

مطالعه ژن کانیدیدا در رتینوپاتی دیابتی: ژن eNOS

جواد توگلی بزازی*^۱، ورا پراویکا^۲، آندره بولتون^۳، یان هاجینسون^۲

چکیده

مقدمه: نظر به تأثیرات هموستاتیک و پتانسیل‌های "تنظیم‌کنندگی" (Regulatory) نیتروژن اکسید (NO) در فیزیولوژی عروق، طی سال‌های اخیر توجه روزافزونی به نقش عوامل تنظیم‌کننده و آنزیم‌های سازنده این مولکول مهم حیاتی از جمله آنزیم "اندوتلیالی سنتزکننده NO" (eNOS) (که میزان تولید این ماده را در بافت عروقی کنترل می‌کند)، معطوف شده است. در دیابت به واسطه افزایش کاتابولیسم و کاهش تولید NO، نقصان در "فراهمی زیستی" این مولکول پدید می‌آید (NO quenching)، که این نقیصه در اشکال شدید خود با ایجاد اختلال در "اتساع عروقی" بافت‌های محیطی (به ویژه عضلات منخبط) و کاهش جریان خون موضعی، میزان برداشت وابسته به انسولین گلوکز را کاهش داده و در نهایت ایجاد عارضه "مقاومت به انسولین" را می‌نماید.

روش‌ها: در مطالعه حاضر، تأثیرات پلی‌مورفیسم ناحیه پروموتور ژن eNOS در موقعیت C/T*۷۸۶ (که قبلاً اثرات عملی آن در تعیین میزان نسخه‌برداری از ژن eNOS نشان داده شده)، بر ایجاد رتینوپاتی دیابتی در جمعیت مبتلا به دیابت نوع یک (T1DM) مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته‌ها: توزیع فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های این پلی‌مورفیسم در نزد جمعیت‌های شاهد (سالم) (۱۰۴ نفر)، بیمار (۲۴۹ نفر) و افراد مبتلا به رتینوپاتی دیابتی (۱۱۵ نفر)، اختلاف معنی‌داری را نشان داد، به نحوی که آلل C (که قبلاً نقش آن در کاهش فعالیت ناحیه پروموتور گزارش شده) فراوانی بیشتری در کل جمعیت بیماران ($P=0/04$) و به ویژه در نزد مبتلایان به رتینوپاتی در مقایسه با گروه شاهد (سالم) ($P=0/02$)، را واجد بوده است. توزیع آلل‌ها در بین دو زیرگروه دارای رتینوپاتی (۱۳۴ نفر) و بدون رتینوپاتی (۱۱۵ نفر)، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P=NS$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های مطالعه حاضر با تحقیقات قبلی که همراهی آلل C این پلی‌مورفیسم با مقادیر بالا و غیر طبیعی HbA1c را گزارش نموده‌اند، مطابقت داشته و ضمن طرح دوباره کارکردهای فنوتیپیک برای این پلی‌مورفیسم، تکرار انجام مطالعات مشابه و نیز ضرورت تحقیقات تکمیلی برای بررسی زمینه‌ها و امکان وارد نمودن آن به طب بالینی (مثلاً در تعیین نسبی پیش‌آگهی) را پیشنهاد می‌دهد.

واژگان کلیدی: ژنتیک، دیابت، ژنوتیپ، فنوتیپ، پلی‌مورفیسم، رتینوپاتی

۱- متخصص ژنتیک پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی بابل؛ 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

⁴ Nitric oxide

⁵ Endothelial Nitric Oxide Synthase

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم؛ تلفن:

۸۰۲۶۹۰۲-۸۰۲۶۹۰۹؛ پست الکترونیک: emrc@sina.tums.ac.ir

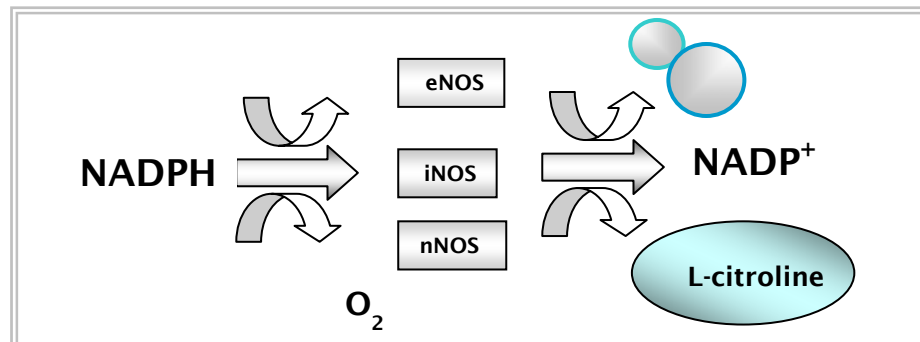
مقدمه

از میان سه ایزوفورم آنزیم NOS، نقش برجسته eNOS در بیماری‌های مختلف عروقی به ویژه از نقطه نظر ژنتیکی (بررسی نقش تغییرات ساختمانی ژن eNOS)، مورد تحقیقات گسترده‌ای واقع شده است [۲] و رابطه خاص این آنزیم با عوارض میکروآنژیوپاتی دیابت نیز موضوع مطالعات متعددی بوده است [۳-۶].

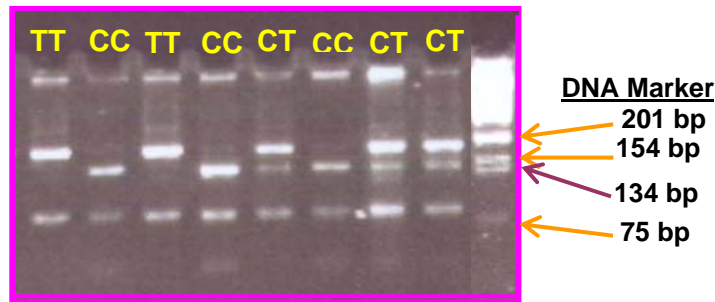
ژن eNOS

این ژن در موقعیت کروموزومی ۳۶-۷q۳۵ قرار دارد و از ۲۶ اگزون تشکیل یافته است. پلی مورفیسم‌های متعددی برای این ژن در مناطق پرموتر، اگزون و نیز اینترون گزارش شده است [۷،۸]. از میان این پلی مورفیسم‌ها، سه پلی مورفیسم بیشترین توجه محققین را به خود جلب نموده‌اند: پلی مورفیسم در موقعیت ۷۸۶*T/C در ناحیه پرموتر، پلی مورفیسم VNTR در اینترون ۴ و پلی مورفیسم "Non-Synonymous" در اگزون ۷ (۸۹۴*G/T) که موجب تغییر کدون ۲۹۸ می‌شود (Glu۲۹۸ASP). پلی مورفیسم موجود در ناحیه اینترون ۴ که دارای تأثیرات "عملی" (Functional) نیز می‌باشد، تاکنون خود موضوع مطالعات فراوانی بوده است [۹-۱۲]. در خصوص دو پلی مورفیسم باقیمانده دیگر، هر دوی آنها دارای پیوستگی (Association) با اختلالات "Vasomotility" بودند [۱۴-۱۳]، که پتانسیل فنوتیپیک مناسب آنها را جهت بررسی در بیماری‌های عروقی، از جمله رتینوپاتی پیشنهاد می‌دهد.

نیترژن اکساید (NO) نخستین گازی است که نقش آن به‌عنوان "پیام بر حیاتی" (Biological Messenger) در پستانداران شناخته شد. NO از تبدیل "ال- آرژینین" به "ال- سیترویلین" تحت اثر گروهی از آنزیمها بنام آنزیم‌های سنتز کننده NO (NOS)، تولید می‌شود (شکل ۱). NO به واسطه داشتن اندازه مولکولی بسیار کوچک و نیز قابلیت حل شدن در چربی، به راحتی از بین غشاء سلولها عبور می‌کند و با طول عمر کوتاه چند ثانیه‌ای خود معمولاً تأثیرات کوتاه مدتی را بر جای می‌گذارد. NO در ابتدا به دلیل تأثیرات مشخصی که سبب "شل کنندگی" و "اتساع عروق" می‌شده، با عنوان "فاکتور متسع کننده مشتق شده از اندوتلیوم" (Endothelium Derived Relaxation Factor) نامیده شد. مطابق این فعالیت، NO با دخالت در تنظیم فشار خون و "جریان خون منطقه‌ای" (Regional Blood flow)، نقش بسیار مهمی در همودینامیک و هموستاز عروقی ایفاء می‌نماید. با توجه به سه آنزیم مختلفی که سنتز NO را به عهده دارند، در بحث پاتوفیزیولوژی عروقی، عمده توجهات به ایزوآنزیم اندوتلیالی (Endothelial Nitric Oxide Synthase, eNOS) معطوف شده که دلیل آن، ماهیت و عملکرد این آنزیم است که ارتباط بیشتری با فیزیولوژی عروق دارد. به عنوان مثال ایجاد وقفه در عملکرد ژن eNOS در موش، در حالی که دو آنزیم دیگر NO دست نخورده بمانند، سبب پرفشاری خون می‌گردد [۱].



شکل ۱- مسیر تولید NO توسط ایزوآنزیم‌های NOS



شکل ۲- تصویر محصول PCR-RFLP مربوط به پلی مورفیسم 786*C/T بر روی ژل آگاروز (ژنوتایپ افراد مختلف- هر نوار- نیز مشخص شده است).

محصول تکثیر شده (282 bp) PCR در مرحله بعد توسط آنزیم MspI "برش" زده شد و بسته به وجود یا عدم وجود "توالی اختصاصی" برای اتصال این آنزیم (امکان یا عدم امکان اتصال)، قطعات مختلفی از نظر تعداد و طول حاصل شد:

2 (TT: 194, 88 bp), 3 (CC: 149, 88, 45 bp) or 4 (CT: 194, 149, 88, 45 bp)

در حالتی که ژنوتایپ CT بود، از آنجایی که هر دو آلل C و T ایجاد قطعاتی با طول یکسان نموده بودند (188bp)، بلدهای مربوط به این دوروی هم قرار گرفته و یک نوار "پرتنگ تر" را ایجاد نمودند. نوار با طول 45 bp به علت اندازه کوچکش قابل مشاهده نبوده است.

جدول ۱. توزیع فراوانی ژنوتایپ و آلل پلی مورفیسم ژن eNOS در موقعیت 786*C/T

در گروههای کنترل (C)، بیماران دیابت نوع یک (P)، دیابتی‌های دارای رتینوپاتی (DR+) و دیابتی‌های فاقد رتینوپاتی (DR-)

P value DR+/DR-	P value DR/C	P value P/C	DR n (%)	P n (%)	C n (%)	eNOS 786*C/T
۰/۶	۰/۰۷	۰/۱۱	۳۰ (۲۲/۳۹)	۵۰ (۲۰/۰۸)	۱۴ (۱۳/۴۶)	ژنوتایپ
			۶۵ (۴۸/۵۱)	۱۲۲ (۴۹)	۴۷ (۴۵/۱۹)	CC
			۳۹ (۲۹/۱۰)	۷۷ (۳۰/۹۲)	۴۳ (۴۱/۳۵)	CT
						TT
						آلل
۰/۳	۰/۰۲ ^b	۰/۰۳۶ ^a	۱۲۵ (۴۶/۶۴)	۲۲۲ (۴۴/۵۸)	۷۵ (۳۶/۰۶)	C
			۱۴۳ (۵۳/۳۶)	۲۷۶ (۵۵/۴۲)	۱۳۳ (۶۳/۹۴)	T

a: p (Fisher's exact test) = 0.037, $\chi^2 = 4.4$, OR= 1.4, CI (95%) = 1.0-2.0.

b: p (Fisher's exact test) = 0.025, $\chi^2 = 5.5$, OR= 1.6, CI (95%) = 1.0-2.0.

ضمن برخورداری از فراوانی بیشتر در نزد بیماران دیابت نوع یک، پیوستگی معنی‌داری را با مقادیر بالاتر HbA_{1c} و انسولین پلاسما در وضعیت ناشتا نشان داد که حکایت از ارتباط آن با وضعیتی مشابه به "مقاومت به انسولین" می‌نماید [۱۵]. این یافته که به کاهش فعالیت پروموتور ژن eNOS در صورت وجود آلل C در موقعیت پلی مورفیک

در ارتباط با بیماری دیابت، مطالعات انجام گرفته بر روی دو پلی مورفیسم 786*T/C- و ایترون ۴ دلالت بر رفتارهای متفاوت آنها داشته است. درحالیکه تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین توزیع الل‌های پلی مورفیک مربوط به پلی مورفیسم ایترون ۴ در نزد بیماران مبتلا به دیابت نوع دو در مقایسه با جمعیت شاهد (سالم) وجود نداشت، آلل 786*C-

بریتانیایی-قفقازی" و فاقد رابطه خویشاوندی با یکدیگر بودند. با توجه به وجود یا عدم وجود رتینوپاتی دیابتی، این بیماران به دو زیر گروه فاقد رتینوپاتی (DR^{-}) (۱۱۵ نفر) و دارای رتینوپاتی (DR^{+}) (۱۳۴ نفر) تقسیم شدند. تشخیص رتینوپاتی برای بیمارانی در نظر گرفته شد که در یک چشم، بیش از پنج "Dot" یا "Blot"، آگزودای نرم یا سخت، شواهد مربوط به تشکیل عروق جدید، "ماکولوپاتی" و بالاخره سابقه درمان با لیزر را داشته‌اند. بررسی بر روی افراد گروه شاهد و بیمار در این مطالعه، پس از تأیید "پروپوزال" مربوطه توسط کمیته اخلاق پزشکی بیمارستان رویال منچستر (Manchester Royal Infirmary) و همچنین اخذ رضایت از کلیه افراد، صورت گرفت.

ج - تعیین نوع آلل / ژنوتیپ پلی مورفیک

با تهیه حدود ۵ ml خون محیطی از جمعیت های مورد مطالعه، DNA موجود در گلبول های سفید استخراج گردید. برای تعیین نوع آلل و ژنوتایپ پلی مورفیسیم مورد بررسی، از بین انواع تکنیک‌های موجود برای انجام PCR، روش RFLP^۳، انتخاب شد. این روش که در دو مرحله (انجام PCR و سپس برش محصول PCR توسط آنزیم) انجام می‌گیرد، از دقت نسبتاً بالایی برخوردار است. پس از طراحی پرایمرهای ویژه برای پلی مورفیسیم قطعه هدف، "Set up" لازم جهت تایپ کردن پلی مورفیسیم مورد مطالعه، صورت گرفت. توالی پرایمرهای طراحی شده برای پلی مورفیسیم ژن eNOS در ذیل نمایش داده شده است:



در نهایت محصول PCR که در واقع حاوی تعداد بسیار بالایی (چندین میلیون کپی) از توالی مورد نظر DNA (در بردارنده موقعیت پلی مورفیک مورد مطالعه) بوده، توسط یک آنزیم (Restriction enzyme) خاص به نام "MspI" که ابتدا به توالی خاصی از DNA (ترسیم شده در کادر

۷۸۶ نسبت داده شده، ثانوی به این است که آلل C برخلاف آلل T، قابلیت اتصال پروموتور با یک "پروتئین متصل شونده به DNA" (به نام Replication Protein A1) را که نقشی ضروری در ترمیم و تکثیر DNA دارد، فراهم می‌کند که نتیجه نهایی آن کاهش فعالیت پروموتور و کاهش بیان ژن eNOS است [۱۶].

با توجه به نقش مهم NO در فرآیند اتساع موضعی عروق در بافت محیطی (به ویژه عضلات مخطط) و تنظیم جریان خون موضعی، کاهش NO مشتق شده از سلول‌های اندوتلیال می‌تواند سبب نقصان این اتساع عروقی و نیز نقصان جریان خون موضعی گشته و در نهایت وضعیتی مشابه "مقاومت به انسولین" را ایجاد کند [۱۷]. در خصوص قابلیت‌های فنوتیپیک پلی مورفیسیم C/T*۷۸۶، مطالعه دیگری وجود پیوستگی بین آلل C این پلی مورفیسیم و افزایش "Basal Tone" و همچنین افزایش انقباض عروق کرونری در نتیجه کاهش سنتز NO اندوتلیالی را گزارش نموده است [۱۴].

روش‌ها

الف - گروه شاهد (Healthy Controls)

جمعیت این گروه (۱۰۴ نفر) از بین افرادی انتخاب شدند که سالم بوده و سابقه هیچ بیماری مشخص یا مزمنی (از جمله دیابت) بین آنها و همچنین بستگان درجه اول (First Degree Relatives) آنها موجود نبوده است. این افراد که به طور تصادفی انتخاب گردیدند، نسبت خانوادگی با یکدیگر نداشتند. همه افراد این جمعیت از نژاد "بریتانیایی-قفقازی" بودند.

ب - بیماران

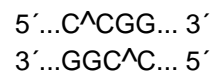
از بین حدوداً ۵۰۰۰ نفر بیمار مبتلا به دیابت که به عنوان بیمار "ثبت شده" در "مرکز دیابت منچستر" در شهر منچستر انگلستان دارای پرونده و سابقه بودند، تعداد ۲۴۹ نفر آنها که به بیماری دیابت نوع یک مبتلا بوده و در زمان مطالعه (سال‌های ۲۰۰۲-۱۹۹۹) حداقل ۵ سال از زمان آغاز و تشخیص بیماری دیابت آنها گذشته بود، به صورت تصادفی انتخاب شدند. تمامی افراد بیمار از نژاد "

¹ Diabetic Retinopathy

² Polymerase Chain Reaction

³ Restriction Fragment Length Polymorphism

ذیل) می چسبد و سپس در موقعیت های خاصی (مشخص شده با علامت ^۸)، آن را برش می زند، برش زده شد.



محصول برش زده شده که بسته به نوع پلی مورفیسم، حاوی قطعاتی با طول و اندازه مختلف بود، بر روی ژل آگاروز نشانده و الکتروفورز شد و با تابش اشعه ماوراء بنفش و مشاهده طول و تعداد نوارهای DNA، نوع ژنوتیپ و آلل مشخص گردید (شکل ۲).

یافته‌ها

در مطالعه حاضر توزیع فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم ژن eNOS در موقعیت C/T*۷۸۶ در بین گروه‌های شاهد (سالم)، بیمار و همچنین بیماران مبتلا به رتینوپاتی (DR⁺)، تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (جدول ۱). آلل C (که کاهش فعالیت ناحیه پروموتور را موجب می‌شود)، در کل جمعیت بیماران (P=۰/۰۴) و خصوصاً در نزد مبتلایان به رتینوپاتی در مقایسه با گروه شاهد (سالم) (P=۰/۰۲)، از فراوانی بیشتری برخوردار بوده، در حالی که توزیع آلل‌های پلی مورفیک در بین دو زیرگروه واجد رتینوپاتی (DR⁺) و فاقد رتینوپاتی (DR⁻)، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P=۰/۵۸).

بحث

درحالی‌که توزیع فراوانی ژنوتایپ‌های پلی مورفیک، اختلاف معنی‌داری را در دو گروه بیماران دیابتی و کنترل نشان نداد، این توزیع در سطح آلل‌ها دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای بود و فراوانی آلل C مطابق پیش‌بینی اولیه، در نزد بیماران بیشتر از گروه کنترل بود. این یافته که نقش مستعد کننده آلل C در ابتلاء به دیابت را مطرح می‌سازد، تلویحاً بر دخالت پدیده "مقاومت به انسولین" در ایجاد دیابت نوع یک اشاره دارد. با وجود آنکه اهمیت پدیده "مقاومت به انسولین" در ایجاد دیابت نوع دو از مدت‌ها قبل شناخته شده، اما تا چندی پیش نقش این پدیده یعنی نقصان در عملکرد انسولین

معرفی می‌شده است. مطالعات اخیر حضور موثر و نقش جدی پدیده "مقاومت به انسولین" را در پاتوژنز دیابت نوع یک (البته نه در حد اهمیت آن در دیابت نوع دو) گزارش نموده‌اند [۱۸]. با آنکه فراوانی آلل C در نزد کل بیماران دیابتی در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان می‌داد، (P=۰/۰۴)، اما این افزایش در هنگام مقایسه بیماران مبتلا به رتینوپاتی با افراد گروه کنترل، بارزتر بود (P=۰/۰۲). از آنجا که نقش "بازدارندگی" NO (Counter-regulatory) برای VEGF امری ثابت شده است [۱۹]، کاهش میزان بیان ژن eNOS در صورت وجود آلل C و در نتیجه کاهش میزان NO می‌تواند با تضعیف تأثیرات مهارتی آن بر ترشح VEGF، سبب افزایش غیرطبیعی این عامل گردد. VEGF به عنوان عاملی که هم قابلیت‌های آنژیوژنیک و هم تشدید کننده تراوایی عروق (Hypermeability) را داراست، در رأس میانجی‌هایی است که از قابلیت ایجاد و پیشرفت رتینوپاتی برخوردار هستند [۲۰]. البته کاهش سطح NO به طور مستقیم نیز می‌تواند در ایجاد و پیشرفت رتینوپاتی دیابتی دخیل باشد. با توجه به طبیعت و پاتوفیزیولوژی عوارض دیررس مختلف دیابت که تفاوت آشکاری با یکدیگر دارند، مطالعات صورت گرفته نشان داده‌اند که جدا از تغییرات سیستمیک سطح NO در بیماری دیابت که معمولاً به صورت کاهش است (NO quenching) [۲۱]، عموماً الگوی تغییرات موضعی NO در بستر عارضه نوروپاتی دیابتی در مقایسه با دو عارضه رتینوپاتی و نوروپاتی، متفاوت است. افزایش NO در نوروپاتی دیابتی (با القاء هیپرفیلتراسیون کلیوی و هیپرپرفوزیون) و کاهش NO در رتینوپاتی و نوروپاتی دیابتی (با توجه به نقش حمایتی و مثبت NO در فیزیولوژی عروق از طریق حفظ تمامیت و تثبیت هموستاز عروقی) به عنوان عوامل زمینه‌ساز و پیش‌برنده معرفی شده است [۲۲، ۲۳].

¹ Vascular Endothelial Growth Factor

کانیدایا فوق‌الذکر و رتینوپاتی دیابتی وجود دارد و در حقیقت وجود پدیده "پیوستگی ترجیحی" (Linkage Disequilibrium) بین آن ژن و ژن eNOS، حصول نتایج حاضر را سبب گردیده و در واقع ژن eNOS علت اصلی این "پیوستگی" (Association) نیست. البته تکرار مطالعه در جمعیت‌های دیگر و نیز بررسی نقش تغییرات ساختمانی ژن‌های "ALR2" و "TCRBC" می‌تواند در جهت تفکیک نقش این ژن‌ها از یکدیگر و شناخت تأثیرات منفرد و مستقل هر یک از آنها، راهگشا باشد.

یافته بدست آمده در مطالعه حاضر با مطالعه دیگری که نقش تغییرات پلی‌مورفیک ژن eNOS در ناحیه اینترون ۴ را بر رتینوپاتی دیابتی مورد بررسی قرار داده، دارای تفسیر و پیامی هماهنگ می‌باشد [۶]. از آنجا که حداقل دو ژن کانیدایا دیگر مربوط به رتینوپاتی دیابتی یعنی ژن "آلدوز ردوکتاز" (ALR2) و ژن مربوط به "زنجیره بتای گیرنده آنتی‌ژنیک سلولهای T" (TCRBC) نیز در موقعیت کروموزومی مشابهی (7q35) جای گرفته‌اند، نتایج مثبت این مطالعه مبنی بر وجود پیوستگی بین پلی‌مورفیسم ژن eNOS و رتینوپاتی دیابتی، می‌تواند پدیده‌ای ثانوی و ناشی از وجود پیوستگی اولیه‌ای باشد که بین یکی از ژنهای

مآخذ

- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377: 239-42.
- Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 2000; 70: 241-51.
- Cai H, Wang X, Colagiuri S, Wilcken DE. A common Glu298-->Asp (894G-->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and vascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21: 2195-6.
- Zanchi A, Moczulski DK, Hanna LS, Wantman M, Warram JH, Krolewski AS. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int* 2000; 57: 405-13.
- Asakimori Y, Yorioka N, Taniguchi Y, Ito T, Ogata S, Kyuden Y, Kohno N. T(-786)-->C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene influences the progression of renal disease. *Nephron* 2002; 91: 747-51.
- Taverna MJ, Sola A, Guyot-Argenton C, Pacher N, Bruzzo F, Chevalier A, Slama G, Reach G, Selam JL. eNOS4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase predicts risk for severe diabetic retinopathy. *Diabet Med* 2002; 19: 240-5.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 17478-88.
- Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 1027-33.
- Neugebauer S, Baba T, Watanabe T. Association of the nitric oxide synthase gene polymorphism with an increased risk for progression to diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000; 49: 500-3.
- Fujita H, Narita T, Meguro H, Ishii T, Hanyu O, Suzuki K, Kamoi K, Ito S. Lack of association between an eNOS gene polymorphism and diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* 2000; 32: 80-3.
- Shimizu T, Onuma T, Kawamori R, Makita Y, Tomino Y. Endothelial nitric oxide synthase gene and the development of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 58: 179-85.
- Rippin JD, Patel A, Belyaev ND, Gill GV, Barnett AH, Bain SC. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2003; 46: 426-8.
- Philip I, Plantefeve G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, Poirier O, Levy BI, Desmonts JM, Durand G, Benessiano J. G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation* 1999; 99: 3096-8.
- Yoshimura M, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Nakamura S, Ito T, Mizuno Y, Harada E, Yasue H, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K. A T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary arterial vasomotility. *Am J Cardiol* 2000; 85: 710-4.

15. Ohtoshi K, Yamasaki Y, Gorogawa S, Hayaishi-Okano R, Node K, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Hori M. Association of (-)786T-C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene with insulin resistance. *Diabetologia* 2002; 45: 1594-601.
16. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, Harada M, Kajiyama N, Kishimoto I, Kuwahara K, Hino J, Ogawa E, Hamanaka I, Kamitani S, Takahashi N, Kawakami R, Kangawa K, Yasue H, Nakao K. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2629-37.
17. Baron AD, Steinberg H, Brechtel G, Johnson A. Skeletal muscle blood flow independently modulates insulin-mediated glucose uptake. *Am J Physiol* 1994; 266: E248-E253.
18. Furlanos S, Narendran P, Byrnes GB, Colman PG, Harrison LC. Insulin resistance is a risk factor for progression to type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2004; 47: 1661-7.
19. Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzenbichler B, Kearney M, Couffinhal T, Isner JM. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med* 1997; 3: 879-86.
20. Wilkinson-Berka JL. Vasoactive factors and diabetic retinopathy: vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2 and nitric oxide. *Curr Pharm Des.* 2004; 10: 3331-48.
21. Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ES, Rabelink TJ. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 241-9.
22. Santilli F, Cipollone F, Mezzetti A, Chiarelli F. The role of nitric oxide in the development of diabetic angiopathy. *Horm Metab Res.* 2004; 36: 319-35.
23. Endemann DH, Schiffrin EL. Nitric oxide, oxidative excess, and vascular complications of diabetes mellitus. *Curr Hypertens Rep.* 2004; 6: 85-9.