مجله دیابت و لیپید ایران. بهمن- اسفند ۱۳۸۹؛ دوره ۱۰ (شماره ۳) ۳۰۵-۲۹۹

بررسی نقش e-Nos در عوارض میکرو واسکولار دیابت نوع ۲

مهدیه مهراب محسنی[۱]، مهسا محمدآملی[۲*]، شیرین حسنی زنجبر[۲]، ناهید روحی‌پور[۲]، پروین امیری[۲]، ارغوان کورش‌نیا[۲]، رامین حشمت[۲]، باقر لاریجانی[۲]، جواد توکلی بزاز[۲]، محمد نبیونی[۳]

چکیده

مقدمه: اکسید نیتریک اندوتلیال سبب افزایش استعداد ابتلا به دیابت نوع ۲ و مقاومت به انسولین، می‌گردد. در مطالعات گذشته چندین پلی‌مورفیسم ژن eNOS بررسی و نشان داده شده است که بین هاپلونوع‌های ژن eNOS با دیابت نوع ۲ و عوارض دیابت در جمعیت‌های گوناگون ارتباط وجود دارد. همچنین ارتباط بین پلی‌مورفیسم VNTR اینترون۴ eNOS با عملکرد اندوتلیال و خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ گزارش شده است. هدف از این مطالعه یافتن ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و دیابت نوع ۲ یا عوارض میکرو واسکولار آن در مقایسه با جمعیت کنترل سالم در یک جمعیت ایرانی می‌باشد.

روش‌ها: از ۲۲۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و کنترل سالم که همگی آن‌ها از کلینیک دیابت بیمارستان علی‌بن ابیطالب وابسته به دانشگاه رفسنجان انتخاب شده بودند، نمونه تهیه شد.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌داری در فراوانی ژنوتایپ پلی‌مورفیسم eNOS بین بیماران و گروه کنترل مشاهده شد (۳/۹۶-۰/۰۵: ۹۵٪ CI، ۲/۰ =OR، ۰/۰۲=P، bb در برابر aa+ab). همچنین فراوانی آلل a در بیماران دیابتی در مقایسه با گروه کنترل افزایش چشمگیری داشت (۴/۰۸-۱/۱۹: ۹۵٪ CI، ۲/۱=OR، ۰/۰۷=P). فراوانی آلل a در بیماران مبتلا به نوروپاتی دیابتی نسبت به گروه کنترل، نیز افزایش چشم‌گیری داشت (۳/۷-۱/۰۰: ۹۵٪ CI، ۱/۸=OR، ۰/۰۳=P). به علاوه فراوانی آلل a و ژنوتایپ بین بیماران فاقد عوارض و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشت، به ترتیب: [(۵/۸-۱/۲: ۹۵٪ CI؛ ۲/۶=OR، ۰/۰۰۷=P، bb در برابر aa+ab)، (۹/۵-۱/۴: ۹۵٪ CI؛ ۲/۸=OR، ۰/۰۰۱=P)].

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های ما وجود ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن eNOS و دیابت نوع ۲ و عوارض ناشی از آن را در جمعیت ایرانی تأیید می‌کند. هر چند، ارتباط بین پلی‌مورفیسم VNTR و ژن eNOS و T2DM در بیماران دیابتی بدون عوارض چشم‌گیرتر می‌باشد و به نظر می‌رسد پلی‌مورفیسم ژن eNOS بر روی دیابت و عوارض میکرو واسکولار آن اثر دوگانه دارد.

واژگان کلیدی: eNOS، پلی‌مورفیسم، VNTR ، عوارض مزمن دیابت نوع ۲

۱- دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده علوم زیستی، آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی

* ***نشانی:*** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷ ، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲ ، پست الکترونیک: amolimm@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۰۹/۱۴ **تاریخ درخواست اصلاح: ۸۹/۱۰/۲۸** **تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۰۳**

مقدمه

اکسید نیتریک (NO) در سلول‌های اندوتلیال، بوسیله آنزیم eNOS تولید شده و از چند طریق باعث وازودیلاسیون (اتساع عروق) می‌شود و در اثرگذاری انسولین بر عروق و انتقال انسولین و گلوکز به ماهیچه‌های اسکلتی نقش دارد [۱]. eNOS متابولیسم کبدی و محیطی گلوکز و ترشح انسولین را تعدیل کرده، نقش مهمی را در بروز دیابت نوع ۲ و مقاومت به انسولین بازی می‌کند [۲]. در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و خویشاوندان درجه ۱ آن‌ها و همچنین بیماران مبتلا به سندرم مقاومت به انسولین افزایش سطح NO و نقص در عملکرد اندوتلیال عروقی مشاهده می‌گردد [۳]. رخداد و پیشرفت میکرو آلبومینوریا (دفع مقادیر اندک آلبومین در ادرار)، با نقص در عملکرد اندوتلیال ارتباط داشته و با توجه به نقش ضروری NO در فیزیولوژی اندوتلیال، فعالیت ناقص NO در افراد دیابتی مورد توجه قرار گرفته است [۴]. چنین نقصی در فعالیت NO، می‌تواند به کاهش سنتز یا افزایش کاتابولیسم NO منجر شود، که افزایش کاتابولیسم NO در دیابت محتمل‌تر به نظر می‌رسد [۵]. از آن جایی که در مطالعات آزمایشگاهی در نتیجه تیمار سلول با غلظت بالای گلوکز، هم بیان ژن NOS و هم فعالیت NO افزایش می‌یابد [۶]، می‌توان به طور غیرمستقیم نتیجه گرفت که افزایش کاتابولیسم NO در بیماران دیابتی در نتیجه سایر عوارض متابولیکی و نه هیپرگلیسمی رخ دهد.

NO سبب ترشح انسولین از سلول‌های β می‌شود و به فاز اولیه آزادسازی انسولین (در اثر تحریک گلوکز) وابسته است [۷]. از آن جایی که سلول‌های β غالباً قادر به بیان مداوم NOS نیستند، سلول‌های مولد گلوکاگون ($\alpha - islet$) و تا حدی سلول‌های مولد سوماتوستاتین ($\delta - cells$) NOS را بیان کرده و NO تولید شده در سلول‌های β منتشر شده و باعث القای ترشح انسولین به صورت پاراکرین می‌شود.

مکانیسم ترشح انسولین توسط NO از طریق افزایش کلسیوم درون سلولی (با حرکت یون‌های کلسیم از ذخائر درون سلولی، ER و میتوکندری) است [۸]. در عوارض دیابت، در حالی که تولید بیش از حد NO، باعث نفروپاتی دیابتی (با القای هیپرفیلتراسیون و هیپر پرفیوژن کلیوی) می‌شود [۹]، با توجه به نقش حمایتی NO در فیزیولوژی اندوتلیال و عروق، ممکن است NO با مکانیسمی متفاوت در بروز سایر عوارض دیابتی مؤثر باشد. NO می‌تواند یک تنظیم‌کننده معکوس برای VEGF باشد. بیان VEGF بوسیله NO ترشح شده از اندوتلیوم، کاهش می‌یابد [۱۰]. NO سنتز شده بوسیله eNOS، علاوه بر اثری که بر روی فشار خون و تون عروق دارد، اکسیداسون LDL را محدود می‌کند [۱۱].

ژن eNOS بر روی کروموزم ۳۵-۳۶ q ۷ واقع شده و حاوی ۲۶ اگزون بوده و kb ۲۱ طول دارد. تا کنون چندین پلی‌مورفیسم در پروموتر و نواحی اگزون و اینترون آن گزارش شده است [۱۲،۱۳]. ارتباط پلی‌مورفیسم VNTR (تکرار ۲۷bp) در اینترون ۴ ژن eNOS با بسیاری از بیماری‌های عروقی از جمله پرفشاری خون، بیماری عروق کرونری یا آنفارکتوس میوکاردی، اسپاسم و گرفتگی کرونری، بیماری عروق مغزی، رتینوپاتی دیابتی و نفروپاتی دیابتی در جمعیت‌های گوناگون یافت شده است [۱۶-۱۴]. آلل a ژن eNOS با کاهش غلظت پلاسما و عملکرد ناقص اندوتلیال در دیابت تیپ ۲ ارتباط دارد. پیش از این ارتباط بین موتاسیون Glu ۲۹۸ Asp در اگزون ۷ با دیابت نوع ۲ و سندرم مقاومت به انسولین اثبات شده است [۳]. هر چند نتایج متناقض نیز مشاهده شده است [۱۶]. در گذشته مطالعاتی بر روی ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژن eNOS با دیابت نوع ۲ و عوارض میکرو واسکولار آن صورت گرفته و این ارتباط بین پلی‌مورفیسم T/C ۷۸۶- و Glu ۲۹۸ Asp اگزون ۷ یافت شده [۱۶] که این ممکن است به دلیل linkage disequilibrium (LD) با پلی‌مورفیسم اینترون ۴ باشد [۱۶]. در گذشته اثبات شده است که تنوع نژادی و جغرافیایی در توزیع پلی‌مورفیسم‌های ژن eNOS و بخصوص در نژاد قفقازی دارای اهمیت بسزایی است.

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم VNTR ژن eNOS با دیابت نوع ۲ و عوارض آن در جمعیت ایرانی بود.

روش‌ها

گروه مورد مطالعه شامل ۲۲۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ بود که به کلینیک دیابت بیمارستان علی‌بن ابیطالب وابسته به دانشگاه رفسنجان مراجعه می‌نمودند. ۹۶ کنترل سالم از همان منطقه در نظر گرفته شد. نژاد همه داوطلبانی که برای این مطالعه انتخاب شده بودند، فارس بود. جمعیت ناخالص (مخلوط) در این محدوده بسیار نادر و افراد از سایر نژادها به این مطالعه وارد نشدند. پس از اخذ اطلاعات شخصی و دموگرافیک، cc ۳-۵ خون وریدی در لوله‌های EDTA جمع‌آوری شد و برای استخراج DNA در دمای $-20^{o}C$ ذخیره شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه تهران تصویب شد. از همه بیمارانی که در مطالعه شرکت کردند، رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید.

معیارهای تشخیص

تشخیص بیماری دیابت بر طبق ضوابط American Diabetes Association Criteria انجام شد [۱۷]. رتینوپاتی دیابتی بوسیله متخصص چشم بر اساس آزمایشات و معاینات شبکیه و چشم تأیید شد. نفروپاتی دیابتی با میکرو آلبومینوریای بیشتر از ۳۰ mg/۲۴ h و پروتئینوریا در ۲ یا ۳ نمونه ادرار تأیید شد. نوروپاتی بر اساس علائم تعریف شده از سوی Diabetes Control and Complication Trial criteria تشخیص داده شد [۱۸]. بیماران واجد زخم پای naturopathic، نوروپات در نظر گرفته شدند.

استخراج DNA و تعیین ژن و نوع

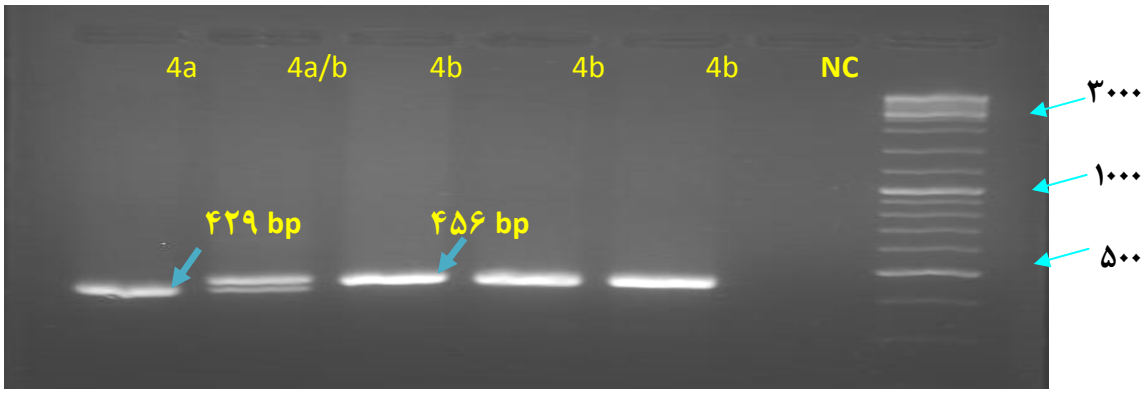
DNA از خون غیر آگلوتینه که در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شده بود، به روش salting out استخراج گردید. تعیین ژن و نوع با استفاده از روش PCR، صورت گرفت [۱۹]. توالی پرایمرهای طراحی شده و اندازه محصولات در جدول ۱ ذکر گردید.

از محلول master mix برای تکثیر DNA در موقعیت VC/T-۷- استفاده گردید که شامل مواد ذیل بود:

DNA ژنومی ۳ µl، جفت پرایمر اختصاصی Pmol/µl ۰/۵، آمپلی کون ۲/۵ µl حاوی (۰/۴ mM dNTPs، آنزیم Taq DNA پلی‌مراز ۰/۰۵ Units/ul (این آنزیم باید به صورت ۰/۵Xاستفاده شود)، رنگ قرمز و یک پایدار کننده، mM $(NH_4)_2so_4$ ۴۰ یا $mgcl_2$ ۴-۳mM، ۰/۲٪ tween ۲۰ mM ۱۵۰ Tris-HCl و ۸/۵=PH).

پس از درب‌بندی این مخلوط واکنش ۱۰ میکرولیتری در یک دستگاه ترموسایکلر (MJ Research Inc) با برنامه ذیل تکثیر شد:

تغییر ماهیت اولیه $95^{o}C$ به مدت ۴ دقیقه، ۲۹ چرخه با شرایط: ۳۰ ثانیه در $95^{o}C$ (Denaturation)، ۳۰ ثانیه در $60^{o}C$ (annealing)، ۳۰ ثانیه در $72^{o}C$ (extention) و ۵ دقیقه در $72^{o}C$ (extention) (مرحله نهایی امتداد یافتن پرایمر). جهت اطمینان از تکثیر اختصاصی قطعه ژنی مورد نظر که ۴۵۶ یا ۴۲۹ جفت باز طول دارد نمونه‌های ژنومی تکثیر شده (محصولات PCR)، در حضور شناساگر، روی ژل آگاروز ۴ درصد تحت ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز گردید و باند مورد نظر مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- تصویر ژل آگاروز برای تعیین ژنوتیپ های پلی‌مورفیسم ژن eNOS در ناحیه نوکلئوتیدی اینترون a/b ۴.

آنالیز آماری

میزان ارتباط بین گروه‌های متفاوت و آلل‌ها یا ژنوتایپ‌های پلی‌مورفیسم ژن eNOS، با استفاده از فاصله اطمینان ۹۵٪ و نسب شانس (OR)، تخمین زده شد. برای آنالیز داده‌ها از Chi-square یا Fisher exact استفاده شد. آنالیز رگرسیون لجستیک برای همسان‌سازی استفاده شد. در رگرسیون لجستیک گروه کنترل سالم، بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، بیماران دیابتی دارای عوارض، به عنوان متغیرهای مستقل و نمایه توده بدن، دور کمر، فشار خون دیاستولی یا سیستولی، به عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. همه آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار STATA ویرایش ۸ و SPSS ویرایش ۱۱/۵ صورت گرفت. P≤۰/۰۵ به عنوان اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشخصات داوطلبان در جدول ۲ آمده است. متوسط سن بیماران دیابتی ۱۰±۵۰ سال بود. متوسط BMI بیماران دیابتی ۴±۲۷ kg/m^2 و کنترل‌های سالم ۳±۲۳ kg/m^2 بود.

فراوانی ژنوتایپ و آلل پلی‌مورفیسم VNTR ژن eNOS در بیماران دیابتی و کنترل‌های سالم:

فراوانی ژنوتایپ و آلل پلی‌مورفیسم eNOS در هر ۲ جمعیت کنترل سالم و بیمار با تعادل هاردی- وینبرگ تطابق داشت. هنگامی که فراوانی پلی‌مورفیسم ژن eNOS را در بیماران دیابتی با گروه کنترل مقایسه شد، مشاهده گردید که فراوانی ژنوتایپ aa+ ab در برابر bb در بیماران دیابتی بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (جدول۳) [۳/۹۶-۱/۰۵: ۹۵٪ CI، ۲/۰ =OR، P=۰/۰۲، bb در برابر aa+ab)]. به علاوه فراوانی آلل a در بیماران دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت (جدول۳) (۴/۰۸-۱/۱۹: ۹۵٪ CI، ۲/۱ =OR، P=۰/۰۷).

فراوانی ژنوتایپ و آلل پلی‌مورفیسم VNTR ژن eNOS در بیماران دیابتی مبتلا به عوارض دیابتی:

ارتباط معنی‌داری بین فراوانی ژنوتایپ یا آلل پلی‌مورفیسم eNOS و بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی یا رتینوپاتی دیابتی وجود نداشت (جدول۳). در هر صورت، فراوانی آلل در بیماران مبتلا به نوروپاتی در مقایسه با گروه کنترل افزایش چشم‌گیری داشت (جدول۳) (۳/۷-۱/۰۰: ۹۵٪ CI، OR=۱/۸، P=۰/۰۳).

فراوانی ژنوتایپ‌های پلی‌مورفیسم VNTR ژن eNOS در بیمارانی که عوارض نداشتند در مقایسه با گروه کنترل تفاوت بسیار معنی‌داری داشت : [(۵/۸-۱/۲، ۹۵٪ CI؛ OR=۲/۶، P=۰/۰۰۷، bb در برابر (aa+ab)]. همچنین فراوانی آلل a در بیماران بدون عوارض دیابتی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت (۵/۹-۱/۴، ۹۵٪ CI؛ OR=۲/۸، P=۰/۰۰۱).

تفاوت معنی‌داری بین فراوانی ژنوتایپ و آلل ژن eNOS در بیماران فاقد عوارض و بیماران واجد نوروپاتی دیابتی، نفروپاتی دیابتی، یا رتینوپاتی دیابتی مشاهده نشد.

جدول ۱ -توالی پرایمرهای طراحی شده برای پلی‌مورفیسم‌های ژنeNOS

eNOS(VNTR)	Forward primer sequence	5́-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3́
	Reverse primer sequence	5́-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3́

جدول۲- مشخصات بیماران دیابتی مبتلا به زخم پای دیابتی (DFU)، بیماران دیابتی فاقد زخم پای دیابتی (P) و کنترل‌های سالم (C)

متغیرهای کیفی تعداد (درصد)	C تعداد (درصد)	P تعداد (درصد)
جنسیت		
مرد	(۵۸/۲)۵۷	(۲۸/۱)۶۶
زن	(۴۱/۸)۴۱	(۷۲)۱۶۹
سن(سال)	۵۴±۱۰	۵۳±۱۰
فشار خون سیستولی(میلی‌متر جیوه)	۱۹ ± ۱۲۵	۲۱ ± ۱۳۵♦
فشار خون دیاستولی(میلی‌متر جیوه)	۱۹ ± ۷۹	۱۰ ± ۸۴♦♦
نمایه توده بدن(kg/m^2)	۳ ± ۲۳	۴ ± ۲۷#
دور کمر(cm)	۱۰ ± ۹۱	۹ ± ۹۱

در آزمون Chi-square و t-test، P ≤ ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

♦در افراد دیابتی افزایش معنی داری در فشار خون سیستولی مشاهده گردید(P< ۰/۰۰۱).

♦♦ در افراد دیابتی افزایش معنی داری در فشار خون دیاستولی مشاهده گردید(P= ۰/۰۰۲).

در افراد دیابتی افزایش معنی‌داری در نمایه توده بدن مشاهده گردید(P< ۰/۰۰۱).

جدول ۳- توزیع فراوانی ژنوتایپ و آلل پلی‌مورفیسم VNTR اینترون ۴ ژن eNOS در کنترل‌های سالم (C)، افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ (P)، افراد مبتلا به نوروپاتی دیابتی (DNU)، افراد مبتلا به نفروپاتی دیابتی (DN)، افراد مبتلا به رتینوپاتی دیابتی (DNU) گروه فاقد عوارض دیابت (CF)

eNOS intron4 VNTR	C تعداد (درصد)	P تعداد (درصد)	DR تعداد (درصد)	DN تعداد (درصد)	DNU تعداد (درصد)	CF تعداد (درصد)
ژنوتایپ bb	(۸۳)۸۰	(۷۱)۱۵۷#و##	(۷۶)۳۱	(۸۰)۱۶	♦(۷۴)۱۰۸	(۶۲)۴۷*و**
ab	(۱۷)۱۶	(۲۵)۵۴	(۲۲)۹	(۲۰)۴	(۲۳)۳۳	(۲۸)۲۰
aa	(۰)۰	(۴)۹	(۲)۱	(۰)۰	(۳)۵	(۷)۵
آلل b	(۹۲)۱۷۶	(۸۴)۳۶۸	(۸۶)۷۱	(۹۰)۳۶	(۸۵)۲۴۹	(۷۹)۱۱۴
a	(۸)۱۶	(۱۶)۷۲	(۱۴)۱۱	(۱۰)۴	(۱۵)۴۳	(۲۱)۳۰

در آزمون Chi-square، P≤۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

(۹۶/۳-۱/۰۵؛ ٪۹۵ CI، ۲/۰ OR، P=۰/۰۲، bb در برابر aa+ab)

(۰۸/۴-۱/۱۹؛ ٪۹۵ CI، ۲/۱ OR، P=۰/۰۷)

♦ (۷/۳-۱/۰۰؛ ٪۹۵ CI، ۱/۸=OR، P=۰/۰۳)

* (۸/۵-۱/۲؛ ٪۹۵ CI، ۲/۶=OR، P=۰/۰۰۷، bb در برابر aa+ab)

** (۵/۹-۱/۴؛ ٪۹۵ CI، ۲/۸=OR، P=۰/۰۰۱)

بحث

در بین پلی‌مورفیسم‌های ژن eNOS، ۳ پلی‌مورفیسم اصلی، T/C*۷۸۶-در ناحیهٔ۵ ژن، پلی‌مورفیسم VNTR در اینترون ۴ و Glu ۲۹۸ Asp (۸۹۴ G/T*) در اگزون ۷ از لحاظ تاثیر در عملکرد ژن حائز اهمیت بیشتری می‌باشند. نقصان در NO ساخته شده توسط eNOS، باعث کاهش اتساع عروقی (خصوصاً ماهیچه اسکلتی) و جریان خون موضعی می‌شود. از آن جایی که جریان خون ماهیچه اسکلتی، جذب گلوکز به واسطه انسولین را تنظیم می‌کند، اتساع ناقص عروق موجب مقاومت به انسولین می‌شود [۲۰].

در گذشته مشخص شده است که پلی‌مورفیسم‌های ژن eNOS با دیابت نوع ۲، هیپر انسولینمی (بالا بودن انسولین خون)، مقاومت به انسولین، لیپیدهای پلاسما، نمایه توده

بدن و سندرم متابولیک ارتباط دارد [۲۱،۲۳–۳]. هرچند این ارتباطات در مطالعات گوناگون بحث برانگیز بوده است که ممکن است به علت اختلاف نژادی جمعیت‌ها، حجم نمونه یا طراحی مطالعه باشد. همچنین هاپلونوع eNOS با نفروپاتی [۱۵] و رتینوپاتی دیابتی در جمعیت‌های مختلف ارتباط دارد [۱۶]. در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده است مشخص گردید بین پلی‌مورفیسم T/C*۷۸۶– ژن eNOS و رتینوپاتی در دیابت نوع ۱ ارتباط وجود دارد [۲۴].

در مطالعه‌ای دیگر که بر روی اثر پلی‌مورفیسم ژن eNOS بر روی اتساع عروقی وابسته به NO انجام گردیده، مشاهده شد که فقط پلی‌مورفیسم VNTR اینترون۴ (نه پلی‌مورفیسم‌های موقعیت، G/T* ۸۹۴ T/C* ۷۸۶–) با عملکرد اندوتلیال مرتبط است و فعالیت eNOS موجب افزایش خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ می‌شود [۲۵].

توزیع پلی‌مورفیسم VNTR اینترون۴ ژن eNOS در ارتباط با گسترش دیابت نوع ۲ و عوارض مزمن آن در مطالعه حاضر بررسی شد. این مطالعه برای اولین بار نقش پلی‌مورفیسم VNTR اینترون۴ eNOS را در استعداد ابتلا به دیابت نوع۲ و عوارض مزمن آن، در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار داده است.

پیش از این نشان داده شده بود که فراوانی آلل a در بیماران مبتلا به بیماری عروق کرونری(CAD) افزایش می‌یابد، هر چند آلل a فاکتور خطر مستقل در بیماران ایرانی نبود [۲۶]. در این مطالعه تفاوت معنی‌داری در فراوانی پلی‌مورفیسم‌های eNOS در سطح آلل و ژنوتایپ در بیماران دیابتی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید. گرچه ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و نوروپاتی دیابتی نیز مشاهده شد، اما تفاوت معنی‌داری که در فراوانی این پلی‌مورفیسم در بیماران فاقد عوارض دیابتی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد بیشتر بود. در این مطالعه تفاوت معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم و رتینوپاتی دیابتی یا نفروپاتی دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ یافته نشد.کم بودن حجم نمونه ممکن است قدرت تشخیص ارتباط معنی‌دار بین رتینوپاتی دیابتی یا نفروپاتی دیابتی را محدود کرده باشد. چندین مطالعه ارتباط بین پلی‌مورفیسم eNOS را با دیابت نوع ۲ و عوارض میکرو واسکولار آن اثبات کرده است. هر چند نتایج یکسان نبودند [۱۵،۲۶–۲۸].

به طور کلی، فراوانی آلل a در بیماران مبتلا به عوارض دیابت افزایش داشت اما افزایش معنی‌دارتری در بیماران فاقد عوارض دیابت در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت. به هر حال، ارتباط قوی بین این پلی‌مورفیسم و بیماران دیابتی فاقد عوارض ممکن است اثر دوگانه آلل a را در استعداد ابتلا به دیابت و عوارض آن نشان دهد که ممکن است توجیه کننده اختلافات مشاهده شده در مطالعات قبلی باشد که به دلیل LD قوی بین پلی‌مورفیسم اینرون ۴ و پلی‌مورفیسم T/C* ۷۸۶– باشد.

بهتر است مطالعات بیشتری بر روی جمعیت‌های مختلف با تعداد نمونه بیشتر، صورت بگیرد تا نتایجی که در این مطالعه به دست آوردیم، اثبات شود.

سپاسگزاری

بودجه این تحقیق توسط مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران تامین گردیده است.

مآخذ

1. Tso AW, Tan KC, Wat NM, Janus ED, Lam TH, Lam SLK.Endothelial nitric oxide synthase G894T (Glu298Asp)polymorphism was predictive of glycemic status in a 5-year prospective study of Chinese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism* 2006; 55:1155–8.
2. Pieper GM. Enhanced, unaltered and impaired nitric oxidemediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration. *Diabetologia* 1999; 42:204–13.
3. Monti LD, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C,Setola E, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2003; 52:1270–5.
4. Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ES, Rabelink TJ.Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14:241–9.
5. Ceriello A, dello RP, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking

hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 1996; 45:471–7.
6. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; 96:25–8.
7. Spinas GA, Laffranchi R, Francoys I, David I, Richter C,Reinecke M. The early phase of glucose-stimulated insulin Q1 secretion requires nitric oxide. *Diabetologia* 41:292–9.
8. Laffranchi R, Gogvadze V, Richter C, Spinas GA. Nitric oxide (nitrogen monoxide, NO) stimulates insulin secretion by inducing calcium release from mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217:584–91.
9. Choi KC, Lee SC, Kim SW, Kim NH, Lee JU, Kang YJ. Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Intern Med* 1999; 14:32–41.
10. Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D,Witzenbichler B, Kearney M, et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med* 1997; 3:879–86.
11. Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann NY Acad* Sci 1997; 811:60–7.
12. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268:17478–8.
13. 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.
14. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 2000; 70:241–51.
15. Ezzidi I, Mtiraoui N, Mohamed MB, Mahjoub T, Kacem M,Almawi WY. Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and _786T>C gene variants with diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 2008; 22:331–8.
16. Ezzidi I, Mtiraoui N, Mohamed MB, Mahjoub T, Kacem M,Almawi WY. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and T-786C polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Clin Endocrinol* (Oxf) 2008; 68:542–6.
17. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R,et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26(11):3160–7.
18. DCCT Research Group. Factors in development of diabetic neuropathy. Baseline analysis of neuropathy in feasibility phase of Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The DCCT Research Group. *Diabetes* 1988; 37(4):476–81.
19. Amoli MM, Garcia-Porrua C, Llorca J, Ollier WE, Gonzalez-Gay MA. Endothelial nitric oxide synthase haplotype associations in biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2003; 30:2019–22.
20. Baron AD, Steinberg H, Brechtel G, Johnson A. Skeletal muscle blood flow independently modulates insulinmediated glucose uptake. *Am J Physiol* 1994; 266:E248–53.
21. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32:3–8.
22. Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S,Jones C, et al. The T-786 C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension* 2002; 39:919–22.
23. Gonza´ lez-Sa´nchez JL, Martı´nez-Larrad MT, Sa´ez ME,Zabena C, Martı´nez-Calatrava MJ, Serrano-Rı´os M.Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are associated with features of metabolic syndrome. *Clin Chem* 2007; 53 (1): 91–7.
24. Bazzaz JT, Amoli MM, Pravica V, Chandrasecaran R, Boulton AJ, Larijani B, et al. eNOS gene polymorphism association with retinopathy in type 1 diabetes. *Ophthalmic Genet* 2010; 31(3):103–7.
25. Rittig K, Holder K, Stock J, Tschritter O, Peter A, Stefan N,et al. Endothelial NO-synthase intron 4 polymorphism is associated with disturbed in vivo nitric oxide production in individuals prone to type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 2008; 40:13–7.
26. Salimi S, Firoozrai M, Nourmohammadi I, Shabani M,Mohebbi A. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran. *Indian J Med Res* 2006; 124:683–8.
27. De Syllos RW, Sandrim VC, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase genotype and haplotype are not associated with diabetic retinopathy in type 2diabetes patients. *Nitric Oxide* 2006; 15:417–22.
28. Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, Mahalakshmi R, Karthikprakash S, Namperumalsamy P, et al. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2006; 12:336–41.