مجله دیابت و لیپید ایران. زمستان ۱۳۸۴؛ دوره ۵ (شماره ۲): ۱۲۵-۱۱۷

ژنتیک نوروپاتی دیابتی: بررسی نقش ژن VEGF

جواد توکّلی بزّاز[۱] *، ورا پراویکا[۲]، آندره بولتون[۳]، یان هاچینسون[٤]

چکیده

مقدمه: نقش و اهمیّت قابل ملاحظه عوامل عروقی اولاً در اتیوپاتوژنز نوروپاتی دیابتی و ثانیاً در مرحله پس از بروز این عارضه، در تعیین برآیند نهایی واکنش‌های نوروژنراتیو/ نورودژنراتیو، سبب شده تا مطالعات گسترده‌ای در این زمینه به‌ویژه در قالب درمان های مداخله‌ای صورت گیرد. در این راستا با توجه به ماهیّت ایسکمیک نوروپاتی دیابتی و اهمیت فراوان برقراری مجدّد تغذیه خونی در نسج عصبی مورد آزار در فرآیند ترمیم ، VEGF به عنوان فاکتور رشدی که در کنار کارکردهای همودینامیک، قابلیّت بالایی در ایجاد عروق دارد، جایگاه ویژه ای را داراست.

روش‌ها: با توجه به تأثیرات قابل ملاحظه زمینه‌های وراثتی و نژادی در میزان بروز و شدّت علایم مربوط به نوروپاتی دیابتی، مطالعه حاضر تأثیرات مربوط به تغییرات ساختمانی ژن VEGF بر استعداد/ مقاومت بیماران دیابتی در ابتلا به نوروپاتی را در قالب یک *"مطالعه پیوستگی"* مورد بررسی قرار می‌دهد.

یافته‌ها: توزیع فراوانی آلل‌ها/ ژنوتیپ‌های مربوط به چهار پلی‌مورفیسم ژن VEGF در موقعیّت‌های C/T*-۷، G/C*-۱۰۰۱، G/A*-۱۱۵۴ و C/A*-۲۵۷۸ بین ۲۴۸ بیمار مبتلا به T1DM (۸۱ نفر DNU^+ و ۱۶۷ نفر DNU^-) و ۱۱۳ فرد سالم (گروه شاهد) که همگی از جمعیت "بریتانیایی- قفقازی" بوده‌اند، ارزیابی شد. اختلاف معنادار تنها در یک مورد آن هم در سطح آللی - و نه ژنوتیپی- پلی مورفیسم ناحیه پروموتر در موقعیت C/T*-۷ در مقایسه بین دو زیرگروه واجد و فاقد نوروپاتی (DNU^-/ DNU^+) مشاهده شد که آلل T دارای نقش حمایتی بود (P=۰/۰۳،OR=۱/۷۵) .

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش حمایتی VEGF در نوروپاتی دیابتی، مطالعه حاضر نشان می دهد پلی‌مورفیسم ژن VEGF در موقعیت C/T*-۷ با پتانسیل‌های "عملکردی" و فنوتیپیک خود و احتمالاً با دخالت در تعیین سطح موضعی/ بافتی (عمدتاً نسج عصبی) VEGF، می تواند به عنوان یکی از عوامل تعیین کننده میزان استعداد/ مقاومت ژنتیکی در برابر ابتلا به نوروپاتی دیابتی باشد. البته برای قضاوت بهتر تکرار این مطالعه در تعداد بیشتری از بیماران دیابتی(DNU^-/ DNU^+) قویاً توصیه می شود.

واژگان کلیدی: VEGF ، پلی مورفیسم، نوروپاتی

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشکده علوم بیولوژی، دانشگاه منچستر، انگلستان

۳- مرکز دیابت و بیمارستان رویال منچستر، انگلستان

٤- انستیتو ملی پیوند، لوس آنجلس، امریکا

* ***نشانی***: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم؛ تلفن: ۸۸۰۲۶۹۰۲-۳؛ نمابر: ۸۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: tavakkolybazzazj@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۲/۸

تاریخ پذیرش: ۸۴/۸/۲۰

مقدّمه

با وجود شناختی که درباره نقش محوری اختلالات متابولیکی- عمدتاً هیپرگلیسمی- در اتیوپاتوژنز عوارض دیررس دیابت حاصل شده، بطوری‌که عملاً وقوع این عوارض بدون حضور قبلی این اختلالات ناممکن است؛ اما در عین حال نمی‌توان تنها با تکیه بر شاخص‌های متابولیک از جمله HbA1C، الگوی فراگیر و تفسیر دقیقی را نسبت به امکان و یا شدّت بروز این عوارض بدست داد [۱].

در خصوص نوروپاتی دیابتی در کنار عوامل متابولیک، توجه خاصی نیز به نقش عوامل عروقی در ایجاد این عارضه معطوف گشته است[۲، ۳]. همه اهمیّت و نقش VEGFدر نوروپاتی دیابتی به اهمیت و جایگاهی برمی‌گردد که عوامل عروقی در پاتوفیزیولوژی این عارضه دارند. در نوروپاتی دیابتی که خود دربرگیرنده طیف وسیع و هتروژنی از درگیری‌های عصبی است، بسته به نوع دیابت زمینه‌ای، تظاهرات بالینی، ویژگی‌های بیولوژیکی و ژنتیکی، عوامل اتیولوژیک با اهمیّت و سهم متفاوتی در ایجاد آن مشارکت می‌کنند. به عنوان مثال در حالی‌که میزان دخالت عوامل متابولیک در اشکال "قرینه‌ای" و "وابسته به طول"[1] نوروپاتی بارزتر است، در اشکال دیگر مثل منونوروپاتی‌ها دخالت عوامل عروقی پر رنگ‌تر می‌باشد. در مجموع به علت وجود ضایعات منتشر در بستر "میکرو واسکولار" بافت عصبی و نقش مؤثر این اختلالات – هم ساختمانی: افزایش ضخامت غشای پایه، هیپرپلازی سلول‌های اندوتلیال، دژنراسیون سلول‌های پری‌سیت و ... و هم عملی: نقصان در فرآیند اتساع عروقی و ...[۴، ۵] در ایجاد نوروپاتی دیابتی و البته همراهی بالینی این عارضه با دو عارضه میکروآنژیوپاتیک دیگر یعنی رتینوپاتی دیابتی (DR) و نفروپاتی دیابتی (DN)، دلایلی بوده که سبب شده این عارضه در تقسیم‌بندی کلی در گروه عوارض میکروآنژیوپاتیک دیابت جای گیرد[۶].

ژنتیک و نوروپاتی دیابتی

توجه به این نکته بسیار ضروری است که تفاوت‌های فاحشی که در میزان شیوع و بروز نوروپاتی دیابتی در گزارش‌های مختلف وجود دارد، بیش از آنکه قابل استناد به عوامل اتیولوژیک (نحوه مراقبت‌های بالینی و یا زمینه ژنتیکی و نژادی) جمعیت مورد مطالعه باشد، مربوط به رویکردهای متفاوتی است که در تعریف نوروپاتی و همچنین روش‌ها و معیارهای تشخیصی مورد استفاده وجود دارد. برای این عارضه شیوع متفاوتی از ۱۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است [۷].

تقریباً کلیه افراد دیابتی پس از گذشت مدتی، یافته‌های غیر طبیعی آزمایشگاهی (کاهش سرعت هدایت عصبی، Increased evoked potential latency) و پاتولوژیک مربوط به نوروپاتی -"آکسوگلیال دیس جانکشن" در T1DM و فقدان موضعی رشته های عصبی و "دژنراسیون والرین" درT2DM [۸] – را نشان می‌دهند[۹]؛ هرچند که در غالب موارد این ابتلا از نظر بالینی "خاموش" است. نوروپاتی دیابتی با ایجاد "فقدان حسی"[2] یکی از عللی است که زمینه را برای زخمی شدن پای دیابتی[3] فراهم می‌نماید. عارضه اخیر، شایع‌ترین علت بستری شدن بیماران دیابتی در بیمارستان‌ها و همچنین شایعترین علت قطع اندام تحتانی در اثر موارد غیر ترومایی است[۱۰]. تنها در آمریکا دیابت موجب ۵۴۰۰۰ تا ۵۵۰۰۰ مورد قطع اندام تحتانی در سال (۱۵۰ مورد برای هر روز!) می‌گردد (آمار مربوط به سال ۱۹۹۸ است) [۱۱].

مطالعاتی که تقریباً معیارها و شاخص‌های یکسانی را در تشخیص و ارزیابی نوروپاتی بکار برده‌اند، بصورت آشکاری نشان از نقش مؤثر زمینه نژادی بیماران دیابتی (هر دو نوع دیابت) در میزان ابتلا به این عارضه دارند [۱۴-۱۲]. در T1DM، شیوع فراوانتر و همچنین شدّت بیشتر نوروپاتی دیابتی در بیماران الجزایری در مقایسه با بیماران اروپایی گزارش شده است[۱۵]. مطالعات متعدد دیگری نیز به‌طورمستقیم با بررسی چند ژن برگزیده نشان دادند که تغییرات ساختمانی این ژن ها به عنوان یکی از عوامل

[1] Length dependent

[2] Sensory Loss
[3] Diabetic Foot Ulceration

مؤثر، در تعیین میزان استعداد ژنتیکی در ابتلاء به عارضه نوروپاتی نقش دارند: *ATP1A1*، یکی از ژن های کد کننده آنزیم Na/K ATPase- [۱۳]؛ *SOD2* ، ژن کد کننده آنزیم میتوکندریال سوپراکسید دسموتاز، و *SOD3* ، ژن کد کننده آنزیم اکسترا سلولار سوپراکسید دسموتاز،[۱۶، ۱۷]؛ *TLR4*، ژن کد کننده "Toll-like receptor"- (18).

مطالعه حاضر در قالب یک "association study Candidate gene" نقش بالقوّه ای که تغییرات ساختمانی ژن VEGF ممکن است در قالب استعداد/ مقاومت ژنتیکی بیماران دیابتی در برابر ابتلا به نوروپاتی داشته باشند را برای نخستین بار مورد بررسی قرار می‌دهد.

روش‌ها

الف- گروه شاهد

افراد این گروه شامل ۱۱۳ نفر بودند که بطور تصادفی از جمعیت نژاد "بریتانیایی- قفقازی" انتخاب شدند. این گروه فاقد بیماری دیابت و همچنین بیماری‌های مشخص و مزمن دیگر بوده و نسبت فامیلی با یکدیگر نداشتند.

ب- گروه بیمار

افراد این گروه نیز بطور تصادفی از جمعیت "بریتانیایی- قفقازی" انتخاب شدند و نسبت فامیلی با یکدیگر نداشتند. این گروه مشتمل بر ۲۴۸ بیمار مبتلا به T1DM بوده که به عنوان بیمار "ثبت شده" به "مرکز دیابت منچستر" در شهر منچستر انگلستان بطور منظم مراجعه می‌نمودند. مطالعه حاضر منحصر به بیمارانی بود که در زمان انجام مطالعه (سال‌های ۲۰۰۳- ۱۹۹۹)، حداقل مدت ۵ سال از طول دوره دیابت آنها گذشته بود.

شرکت اعضای گروه شاهد و بیمار در این مطالعه پس از تأیید "پروپوزال" این مطالعه در کمیته اخلاق پزشکی بیمارستان رویال منچستر (Royal Infirmary) و اخذ رضایت آنها صورت گرفت.

اعضای گروه بیمار بسته به این‌که به نوروپاتی دیابتی مبتلا بوده‌اند یا خیر، به دو گروه زیر تقسیم شدند:

۱- بدون نوروپاتی (DNU^-)

فقدان علایم و نشانه‌های مربوط به نوروپاتی برمبنای معیارهای "DCCT" به اضافه برخورداری از "آستانه درک ارتعاش" (VPT) کمتر از ۲۵ ولت (در ارزیابی با دستگاه "*Neurothesiometer*"، در وضعیتی که پروب دستگاه برروی شست پای بیمار قرار داشته و چشم بیمار حین انجام آزمایش بسته بوده است)، شرط قرار گرفتن بیماران در این گروه بود.

۲- مبتلا به نوروپاتی (DNU^+)

برمبنای معیارهای تشخیصی "DCCT"، بیماران از نظر علایم، نشانه‌ها و رفلکس‌های عصبی معاینه و ارزشیابی شدند. در صورت وجود علایم و نشانه‌هایی همچون: کرختی، دیس‌استزی و یا پاراستزی، افزایش حساسیت به لمس، درد سوزشی، درد دشنه‌ای[1] در پا یا دست، زخم پای نوروپاتیک و بالاخره کاهش یا فقدان رفلکس‌های عمیق تاندونی، تشخیص نوروپاتی دیابتی گذاشته شد. وجود یافته‌های مربوط به دو یا سه رده مختلف(علایم، نشانه و رفلکس) از مجموعه موارد فوق‌الذکر، تحت عنوان نوروپاتی شدید و وجود یافته (های) محدود به یکی از زیرمجموعه‌های سه‌گانه یاد شده، به عنوان نوروپاتی خفیف در نظر گرفته شد[۱۹]. همه بیماران DNU^+ دارای "آستانه درک ارتعاشی" بالای ۲۵ ولت بودند که در چنین حالتی خطر قابل ملاحظه‌ای بیمار را از نظر "زخم شدگی" پا تهدید می‌کند (گو این‌که درصد زیادی از بیماران در هنگام معاینه مبتلا به این عارضه بودند). تشخیص نوروپاتی دیابتی البته با رد قبلی بیماری‌های عروقی محیطی (قابل لمس بودن نبض در ناحیه پشت قوزک پا و ارزیابی شاخص فشار قوزک پا- بازویی[2]، صورت گرفت.

ج – تعیین آلل/ ژنوتیپ های پلی‌مورفیک

پس از تهیه نمونه خون محیطی از افراد و استخراج DNA از گلبول‌های سفید، آزمایش "ARMS – PCR" جهت

[1] Stabbing pain
[2] Ankle brachial pressure index

تعیین نوع آلل‌های افراد دو گروه بیمار و شاهد در موقعیت پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه برای ژن VEGF انجام گرفت. برای تکثیر قطعه مورد نظر DNA بوسیله PCR، محلول "*Master Mix*" تهیه گردید که مواد مختلف و درصد حجمی استفاده از آنها در این محلول بدین قرار بوده است: محلول "Ready Load Reaction Buffer" (AB Technologies, UK) به میزان ۲۲٪، محلول ۲۰۰ میکرومولار dNTPs به میزان ۲۲٪ (AB Technologies, UK)، محلول ۱/۵ میکرومولار کلرید منیزیم به میزان ۱۳٪(AB Technologies, UK)، محلول ۶۰٪ سوکروز(W/V) به میزان ۳۱٪ ، محلول ۱ میکرومولار جفت پرایمرهای کنترل (HGH) به میزان ۱۱٪ (Genosys Biotechnologies, UK)و DNA پلیمراز ترموپرایم ۱/۱٪ (AB Technologies, UK).

ابتدا ۱/۵ میکرولیتر از DNA حل شده به ۱۵ میکرولیتر از محلول "*Master Mix*" اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر از این محلول (حاوی DNA + Master Mix) با ۵ میکرولیتر پرایمرهای اختصاصی برای هر آلل مخلوط و در نهایت آزمایش PCR این محلول بوسیله دستگاه ترموسایکلر PTC-100 PCR (MJ Research, Inc) و مطابق برنامه ذیل انجام گرفت:

ابتدا دمای ۹۶°C به مدت ۱ دقیقه، دمای ۹۵°C برای ۱۰ سیکل ۱۵ ثانیه ای، دمای ۶۵°C برای ۵۰ ثانیه، دمای ۷۲°C برای ۴۰ ثانیه، دمای ۹۵°C برای ۲۰ سیکل ۲۰ ثانیه ای، دمای ۵۹°C برای ۵۰ ثانیه و بالاخره دمای ۷۲°C برای ۵۰ ثانیه. محصول PCR سپس بر روی ژل آگاروز ۲٪ که ۵ میکرولیتر محلول اتیدیم بروماید (۰/۵mg/ml) به آن اضافه شده بود، نشانده و الکتروفورز گردید و سرانجام با قرار دادن ژل بر روی اشعه ماوراء بنفش (UV)، با رؤیت باند DNA، نوع آلل/ ژنوتیپ مشخص شد.

یافته‌ها

نحوه توزیع فراوانی آلل‌ها/ ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیک ژن VEGF در چهارموقعیت: C/T*-۷، G/C*-۱۰۰۱، G/A*-۱۱۵۴ و C/A*-۲۵۷۸ بین ۲۴۸ بیمار مبتلا به T1DM و ۱۱۳ نفر افراد سالم (گروه شاهد) که همگی از جمعیت "بریتانیایی- قفقازی" بودند، تفاوت قابل ملاحظه ای را نشان نداد (P= NS). هنگامی که این توزیع بین دو زیر گروه واجد و فاقد نوروپاتی با یکدیگر (۸۱ نفر DNU^+ و ۱۶۷ نفر DNU^-) و نیز زمانی که هر یک از این

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده برای پلی‌مورفیسم‌های ژن VEGF و پرایمر کنترل

ژن منتخب	پرایمر	توالی	اندازه محصول PCR
VEGF (-7*C/T)	Generic primer Primer C (anti-sense) Primer T (anti-sense)	5'-GGTGTGCGCAGACAGTGCT-3' 5'-AGCAGAAAGTTCATGGTTTCG-3' 5'-AGCAGAAAGTTCATGGTTTCA-3'	185bp
VEGF (-1001*G/C)	Generic primer Primer G (sense) Primer C (sense)	5'-GCCGTCGGCCCGATTCAA-3' 5'-CGGGTAGCTCGGAGGTCG-3' 5'-CGGGTAGCTCGGAGG-3'	198 bp
VEGF (-1154*G/A)	Generic primer Primer G (sense) Primer A (sense)	5'-CGACAGAGCGCTGGTGCT-3' 5'-CCCGAGCCGCGTGTGGAG-3' 5'-CCCGAGCCGCGTGTGGAA-3'	203bp
VEGF (-2578*C/A)	Generic primer Primer C (anti-sense) Primer A (anti-sense)	5'-TTAGGACACCATACCGATGG-3' 5'-TCTGATTATCCACCCAGATCG-3' 5'-TCTGATTATCCACCCAGATCT-3'	239 bp
HGH (Control Primer)	Sense: Antisense:	5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3' 5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'	429 bp

جدول ۲- توزیع فراوانی ژنوتیپ/آلل پلی‌مورفیسم ژن VEGF در موقعیتC/T*7- در گروه شاهد (C)، بیماران T1DM (P)، دیابتی های نوروپات (DNU^+) و دیابتی های غیرنوروپات (DNU^-)

VEGF -7*C/T	C n (%)	P n (%)	DNU n (%)
ژنوتیپ			
CC	۶۳(۶۷)	۱۶۱(۶۵)	۶۰(۷۴)
CT	۲۷(۲۸/۷)	۷۶(۳۰/۶)	۱۹(۲۳/۵)
TT	۴(۴/۳)	۱۱(۴/۴)	۲(۲/۵)
آلل			
C	۱۵۳(۸۱/۴)	۳۹۸(۸۰/۲)	۱۳۹(۸۶)
T	۳۵(۱۸/۶)	۹۸(۱۹/۸)	۲۳(۱۴)

*OR=۱/۷۵؛ χ^2=۴/۷ ؛CI (٪۹۵) =۱/۰۳-۱/۷۵

** در مقایسه P/C و DNU/C مقادیر P معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

$^+$ در مقایسه DNU^+/DNU^- مقادیر P معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

جدول ۳ - توزیع فراوانی ژنوتایپ/الل پلی‌مورفیسم ژن VEGF در موقعیتG/C*1001- در گروه کنترل (C)، بیماران T1DM (P)، دیابتی های نوروپات (DNU^+) و دیابتی های غیرنوروپات (DNU^-)

VEGF -1001* G/C	C n (%)	P n (%)	DNU n (%)
ژنوتیپ			
GG	۸۷(۹۱/۶)	۲۲۹(۹۲/۳)	۷۹(۹۶/۳)
GC	۸(۸/۴)	۱۹(۷/۷)	۳(۳/۷)
CC	۰(۰/۰۰)	۰(۰/۰۰)	۰(۰/۰۰)
آلل			
G	۱۸۲(۹۵/۸)	۴۷۷(۹۶/۲)	۱۶۱(۹۸/۲)
C	۸(٤/۲)	۱۹(۳/۸)	۳(۱/۸)

* در مقایسه P/C، DNU/C و DNU^+/DNU^- مقادیر P معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

زیرگروه‌ها با گروه شاهد سالم مقایسه شدند، نتیجه بجز در یک مورد، اختلاف معناداری را نشان نداد. توزیع آلل‌ها (و نه ژنوتیپ‌ها)ی مربوط به پلی مورفیسم موقعیت C/T*۷- در مقایسه بین جمعیت‌های زیرگروه‌های بیماران با یکدیگر (ونه در مقایسه با گروه شاهد سالم) اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نشان داد، بدین صورت که وجود آلل T با کاهش و آلل C با افزایش استعداد ابتلا به نوروپاتی دیابتی همراه بوده است (CI(٪۹۵)=۱/۰۳-۱/۷۵؛ χ^2=۴/۷؛ OR=۱/۷۵؛ P=۰/۰۳) (جدول های ۲ تا۵).

جدول ۴- توزیع فراوانی ژنوتیپ/آلل پلی‌مورفیسم ژن VEGF در موقعیتG/A*1154- در گروه کنترل (C)، بیماران T1DM (P)، دیابتی های نوروپات (DNU^+) و دیابتی های غیرنوروپات (DNU^-)

VEGF -1154* G/A	C n (%)	P n (%)	DNU n (%)
ژنوتیپ			
GG	۴۷(۴۹/۵)	۱۱۹(٤۸)	۴۲(۵۱/۲)
GA	۳۹(۴۱)	۱۱۱(۴۴/۷)	۳۴(۴۱/۵)
AA	۹(۹/۵)	۱۸(۷/۳)	۶(۷/۳)
آلل			
G	۱۳۳(۷۰)	۳۴۹(۷۰/۴)	۱۱۸(۷۲)
A	۵۷(۳۰)	۱۴۷(۲۹/۶)	۴۶(۲۸)

* در مقایسه P/C، DNU/C و DNU^+/DNU^- مقادیر P معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

جدول ۵- توزیع فراوانی ژنوتایپ/الل پلی‌مورفیسم ژن VEGF در موقعیتC/A*2578- در گروه کنترل (C)، بیماران T1DM (P)، دیابتی های نوروپات (DNU^+) و دیابتی های غیرنوروپات (DNU^-)

VEGF -2578* C/A	C n (%)	P n (%)	DNU n (%)
ژنوتیپ			
CC	۲۹(۳۰/۵)	۷٤(۲۹/۸)	۲۲(۲۶/۸)
CA	٤۵(٤۷/۵)	۱۲۵(۵۰/۴)	۴۳(۵۲/۵)
AA	۲۱(۲۲)	۴۹(۱۹/۸)	۱۷(۲۰/۷)
آلل			
C	۱۰۳(۵۴)	۲۷۳(۵۵)	۸۷(۵۳)
A	۸۷(٤۶)	۲۲۳(۴۵)	۷۷(۴۷)

* در مقایسه P/C، DNU/C و DNU^+/DNU^- مقادیر P معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

بحث

تأثیرات مثبت و درمانی VEGF بـر نوروپـاتی دیـابتی طـی رویکردهای تحقیقاتی متعددی از جمله مطالعات ژن تراپی قویاً ثابـت گردیـده اسـت. ژن تراپـی بـا ژنVEGF سـبب جلـوگیری و یـا برگـشت ضـایعاتی چـون از دسـت دادن اکـسون هـا و دژنراسـیون میلـین [۲۰] و همچنـین تثبیـت جریان خون اعصاب و تعداد عروق مغذّی بافت عصبی می گردد [۲۱]. با انتقال داخل عضلانی پلاسمید DNA که ژن VEGF را کد مـی کـرده، تخفیـف و یـا برگـشت "کـاهش سرعت هدایت عصبی" و بهبود کارکردهای اعصاب حـسی در عضلات ایسکمیک خرگوش مشاهده شد. بـا توجـه بـه وجود گیرنده فعـال VEGF بـر روی غـشای سـلول هـای شوان، درمـان حیوانـات بـا VEGF موجـب جلـوگیری از آپوپتوز ناشی از هیپوکسی[1] و نیز افـزایش میـزان مهـاجرت در این سلول ها شد که به روشـنی آثـار مثبـت ایـن عامـل رشد در جهت حفظ و بازگشت مجـدّد تمامیّـت عـصبی[2] را نشان می دهد [۲۰].

در مطالعه حاضر توزیع فراوانی آلل \ ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیک ژن VEGF حاصل از وجود SNP در موقعیت‌های: C/T*۷-، G/C*۱۰۰۱-، G/A*۱۱۵۴- و C/A*۲۵۷۸- ، بین ۲۴۸ بیمار مبتلا به T1DM و ۱۱۳ نفر افراد سالم (گروه شاهد) - همگی از جمعیت "بریتانیایی- قفقازی" - مقایسه گردید. از میان چهار *نشانگر ژنتیکی*[3] انتخاب شده، تنها توزیع آلل‌ها (و نه ژنوتیپ‌ها)ی مربوط به پلی مورفیسم موقعیت C/T*۷- بین دو زیرگروه مربوط به جمعیت بیمار (DNU^+ و DNU^-) اختلاف قابل ملاحظه ای را نشان داد. آلل T با کاهش و آلل C با افزایش استعداد ابتلاء به نوروپاتی دیابتی همراهی داشته است (P=۰/۰۳ ؛OR=۱/۷۵ ؛χ^2=۴/۷ ؛CI(٪۹۵) =۱/۰۳-۱/۷۵). این تفاوت معنادار البته در هنگام مقایسه هر یک از این زیرگروه‌ها با گروه شاهد سالم قابل مشاهده نبوده است(P= NS).

با توجه به مطالعاتی که دو پلی مورفیسم (G/A*۱۱۵۴- و C/A*۲۵۷۸-) از چهار پلی مورفیسم مورد بررسی در این تحقیق را عملکردی[4] (تعیین کننده میزان نسخه برداری از ژن VEGF) معرفی نموده اند [۲۲]؛ در صورت وجود تفاوت قابل ملاحظه در توزیع آلل\ ژنوتیپ‌های ناشی از این پلی مورفیسم ها، در نگاه نخست محتمل تر آن به نظر می آید که وجود این تفاوت ناشی از اختلاف در توزیع آلل‌های دو پلی‌مورفیسم فوق باشد. اما از آنجا که در سنجش‌های عملکردی[5] انجام گرفته [۲۲]، نوع سلول های مورد مطالعه (WBC) و نیز نوع "محرّک" بکار گرفته شده (LPS, PHA) تناسب چندانی با شرایط بیولوژیک بیماری دیابت و یا DNU (سلول‌های پاسخ دهنده: اندوتلیال و نوروآندوتلیال؛ محرّک ها: هیپوکسی، هیپرگلیسمی) ندارند، لذا تعمیم نتایج آن بررسی به مطالعه حاضر منطقی به نظر نمی رسد. این نکته بدین معناست که مثلاً در شرایط زمینه‌ای خاص مربوط به بیماری دیابت، ممکن است آن دو پلی مورفیسم نقش تعیین کننده‌ای در میزان نسخه برداری از ژن VEGF و به تبع آن تعیین سطح تولید پروتئینی آن نداشته، و یا در کل بی اثر بوده و اتفاقاً پلی مورفیسم مربوط به موقعیت C/T*۷- از چنین کارکردی برخوردار باشد. تفسیر دیگری که با توجه به نتایج بدست آمده قابل ارائه می باشد آن است که پلی مورفیسم در موقعیت C/T^{-}*۷ خودش به تنهایی تأثیری بر میزان بیان ژن VEGF ندارد، اما با پلی مورفیسم دیگری از ژن VEGF (که بر میزان بیان این ژن اثرگذار است) و یا ژن های مجاور این ژن (البته در صورتی که همچون ژن VEGF بتوانند بواسطه پتانسیل های بیولوژیک پروتئین بیان شده خود، به عنوان یکی دیگر از ژن های کاندید DNU در نظر گرفته شوند) دارای *پیوستگی ترجیحی*[6] است (حالتی که همراهی هر یک از آلل ها با آلل خاصی از پلی‌مورفیسم دیگر، بیشتر از وضعیتی باشد که می بایست حسب اتفاق روی دهد). در وضعیت اخیر (وجود LD)، پلی مورفیسم ژن VEGF در موقعیت C/T^{-}*۷ به صورتی غیرمستقیم،

[1] Hypoxia induced apoptosis
[2] Neural integrity
[3] Genetic marker
[4] Functional
[5] Functional assay
[6] Linkage disequilibrium, LD

می تواند منعکس کننده میزان استعداد یا مقاومت میزبان در ابتلا به عارضه DNU باشد.

نتیجه‌گیری

بر خلاف نقش مضر و مخرّب VEGF در رتینوپاتی و نفروپاتی دیابتی، درDNU این فاکتور رشد از قابلیت ها و پتانسیل های پیشگیری کننده و یا درمانی بسیار مهمی برخوردار است. در مطالعه حاضر وجود آلل T مربوط به پلی مورفیسم ژن VEGF در موقعیت C/T*V¯ ، با افزایش مقاومت بیماران T1DM در برابر ابتلا به DNU همراه بوده است. این مطالعه ضمن طرح اولیه و محتاطانه قابلیت‌های پیش‌گویی کننده پلی مورفیسم مورد اشاره، ضرورت تکرار مطالعات مشابه و همچنین بررسی سایر ژن ها و مطالعات تکمیلی را توصیه می نماید، تا در نهایت بتوان با استفاده از تعیین نقشه ژنی و تهیه یک پروفایل جامع از ژنوتیپ کلیه ژن‌های برگزیده در DNU، به شناسایی بیمارانی پرداخت که از نظر شانس ابتلا به DNU، پرخطر محسوب می‌شوند. چنین امکانی با توجه به هزینه نسبتاً اندک و انجام پذیر بودن آن در زمان تشخیص و یا آغاز بیماری دیابت، زمینه برای پیشگیری و یا مقابله مؤثرتر با این عارضه در طول دوره بیماری دیابت را هموارتر می سازد.

مآخذ

1. Nathan DM. The pathophysiology of diabetic complications: how much does the glucose hypothesis explain? *Ann Intern Med*. 1996; 124: 86Θ .
2. Tesfaye S, Malik R, Ward JD. Vascular factors in diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1994; 37: 847-54.
3. Stevens MJ, Feldman EL, Greene DA. The aetiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. *Diabet Med* 1995; 12: 566-79.
4. Giannini C, Dyck PJ. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann Neurol* 1995; 37 498-504.
5. Malik RA, Veves A, Masson EA, Sharma AK, Ah-See AK, Schady W, Lye RH, Boulton AJ. Endoneurial capillary abnormalities in mild human diabetic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55 557-61.
6. Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, Fuller JH, Plater M, Ionescu-Tirgoviste C, Nuber A, Pozza G, Ward JD. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 1996; 39: 1377-84.
7. Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1994; 17 1281-9.
8. Sima AA, Nathaniel V, Bril V, McEwen TA, Greene DA. Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of axo-glial dysjunction in human diabetic neuropathy. *J Clin Invest* 1988; 81: 349-64.
9. Brown MJ, Asbury AK. Diabetic neuropathy. *Ann Neurol* 1984; 15 2-12.
10. Boulton AJ. Update on long-term diabetic complications. In: Lewin & Seymour (eds). Current themes in diabetes care. Royal College of Physicians of London. London, 1992: 45-53.
11. Skyler JS. Preface. T*he Med Clin of North Am.* 1998; 84: v,vi .
12. Vague P, Dufayet D, Coste T, Moriscot C, Jannot MF, Raccah D. Association of diabetic neuropathy with Na/K ATPase gene polymorphism. *Diabetologia*. 1997; 40:506-11.
13. Vague P, Dufayet D, Lamotte MF, Mouchot C, Raccah D. Genetic factors, Na K ATPase activity and neuropathy in diabetics. *Bull Acad Natl Med* (French) 1997; 181: 1811-21; discussion 1821-3.
14. Raccah D, Coste TC, Vague P. Genetics of diabetic complications: peripheral neuropathy. *Ann Endocrinol (French)* 2004; 6ϱl Suppl): S5-9.
15. Vague P, Brunetti O, Valet AM, Attali I, Lassmann-Vague V, Vialettes B. Increased prevalence of neurologic complications among insulin dependent diabetic patients of Algerian origin. *Diabete Metab* 1988; 14: 706-11.
16. Chistyakov DA, Savost'anov KV, Zotova EV, Nosikov VV. Polymorphisms in the Mn-SOD and EC-SOD genes and their relationship to diabetic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 2001; 2: 4.
17. Strokov IA, Bursa TR, Drepa OI, Zotova EV, Nosikov VV, Ametov AS. Predisposing genetic factors for diabetic polyneuropathy in patients with type 1 diabetes: a population-based case-control study. *Acta Diabetol* 2003; 40 Suppl 2: S375-9.

18. Rudofsky G Jr, Reismann P, Witte S, Humpert PM, Isermann B, Chavakis T, Tafel J, Nosikov VV, Hamann A, Nawroth P, Bierhaus A. Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27 179-83.
19. DCCT Research Group. Factors in developpment of diabetic neuropathy. Baseline analysis of neuropathy in feasibility phase of Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *Diabetes* 1988; 37: 476-81.
20. Schratzberger P, Schratzberger G, Silver M, Curry C, Kearney M, Magner M, Alroy J, Adelman LS, Weinberg DH, Ropper AH, Isner JM. Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nat Med* 2000; 6: 405-13.
21. Schratzberger P, Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Pola R, Curry C, Silver M, Krainin JG, Weinberg DH, Ropper AH, Isner JM. Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. *J Clin Invest* 2001; 107:1083-92.
22. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 260-4.