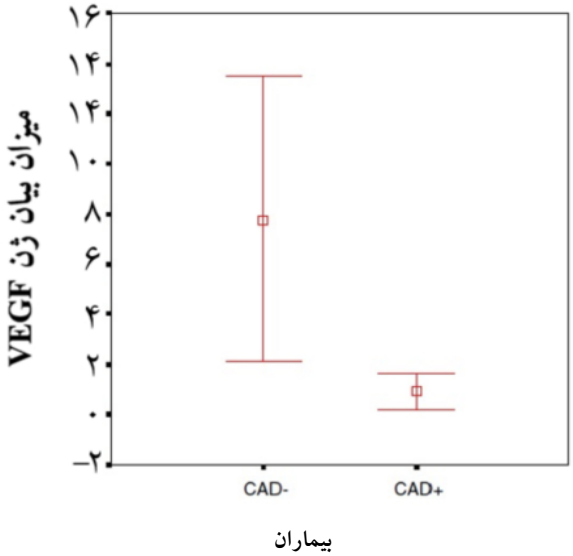
جدول ۱- مقایسه برخی از عوامل موثر در CAD در یک جمعیت ایرانی

متغیر	بیماران CAD^+	بیماران CAD^-
مردان (درصد)	۶۰/۴ (۳۲)	۶۸/۵ (۳۷)
سن (سال)	۶۳ ± ۸/۵	۵۵ ± ۱۱
سیگار کشیدن	۲۵/۹ (۱۴)	۱۳/۲ (۷)
فشار خون بالا	۷۵/۹ (۴۱)	۵۰/۹ (۲۷)
دیابت ملیتوس	۵۳/۷ (۲۹)	۲۲/۶ (۱۲)
چربی خون بالا	۵۰ (۲۷)	۲۴/۵ (۱۳)
کلسترول کل	۱۸۸ ± ۴۷	۱۷۵ ± ۳۸
تری گلیسرید	۱۸۸ ± ۸۴	۱۶۵ ± ۸۰
LDL	۱۱۶ ± ۴۱	۱۱۸ ± ۳۷
HDL	۴۴ ± ۱۷	۴۳ ± ۱۲
سابقه سکته قلبی	۵۱/۹ (۲۸)	۵/۷ (۳)

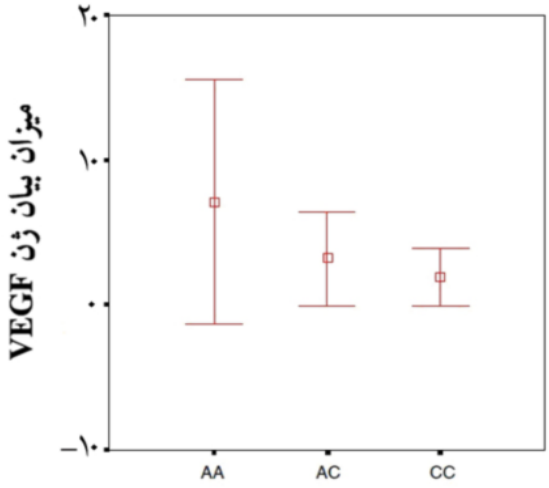
جدول ۲- میزان بروز آلل و ژنوتیپ ژن VEGF در موقعیت ۲۵۷۸- در بیماران CAD^- و CAD^+

ژنوتیپ VEGF	CAD^- تعداد (درصد) ۵۰ نفر	CAD^+ تعداد (درصد) ۵۰ نفر	ارزش P
CC	۹ (٪۱۸)	۱۵ (٪۳۰)	۰/۱
AC	۲۷ (٪۵۴)	۲۶ (٪۵۶)	۰/۸
AA	۱۴ (٪۲۸)	۹ (٪۱۸)	۰/۲
آلل			
C	۴۵ (٪۴۵)	۵۶ (٪۵۶)	۰/۱
A	۴۴ (٪۴۴)	۵۵ (٪۵۵)	

مربع کای نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین میزان بروز آلل و ژنوتیپ وجود ندارد



شکل ۱- کاهش بیان ژن VEGF در بیماران CAD^+ در مقایسه با بیماران CAD^-



ژنوتیپ VEGF در ناحیه ۲۵۷۸-

شکل ۲- کاهش بیان mRNA ژن VEGF در بیماران حامل آلل C در مقایسه با بیماران حامل آلل A (AA va CC, P=0.4, 95%CI=-3.9-1.7).

بحث

در این مطالعه مشاهده کردیم که بیان ژنVEGF در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در افراد CAD^+ نسبت به افراد CAD^- کاهش می‌یابد، این یافته به مفهوم توان بالقوه VEGF در پیشبرد سازوکار منجر به آترواسکلروزیس است، همچنین بیان پایین‌تر mRNA ژنVEGF در بیماران با ژنوتیپ CC در ناحیه ۲۵۷۸- مشاهده شد و به همراه آن روند افزایش فراوانی آلل C و ژنوتیپ CC در افراد CAD^+ مورد توجه قرار گرفت. همه این یافته‌ها از دخالت پلی‌مورفیسم ۲۵۷۸- در ژن VEGF در توسعه و پیشرفت CAD پشتیبانی می‌کند. بسیاری از مطالعات نقشVEGF را در ایجاد بیماری‌های شریانی به عنوان تنظیم کننده ضخامت اندوتلیال عروق کرونر که عامل محافظت کننده در برابر گرفتگی عروق کرونر، تشکیل پلاک و عامل مهم رگزایی است را تایید کرده‌اند [۱۷،۱۸].

همان طور که در مطالعه حاضر نشان داده شده است، مطالعات قبل مشخص کرده‌اند که بیان mRNA ژنVEGF به طور قابل ملاحظه‌ای در افراد حامل آلل A بالاتر است [۸]، با توجه به این موضوع، بررسی‌ها نشان داده‌اند که بیان VEGF در مایع دیالیز صفاقی بیماران با ژنوتیپ CC به طور قابل توجهی در مقایسه با ژنوتیپ AC وAA پایین‌تر است [۴]، همچنین بیماران حامل آلل A در ناحیه ۲۵۷۸- ژن VEGF شانس بیشتری برای داشتن عروق کرونری سالم دارند [۱۹].

در یک مطالعه که اخیراً انجام شده، ارتباط بین پلی‌مورفیسم C/A در ناحیه ۲۵۷۸- ژن VEGF با پیشرفت زخم پای دیابتی مورد تأیید قرار گرفته است [۲۰]، مطابق با داده‌های مطالعه پیش رو، وجود آلل A اثر محافظتی در برابر آسیب‌های عروقی ایجاد می‌کند.

افزایش بیان VEGF در برخی موارد ممکن است عواقب خطرناکی داشته باشد، در این راستا یک ارتباط معنی‌دار بین وجود آلل A در ناحیه ۲۵۷۸- و پیشرفت رتینوپاتی دیابتی در جمعیت ژاپن دیده شده است [۱۳].

با وجود اینکه بیان بالای VEGF در رتینوپاتی دیابتی به علت افزایش تولید آلل A اثری زیان بار به همراه دارد اما یک عامل موثر و مفید در بیماران نفروپاتی دیابتی قلمداد می‌شود. بنابراین وجود آلل A در ناحیه ۲۵۷۸- ژن VEGF ارتباط مستقیم با توسعه رگزایی دارد.

محدودیت بالقوه در مطالعه ما تعداد بیماران در این تحقیق بود، با توجه به اینکه ۱۰۰ نفر در این مطالعه مورد آزمایش قرار گرفتند، روند کاهشی در تولید VEGF در افراد حامل آلل C در بیماران CAD^+ از لحاظ آماری معنی‌دار نیست. با این حال نتایج‌ها همچون مطالعات پیشین تاثیر عملی پلی‌مورفیسم ژن VEGF در ناحیه ۲۵۷۸- را در

سازوکارهای مرتبط با رگزایی و آترواسکلروزیس به خوبی روشن ساخته است.

طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه، همراه با بررسی‌های پیشین می‌توان امکان راه‌های درمانی توسط VEGF را در بیماری‌های عروقی مورد بحث و بررسی قرار داد، در این راستا VEGF به عنوان یک ماده رگزا بوده و نتایج نشان دهنده بهبودی در عملکرد قلبی است [۱۹،۲۱]. بهبودی قابل توجه و موثر در علائم آنژین بیمارانی که سطح بالایی از VEGF را دارند نشان داده شده است [۱۹،۲۲].

با توجه به آنچه گفته شد، یافته‌های ما از این لحاظ حائز اهمیت است که بیان ژن VEGF در پیشرفت CAD را به عنوان یک عامل پیش‌آگهی دهنده تایید کرده است. با این حال، مطالعات بیشتر همراه با تعداد بیشتری از نمونه‌های بیمار برای تایید نتایج به دست آمده لازم به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بودجه این طرح توسط پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران تامین شده است. نویسندگان مقاله از پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم و آزمایشگاه ژنتیک مرکز و پرسنل آن به جهت همکاری در انجام آزمایشات، کمال تشکر را دارند.

مأخذ

1. Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, et al. Association of Carotid Atherosclerosis With Genetic Polymorphisms of Klotho Gene in Patients With Hypertension and in the General Population. *Circulation* 2009; 120,S620.
2. Rhee EJ, Oh KW, Lee WY, Kim SY, et al. The differential effects of age on the association of KLOTHO gene polymorphisms with coronary artery disease. *Metabolism* 2006; 55(10),1344-51.
3. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25:581-611.
4. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146:1029-39.
5. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, et al. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; 153:557-62.
6. Petrovic D.The role of vascular endothelial growth factor gene as the genetic marker of atherothrombotic disorders and in the gene therapy of coronary artery disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2010; 8(1): 47-54.
7. Sfar S, Saad H, Mosbah F, et al. Combined effects of the angiogenic genes polymorphisms on prostate cancer susceptibility and aggressiveness. *Mol Biol Rep* 2009; 36(1):37-45.
8. Marsh S, Nakhoul FM, Skorecki K, et al. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is markedly decreased in diabetic individuals who do not develop retinopathy. *Diabetes Care* 2000; 23:1375-80.
9. Tavakkoly-Bazzaz J, Amoli MM, Pravica V, et al. VEGF gene polymorphism association with diabetic neuropathy. *Mol Biol Rep* 2010; 37(7):3625-30.
10. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, et al. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. Graefes. *Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247(1):21-6.
11. Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, et al. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1994; 17: 1281-9.
12. Senger DR, Connolly DT, Van de WL, et al. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990; 50:1774-8.
13. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, et al. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res* 1997; 34:55-68.
14. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, et al. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26(11), 3160-7.
15. Antonopoulos S. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106,3143-421.
16. Rose G, Blackburn H: WHO Monograph series: Cardiovascular Survey Methods Geneva. *World Health Org*. 1982
17. Biselli PM, Guerzoni AR, de Godoy MF, et al. Vascular endothelial growth factor genetic variability and coronary artery disease in Brazilian population.Heart Vessels. 2008; 23(6):371-5.
18. Bayer IM, Caniggia I, Adamson SL, et al. Experimental angiogenesis of arterial vasa vasorum. *Cell Tissue Res* 2002; 307:303-13.

19. Lin TH, Wang CL, Su HM, et al. Functional vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and diabetes: effect on coronary collaterals in patients with significant coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2010; 411(21-22):1688-93.
20. Amoli MM, Hasani-Ranjbar S, Roohipour N, et al. VEGF gene polymorphism association with diabetic foot ulcer. *Diabetes Res Clin Pract* 2011 May 17. [Epub ahead of print].
21. Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, et al. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation* 2000; 101(2):118-21.
22. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, et al. Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003; 107(10):1359-65.