

بررسی پلی مورفیسم ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱ و ارتباط آن با رتینوپاتی و نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در اهواز

دکتر جواد محمدی اصل^۱، ارغوان سلیمانی زاده^۲، دکتر حاجیه بی بی شهبازیان^۳،
دکتر حشمت اله شهبازیان^۴، ندا گلچین^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: دیابت شایع ترین بیماری غدد درون ریز و یکی از شایع ترین بیماری های غیر واگیر دنیا است که سالانه افراد زیادی را درگیر می کند. جمعیت فراوانی از افراد، از ابتلا به دیابت از نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی رنج می برند. استرس های اکسیداتیو در بروز این دو عارضه نقش به سزایی دارند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD یا Superoxide dismutase) نقش عمده ای در سم زدایی گونه های فعال اکسیژن دارند. بنابراین، یک نقش محافظتی علیه نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی دارد. مطالعات مختلفی تأثیر پلی مورفیسم های مختلف این ژن را در بروز آسیب های بافتی افراد دیابتی آشکار کرده اند.

روش ها: در مطالعه حاضر، دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ۱۴۵ نفر از افراد بیمار (گروه مورد) و ۱۴۵ نفر از افراد سالم (گروه شاهد)، بررسی شد. نمونه های DNA بعد از جمع آوری نمونه های خون افراد مورد و شاهد استخراج شد و پلی مورفیسم نمونه ها با به کارگیری روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: با بررسی پلی مورفیسم rs2۰۷۰۴۲۴ در افراد مورد و شاهد مبتلا به نفروپاتی، توزیع فراوانی ژنوتیپی معنی داری مشاهده شد ($P = ۰/۰۰۵$) و $\chi^2 = ۷/۵۵$. در حالی که در افراد مبتلا به رتینوپاتی دیابتی، توزیع این پلی مورفیسم ارتباط معنی داری نشان نداد. از آن جا که در پلی مورفیسم rs2۲۳۴۶۹۴ تمام افراد بیمار مورد مطالعه دارای ژنوتیپ AA بودند، بنابراین هیچ گونه آزمون آماری برای بررسی ارتباط بین این پلی مورفیسم و نفروپاتی دیابتی و رتینوپاتی دیابتی قابل انجام نبود.

نتیجه گیری: توصیه می شود افرادی که در مراحل اولیه دیابت شناسایی می شوند، آزمایش بررسی مولکولی برای بررسی این پلی مورفیسم انجام شود تا افراد مستعد به ابتلا به نفروپاتی دیابتی مشخص شوند و اقدامات درمانی مناسب برای آن ها صورت گیرد.

واژگان کلیدی: دیابت ملیتوس، ژن Superoxide dismutase، پلی مورفیسم، ژنتیک، مطالعه ای مورد-شاهدی

ارجاع: محمدی اصل جواد، سلیمانی زاده ارغوان، بی بی شهبازیان حاجیه، شهبازیان حشمت اله، گلچین ندا. بررسی پلی مورفیسم ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱ و ارتباط آن با رتینوپاتی و نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در اهواز. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۰): ۴۴۲-۴۴۲

۱- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، آزمایشگاه ژنتیک نور، اهواز، ایران

۳- استادیار، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۴- استادیار، گروه ارولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۵- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی، آزمایشگاه ژنتیک نور، اهواز، ایران

مقدمه

دیابت نوع ۲ شایع‌ترین بیماری غدد درون‌ریز است که بیش از ۲۰۰ میلیون نفر را در سراسر جهان درگیر کرده است (۱). دیابت شیرین، گروهی از اختلالات متابولیک را شامل می‌شود که از نظر بالا بودن قند خون (هایپرگلیسمی) با هم مشترک هستند (۲). این نوع بیماری، یک اختلال مزمن و پیش‌رونده‌ای است که ناشی از مقاومت به انسولین، کاهش عملکرد سلول‌های بتا پانکراس و افزایش تولید گلوکز توسط کبد می‌باشد (۳-۴).

با توجه به آمار ارایه شده در سال ۲۰۰۰ توسط سازمان جهانی بهداشت (WHO) یا World health organization، حداقل ۱۷۱ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به دیابت قندی بوده‌اند (۵). ۶۰ درصد از این افراد، دچار یکی از عوارض دیررس این بیماری می‌گردند که در هر ۱۰ ثانیه، باعث مرگ یک انسان می‌شوند (۶). بر طبق گزارش ارایه شده توسط سازمان جهانی بهداشت، ۲۰ درصد از موارد مرگ و میر افراد بین ۳۵-۶۴ سال، در سال ۲۰۰۰ در ایران بر اثر ابتلا به دیابت قندی و عوارض آن اتفاق افتاده است (۷). بر اساس پیش‌بینی این سازمان، انتظار می‌رود که تعداد افراد مبتلا به در سال ۲۰۳۵ میلادی به ۳۰۰ میلیون نفر برسد (۸).

بالا بودن گلوکز خون در دیابت، عوارض وخیمی را به دنبال خواهد داشت که بسیاری از اعضای بدن را گرفتار می‌سازد و مسؤول بخش عمده‌ای از موارد ابتلا و مرگ و میر در این بیماران به شمار می‌رود. این عوارض را می‌توان به عوارض عروقی و غیر عروقی تقسیم نمود. عوارض عروقی به نوبه‌ی خود شامل عروق کوچک (نوروپاتی، نفروپاتی و رتینوپاتی) و

عروق بزرگ (قلبی و عروقی) می‌شود (۹).

نفروپاتی دیابتی، یکی از مهم‌ترین عوارض دیابت است و شایع‌ترین علت نارسایی مزمن کلیه در سراسر جهان می‌باشد (۱۰). یکی دیگر از عوارض قابل توجه و تا حدی جبران ناپذیر این بیماری، رتینوپاتی دیابتی است که ممکن است منجر به کوری شود. ۸۰ درصد از بیمارانی که ۱۰ سال یا بیشتر مبتلا به دیابت می‌باشند، ممکن است به این بیماری دچار شوند (۱۱). شواهد و یافته‌های متعددی بر نقش مؤثر عوامل ژنتیکی و زمینه‌های نژادی-وراثتی در تعیین میزان استعداد و یا مقاومت بیماران در ابتلا به رتینوپاتی و نفروپاتی دیابتی دلالت دارند (۱۲-۱۴). همان‌طور که ذکر شد، این بیماری چند ژنی و چند عاملی است. بروز این بیماری نتیجه‌ی یک تعامل پیچیده بین عوامل ژنتیکی و محیطی است. بنابراین، پیشرفت‌ها در زمینه‌ی شناسایی تغییرات ژنتیکی دیابت می‌تواند در زمینه‌ی کنترل این بیماری و عوارض ناشی از آن، کمک کننده باشد.

با وجود انجام تلاش‌های گسترده در جهت شناسایی رتینوپاتی و نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، مکانیسم مولکولی آن‌ها هنوز به طور کامل و دقیق شناسایی نشده است. یکی از مهم‌ترین عوامل در این راستا، پلی‌مورفیسم‌های ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱ (SOD1) است.

سوپراکسید دیسموتاز مس / روی معروف به سوپراکسید دیسموتاز ۱ یا SOD1 (Superoxide dismutase 1) آنزیم سیتوزولی در انسان می‌باشد که توسط ژن SOD1 با کد بین‌المللی ۶۶۴۷، کدگذاری می‌گردد (۱۵). این آنزیم یک آنتی‌اکسیدان قوی است که با تبدیل رادیکال‌های

بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ دخیل هستند. در مطالعه‌ی حاضر، پلی‌مورفیسم (rs2234694) +35A/C که در مجاورت ناحیه‌ی اسپیلیسینگ اینترون ۳/ اگزون ۳ قرار گرفت و پلی‌مورفیسم A/G (rs2070424) در ناحیه‌ی اینترونی ۳ مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها

به منظور جمع‌آوری نمونه، جمعیت مورد نظر از مراجعین به کلینیک دیابت بیمارستان گلستان اهواز که سابقه‌ی ۵ سال و بیشتر دیابت نوع ۲ داشتند، انتخاب شدند. این بیماران توسط پزشک متخصص چشم و کلیه، مورد ارزیابی قرار گرفتند و ۱۴۵ نفر از بیماران دارای نفروپاتی و رتینوپاتی، بیماران فقط دارای نفروپاتی و بیماران فقط دارای رتینوپاتی انتخاب و وارد این مطالعه شدند. گروه شاهد نیز ۱۴۵ نفر فرد سالم بودند که با همسان‌سازی آن‌ها از لحاظ سن و جنس با گروه بیمار، انتخاب شدند. از افراد مورد مطالعه، در ابتدا تکمیل پرسش‌نامه و رضایت کتبی به منظور خون‌گیری وریدی، گرفته شد. سپس ۳ سی‌سی خون در تیوپ فالكون ۱۵ میلی‌لیتری که حاوی ماده‌ی ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) بود، نمونه‌گیری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA از نمونه‌های خون افراد سالم و بیمار با استفاده از کیت استخراج DNA متعلق به شرکت BIOEER استخراج شد و DNA به دست آمده جهت مطالعه در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. واکنش PCR

سوپراکسید به اکسیژن و هیدروژن پراکسید، بدن را از آسیب ناشی از سوپراکسید که رادیکال آزاد سمی تولید شده در میتوکندری است، محافظت می‌کند. رادیکال‌های آزاد تولید شده در طی متابولیسم سلول‌ها می‌توانند تجمع کنند و باعث صدمه به DNA میتوکندریایی، هسته و پروتئین‌های داخل سلول شوند (۱۶). شواهد بسیاری وجود دارند که اثبات می‌کنند فزونی سوپراکسید تولید شده در اثر هیپرگلاسمی دیابتی، نقش مرکزی در آسیب سلول‌های عروقی ایفا می‌کند (۷).

مشاهدات مختلف نشان داده‌اند که میزان SOD1 در ناحیه‌ی کلیوی بیماران مبتلا به دیابت کاهش پیدا می‌کند. در مدل‌های حیوانی فاقد SOD1 زخم‌های کلیوی گسترش پیدا کردند و درمان آن‌ها با SOD1 سنتزی، منجر به مهار شدن آلبومینوری و بهبود زخم‌های نفروپاتیک شد (۱۷).

بر این اساس، نقص عملکردی این آنزیم عامل کلیدی در ایجاد نفروپاتی به شمار می‌رود (۱۸). علاوه بر این، مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم ژن SOD1 در ایجاد نفروپاتی دیابتی دارای نقش است (۱۹).

دخالته SOD1 در ایجاد نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی، وجود بعضی پلی‌مورفیسم‌ها که فعالیت SOD1 را کاهش می‌دهند و شواهدی دال بر استعداد ژنتیکی بیماری کلیوی دیابتی، دلیل مطالعه‌ی پلی‌مورفیسم‌های ژن SOD1 به عنوان یک عامل خطر برای نفروپاتی و رتینوپاتی در این پژوهش می‌باشد. همان‌طور که در بالا اشاره شد، هر دوی این پلی‌مورفیسم‌ها با فعالیت SOD1 در ارتباطند و با مراحل پیشرفته‌ی نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی در

جداول درج گردید و بر اساس نوع متغیرها با استفاده از این نرم افزار، آنالیزهای آماری مناسب انجام گرفت. آزمون‌های انجام گرفته شامل آنالیز χ^2 و محاسبه‌ی OR (Odds ratio) با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد بودند و مقایسه‌ی تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون t انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه توزیع فراوانی دو پلی مورفیسم SOD1 در ۲۹۰ زن و مرد (۱۴۵ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو در شهر اهواز به عنوان گروه مورد و ۱۴۵ فرد سالم از جمعیت عمومی به عنوان گروه شاهد) که از لحاظ سن و جنس همسان‌سازی شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد زنان و مردان در هر دو گروه به نسبت مساوی، به ترتیب ۷۲ نفر و ۷۳ نفر بودند. میانگین سنی افراد سالم $10/0 \pm 51/3$ سال و افراد بیمار $9/0 \pm 53/9$ سال بود.

(Polymerase chain reaction) برای بررسی پلی مورفیسم rs2234694 و rs2070424 با کمک پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام شد. به منظور تکثیر قطعه‌ی ۲۳۵ بازی، واکنش PCR با دمای اتصال ۵۵/۹ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۳۰ سیکل و دمای اتصال پرایمر ۵۸/۳ درجه‌ی سانتی‌گراد با همان تعداد سیکل برای تکثیر قطعه‌ی ۲۵۸ بازی انجام شد.

به منظور بررسی پلی مورفیسم‌ها، ۱۰ واحد از آنزیم‌های HhaI و MspI به طور جداگانه برای هر محصول PCR مورد استفاده قرار گرفتند. جهت انجام عمل هضم آنزیمی نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۱۲ ساعت نگهداری شدند. ویژگی کامل آنزیم‌های برش دهنده در این پژوهش در جدول ۲ آماده است. در نهایت، نمونه‌ها بر روی ژل پلی‌آکرلامید ۸ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اطلاعات بیماران و نتایج بررسی‌های مولکولی در نرم‌افزار SPSS وارد شد. سپس نتایج در

جدول ۱. مشخصات کامل پرایمرهای به کار رفته در پژوهش حاضر

نام ژن	نام پلی مورفیسم	توالی نوکلئوتیدی	طول محصول	نام آنزیم	طول قطعه‌ی برش خورده
SOD	(+۳۵ A/C) rs2234694	F:AGGCTGTACCAGTGCAGGTC	۲۳۵	HhaI	۱۳۱
		R:AAAAGCATTCCAGCATTTGG			۱۰۴
SOD	(Intron ³ A/G) rs 2070424	F:TCAGAGGCCTTGGGACATAG	۲۵۸	MspI	۲۲۳
		R:GGGCTGATGCCACTAAACAT			۵۸

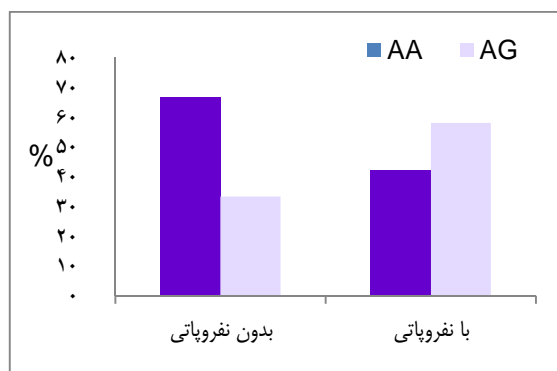
SOD: Superoxide dismutase

جدول ۲. ویژگی‌های آنزیم‌های برش دهنده‌ی به کار رفته جهت برش ناحیه‌ی کنترلی

نام ژن	نام آنزیم	توالی شناسایی	شرایط واکنش (دما-درجه‌ی سانتی‌گراد)
SOD1 (+۳۵ A/C)	HhaI	...GCGC... ...CGCG...	۳۷
SOD1 rs: 2070424	MspI	...CCGG... ...GGCC...	۳۷

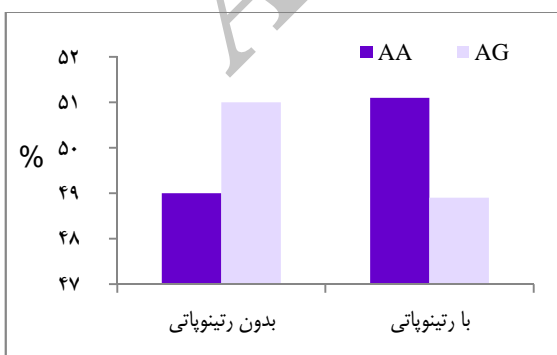
SOD: Superoxide dismutase

ابتلا به نفروپاتی در حضور آلل AG نسبت به ژنوتیپ AA، نسبت شانس خام برابر (۱/۳۲-۵/۷۶) $OR = ۲/۷۶$ ، در فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد است.



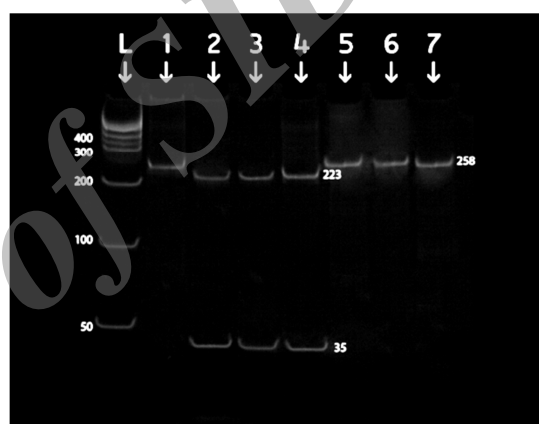
شکل ۲. ارتباط بین ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs2070424 در ژن SOD (Superoxide dismutase) با نفروپاتی در گروه مورد

همچنین فراوانی این ژنوتیپ در افراد مبتلا و غیر مبتلا به رتینوپاتی بررسی شد. بر اساس شکل ۳، در گروه مبتلا به رتینوپاتی، فراوانی ژنوتیپ AA برابر ۵۱/۱ و ژنوتیپ AG برابر ۴۸/۹ درصد می‌باشد. در گروه فاقد رتینوپاتی، فراوانی ژنوتیپ‌های AA برابر ۴۹ و AG برابر ۵۱ درصد بود. آنالیز آماری این توزیع ژنوتیپی رابطه‌ی معنی‌داری را نشان نداد ($P = ۰/۸۱۰$ و $\chi^2 = ۰/۰۵$).



شکل ۳. ارتباط بین ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs2070424 در ژن SOD (Superoxide dismutase) با رتینوپاتی در گروه مورد

جهت تعیین ژنوتیپ‌های مورد نظر از تکنیک (Restriction fragment length polymorphism) RFLP استفاده شد. جهت تعیین پلی مورفیسم rs2070424، هضم آنزیمی محصولات PCR توسط آنزیم MspI و با مشخص شدن دو ژنوتیپ AA و AG در نمونه‌ها صورت گرفت. الکتروفورز این هضم آنزیمی، با بردن محصولات بر روی ژل ۸ درصد آکریل آمید انجام شد و هتروزیگوت و هموزیگوت بودن افراد مشخص نمایان شد (شکل ۱).



شکل ۱. پلی مورفیسم rs2070424 در ژن SOD (Superoxide dismutase). ردیف L نشان دهنده‌ی نشانگر DNA (۵۰ bp) ردیف ۱ محصول PCR (Polymerase chain reaction) کات نشده ۲۵ bp، ردیف‌های ۲، ۳ و ۴ محصولات کات شده با طول قطعات ۲۲۳ bp و ۳۵ bp و نشان دهنده‌ی ژنوتیپ AG، ردیف‌های ۵، ۶ و ۷ محصولات کات شده با طول ۲۵۸ bp و نشان دهنده‌ی ژنوتیپ AA

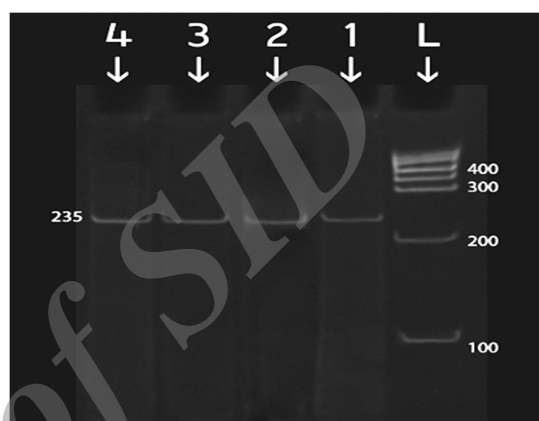
بر اساس شکل ۲، در گروه واجد نفروپاتی، فراوانی ژنوتیپ AA ۴۲ درصد و فراوانی ژنوتیپ AG ۵۸ درصد می‌باشد و در گروه فاقد نفروپاتی، این فراوانی ژنوتیپی به ترتیب ۶۶/۷ و ۳۳/۳ درصد است. توزیع فراوانی ژنوتیپی در این جدول دارای ارتباط معنی‌داری است ($P = ۰/۰۰۵$ و $\chi^2 = ۷/۵۵$). خطر

در جمعیت بالای ۴۰ سال حدود ۲۴ درصد تخمین زده شده است (۲۰). دیابت نوع ۲ یک بیماری چند عاملی است که در آن، مجموعه‌ای از عوامل ژنتیکی و محیطی، عملکرد سلول‌های بتا پانکراس و حساسیت بافت‌ها به انسولین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. هر دوی این عوامل، نقش مهمی در سبب‌شناسی بیماری دارند و این در حالی است که مکانیسم کنترل‌کننده‌ی اثر متقابل این دو عامل هنوز به درستی مشخص نیست. از این رو شناخت مکانیسم کنترل‌کننده‌ی اثر این عوامل می‌تواند منجر به درک بهتر و عمیق‌تر آسیب‌شناسی بیماری گردد (۲۱).

بالا بودن گلوکز خون در دیابت عوارض وخیمی را در بیماران مبتلا به دیابت به دنبال خواهد داشت که از میان آن‌ها، می‌توان به نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی اشاره کرد. نفروپاتی دیابتی (بیماری کلیوی ناشی از دیابت) پدیده‌ای مزمن و پیشرفته است که در نزدیک به ۱/۳ از بیماران مبتلا به دیابت ایجاد می‌شود. نفروپاتی دیابتی با عوارض دیگر دیابت نظیر افزایش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی، افزایش خطر بیماری‌های چشمی دیابت (رتینوپاتی)، افزایش خطر مشکلات عصبی دیابت (نوروپاتی) در ارتباط است (۲۲).

رتینوپاتی دیابتی اغلب هیچ‌گونه نشانه‌ی اولیه ندارد، حتی تورم ماکولار که می‌تواند به سرعت باعث کمی دید شود ممکن است گاهی هیچ علامت هشدار دهنده‌ای در این خصوص نباشد. وقتی عروق خونی شبکه‌ی آسیب می‌بینند، ممکن است باعث نشت مایع یا خون شوند یا منجر به رشد شاخه‌های عروقی شکننده و کلافه‌مانند شوند و باعث تخریب شبکه‌ی شوند و در نتیجه، تصویری که شبکه‌ی به مغز می‌فرستد، تاریک و معوج می‌شود (۲۳).

به منظور بررسی پلی مورفیسم +۳۵A/C در ژن SOD1 محصولات به دست آمده از PCR این پلی مورفیسم، با استفاده از آنزیم HhaI هضم شدند و در آن‌ها فقط ژنوتیپ AA نمایان شد. الکتروفورز این هضم آنزیمی بر روی ژل ۸ درصد پلی آکریل آمید، هموزیگوت بودن تمام افراد را نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴. پلی مورفیسم +۳۵A/C در ژن SOD1

ردیف L نشان دهنده‌ی نشانگر (Superoxide dismutase) DNA (۱۰۰ bp)، ردیف ۱ محصول PCR (Polymerase chain reaction) کات نشده‌ی ۱ bp ۲۳۵، ردیف‌های ۲، ۳ و ۴ محصولات کات شده با طول قطعه‌ی ۱ bp ۲۳۵ و نشان دهنده‌ی ژنوتیپ AA

از آن جایی که در این نوع پلی مورفیسم، تمام افراد بیمار مورد مطالعه دارای ژنوتیپ AA بودند، بنابراین هیچ‌گونه آزمون آماری برای بررسی ارتباط بین این پلی مورفیسم و نفروپاتی دیابتی و رتینوپاتی دیابتی قابل انجام نبود.

بحث

دیابت نوع ۲ از جمله بیماری‌های متابولیک شایع می‌باشد که در حال حاضر ۱۹۰ میلیون نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا هستند. در ایران شیوع این نوع دیابت

ژن‌های مختلفی وجود دارند که محصول پروتئینی آن‌ها قادر به سم‌زدایی سوپراکسید و یا کاهش تولید آن و رادیکال‌های آزاد می‌باشد. آنزیم‌های ضد اکسایشی قسمتی از سیستم آنزیمی بدن هستند که در کاهش فشار اکسایشی ناشی از رادیکال‌های آزاد دخالت دارند. وظیفه‌ی این آنزیم‌ها جلوگیری از اثر اکساینده‌ها در داخل سلول و ارگان‌های سلولی نظیر میتوکندری‌ها و پراکسی‌زوم‌ها است. محل عمل اکثر این آنزیم‌ها، میتوکندری است. مهم‌ترین این آنزیم‌ها، سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد. سوپراکسید دیسموتاز (SOD) یک خانواده از آنزیم‌ها هستند که در تبدیل سوپراکسید به H_2O_2 نقش به‌سزایی ایفا می‌کنند (۹). با توجه به این که ژن SOD1 کدکننده‌ی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است و عضوی از یک خانواده‌ی آنزیمی درگیر در تبدیل سوپراکسید به H_2O_2 می‌باشد، آنزیم SOD1 یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در نوروباتی دیابتی است؛ زیرا در این بیماری، میزان این آنزیم در ناحیه‌ی کلیوی کاهش می‌یابد (۱۸). چندین مطالعه به منظور بررسی ارتباط پلی مورفیسم سوپراکسید دیسموتاز با رتینوپاتی و نوروباتی دیابتی انجام شده است.

در مطالعه‌ی Fujita و همکاران در کشور ژاپن بر روی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، مشخص شد که پلی مورفیسم rs2070427 در ژن SOD1 در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در ژاپن، با عامل نوروباتی ارتباط داشت (۱۸). Panduru و همکاران در کشور رومانی ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم +35A/C این ژن و نوروباتی دیابتی پیدا نکردند (۳۱). در مطالعه‌ی دیگر در کشور آمریکا، ارتباط این ژن با بروز رتینوپاتی در موش‌های مدل بررسی شد. در

رتینوپاتی دیابتی جزء خطرناک‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های سیستم بینایی انسان به‌شمار می‌آید و اصلی‌ترین عامل نابینایی در بزرگسالان بین ۲۰-۶۰ سال می‌باشد. طبق آمار منتشر شده، حدود ۲ درصد از افرادی که مدت ۱۵ سال از ابتلای آن‌ها به دیابت گذشته است، به‌طور کامل فاقد بینایی هستند و حدود ۱۰ درصد از این افراد از اختلالات بینایی رنج می‌برند (۲۴-۲۵).

با توجه به اهمیت و شیوع بالای دیابت و رتینوپاتی ناشی از آن، مطالعات متعددی برای بررسی بروز رتینوپاتی دیابتی و عوامل مؤثر بر آن انجام شده است (۲۸-۲۶، ۱۱). سن، جنس، مدت دیابت، قند خون ناشتا، چربی خون، چاقی و فشار خون از جمله عواملی بودند که در این مطالعات تأثیر آن‌ها در بروز رتینوپاتی دیابتی مورد بررسی قرار گرفته است. رتینوپاتی دیابتی نتیجه‌ی تغییرات مویرگ‌های شبکه‌ای است. هایپرگلیسمی باعث ضخیم شدن دیواره‌ی داخلی رگ‌ها می‌شود که به ناکارایی آن‌ها می‌انجامد. این آسیب‌ها و تغییرات باعث نشت کردن خون از شبکه‌ی و همچنین نفوذ پذیری بیشتر مویرگ‌های خونی شبکه‌ی می‌شود (۲۹).

سوپراکسید یکی از فراوان‌ترین گونه‌های اکسیژن فعال است که می‌تواند به ماکرومولکول‌های سلولی آسیب وارد کند. این ماده در میتوکندری تولید می‌شود و اعتقاد بر این است که می‌تواند در مسیرهای پیام‌رسانی سلولی درگیر باشد. تحت شرایط طبیعی، زنجیره‌ی انتقال الکترونی میتوکندری، منبع اصلی تولید سوپراکسید است که بیش از ۵ درصد اکسیژن مولکولی را به سوپراکسید تبدیل می‌کند، اما میزان آن در شرایط پاتولوژیک بیشتر می‌شود (۳۰).

بررسی اثر دیگر پلی مورفیسم‌های این ژن حایز اهمیت می‌باشد. بررسی پلی مورفیسم‌های ژنتیکی نقش مهمی در شناخت عوامل ژنتیکی درگیر در آسیب‌شناسی دیابت نوع ۲ دارد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که پلی مورفیسم ژنتیکی rs2070424 در ناحیه‌ی اینترونی ۳ ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱، سطح SOD1 را تحت تأثیر قرار می‌دهد و ارتباط معنی‌داری با نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ دارد. بنابراین، این پلی مورفیسم می‌تواند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی برای تشخیص افراد مستعد به نفروپاتی دیابتی مد نظر قرار گیرد. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، توصیه می‌شود برای افرادی که در مراحل اولیه‌ی دیابت شناسایی می‌شوند، آزمایش بررسی مولکولی جهت تشخیص این پلی مورفیسم انجام شود تا افراد مستعد ابتلا به نفروپاتی دیابتی مشخص شوند و اقدامات درمانی مناسب برای آن‌ها صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که هزینه‌ی انجام طرح را تقبل نموده است تشکر و قدردانی می‌نمایند.

این پژوهش مشخص شد که موش‌های ترانسژنیک با SOD1 -/- در برابر آسیب ناشی از مواد اکسیداتیو، نسبت به مدل‌های موشی SOD1 +/+ بسیار حساس‌تر و آسیب‌پذیرتر هستند. نتایج این آزمایش نشان داد که SOD1، سلول‌های شبکه‌ی چشم را در برابر آسیب‌های ناشی از مواد اکسیداتیو محافظت می‌کند. بنابراین می‌تواند کاندید مناسبی برای ژن درمانی به منظور پیشگیری از تخریب شبکه‌ی سلولی در نظر گرفته شود (۳۲).

نتایج به دست آمده در این پژوهش، گویای این است که تمام افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ دارای نفروپاتی و رتینوپاتی در این مطالعه، حاملین ژنوتیپ AA در پلی مورفیسم +35A/C می‌باشند و در آن‌ها سطح ابتلا به نفروپاتی و رتینوپاتی بسیار کم است. در پلی مورفیسم rs2070427، ژنوتیپ AG با نفروپاتی ارتباط معنی‌داری دارد و افراد دارای این ژنوتیپ، ۲/۷۶ برابر بیشتر احتمال ابتلا به نفروپاتی را دارند (شکل ۲)؛ در حالی که هیچ‌گونه ارتباطی بین این پلی مورفیسم با رتینوپاتی مشاهده نشد.

تعداد مطالعات گزارش شده در ارتباط با تأثیر این پلی مورفیسم بر خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ بسیار محدود می‌باشد و با در نظر گرفتن تفاوت مختلف جغرافیایی، لزوم مطالعات بیشتر در این زمینه و

References

1. Qiao Q, Hu G, Tuomilehto J, Nakagami T, Balkau B, Borch-Johnsen K, et al. Age- and sex-specific prevalence of diabetes and impaired glucose regulation in 11 Asian cohorts. *Diabetes Care* 2003; 26(6): 1770-80.
2. Shuldiner AR, Yang R, Gong DW. Resistin, obesity and insulin resistance--the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med* 2001; 345(18): 1345-6.
3. Bloomgarden ZT. Insulin resistance: causes and consequences. *Int Rev Neurobiol* 2005; 65: 1-24.
4. Hegele RA, Pollex RL. Genetic and physiological insights into the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289(3): R663-R669.
5. Beaglehole R, Bonita R. Reinvigorating public health. *Lancet* 2000; 356(9232): 787-8.
6. Ostbye T, Welby TJ, Prior IA, Salmond CE,

- Stokes YM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, migration and westernisation: the Tokelau Island Migrant Study. *Diabetologia* 1989; 32(8): 585-90.
7. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54(6): 1615-25.
 8. The World Health Report 1997--conquering suffering, enriching humanity. *World Health Forum* 1997; 18(3-4): 248-60.
 9. Camacho P, Pitale S, Abaira C. Beneficial and detrimental effects of intensive glycaemic control, with emphasis on type 2 diabetes mellitus. *Drugs Aging* 2000; 17(6): 463-76.
 10. Parving HH, Andersen S, Jacobsen P, Christensen PK, Rossing K, Hovind P, et al. Angiotensin receptor blockers in diabetic nephropathy: renal and cardiovascular end points. *Semin Nephrol* 2004; 24(2): 147-57.
 11. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology* 1998; 105(10): 1801-15.
 12. Hallman DM, Huber JC, Jr., Gonzalez VH, Klein BE, Klein R, Hanis CL. Familial aggregation of severity of diabetic retinopathy in Mexican Americans from Starr County, Texas. *Diabetes Care* 2005; 28(5): 1163-8.
 13. Taverna MJ. [Genetics of diabetic complications: retinopathy]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2004; 65(1 Suppl): S17-S25.
 14. Amano S, Yamagishi S, Koda Y, Tsuneoka M, Soejima M, Okamoto T, et al. Polymorphisms of sorbitol dehydrogenase (SDH) gene and susceptibility to diabetic retinopathy. *Med Hypotheses* 2003; 60(4): 550-1.
 15. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, et al. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(Database issue): D237-D240.
 16. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404(6779): 787-90.
 17. DeRubertis FR, Craven PA, Melhem MF. Acceleration of diabetic renal injury in the superoxide dismutase knockout mouse: effects of tempol. *Metabolism* 2007; 56(9): 1256-64.
 18. Fujita H, Fujishima H, Chida S, Takahashi K, Qi Z, Kanetsuna Y, et al. Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(6): 1303-13.
 19. Mollsten A, Marklund SL, Wessman M, Svensson M, Forsblom C, Parkkonen M, et al. A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. *Diabetes* 2007; 56(1): 265-9.
 20. Azimi-Nezhad M, Ghayour-Mobarhan M, Parizadeh MR, Safarian M, Esmaeili H, Parizadeh SM, et al. Prevalence of type 2 diabetes mellitus in Iran and its relationship with gender, urbanisation, education, marital status and occupation. *Singapore Med J* 2008; 49(7): 571-6.
 21. Goldstein BJ. Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4(Suppl 6): S3-10.
 22. Klein BE, Klein R, Moss SE. Prevalence of cataracts in a population-based study of persons with diabetes mellitus. *Ophthalmology* 1985; 92(9): 1191-6.
 23. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102(4): 527-32.
 24. Lee SC, Lee ET, Kingsley RM, Wang Y, Russell D, Klein R, et al. Comparison of diagnosis of early retinal lesions of diabetic retinopathy between a computer system and human experts. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(4): 509-15.
 25. Massin P, Allouch C, Haouchine B, Metge F, Paques M, Tanguy L, et al. Optical coherence tomography of idiopathic macular epiretinal membranes before and after surgery. *Am J Ophthalmol* 2000; 130(6): 732-9.
 26. Looker HC, Krakoff J, Knowler WC, Bennett PH, Klein R, Hanson RL. Longitudinal studies of incidence and progression of diabetic retinopathy assessed by retinal photography in pima indians. *Diabetes Care* 2003; 26(2): 320-6.
 27. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994; 112(9): 1217-28.
 28. Liu QZ, Pettitt DJ, Hanson RL, Charles MA, Klein R, Bennett PH, et al. Glycated haemoglobin, plasma glucose and diabetic retinopathy: cross-sectional and prospective analyses. *Diabetologia* 1993; 36(5): 428-32.
 29. Geraldès P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, et al. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med* 2009; 15(11): 1303-13.

- 1298-306.
30. McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(4): 139-42.
31. Panduru NM, Cimponeriu D, Cruce M, Ion DA, Mota E, Mota M, et al. Association of +35A/C (intron3/exon3) polymorphism in SOD1-gene with diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Rom J Morphol Embryol* 2010; 51(1): 37-41.
32. Dong A, Shen J, Krause M, Akiyama H, Hackett SF, Lai H, et al. Superoxide dismutase 1 protects retinal cells from oxidative damage. *J Cell Physiol* 2006; 208(3): 516-26.

Archive of SID

Genetic Polymorphisms of Superoxide Dismutase 1 and Its Relationship to Diabetic Neuropathy and Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Ahvaz, Iran

Javad Mohammadi-Asl PhD¹, Arghavan Soleimanizadeh MSc²,
Hajieh Bibi Shahbazian PhD³, Heshmatollah Shahbazian PhD⁴, Neda Golchin MSc⁵

Original Article

Abstract

Background: Diabetes is the most prevalent non-infectious disorder of endocrine glands with an increasing rate of incidence. Several people with this type of disease suffer from diabetic retinopathy and nephropathy. Oxidative stress is involved in the path physiology of diabetic nephropathy and retinopathy. The superoxide dismutase (SOD) enzymes play a major role in detoxification of reactive oxygen species and have a protective effect against diabetic nephropathy and retinopathy. Several studies claimed that the polymorphisms of this gene have a key-role in tissue damage results from diabetes.

Methods: In the present study, two SNPs in *SOD1* gene were analyzed in 145 patients with type 2 diabetes mellitus in Ahvaz, Iran. Blood samples of the patients and 145 individuals without diabetes as controls were collected. DNA was extracted and the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method (PCR-RFLP) was performed.

Findings: For the rs2070424 polymorphism, there were significant differences between the patients who suffer from nephropathy and the control group ($P = 0.005$; $\chi^2 = 7.55$); but no significant difference in the rate of this gene polymorphism between the patients with retinopathy and the control group was seen. The analysis of rs2234694 polymorphism showed that all individuals with and without diabetes had AA genotype. Therefore, it was impossible to perform any statistical test to determine the relationship of this polymorphism and diabetic nephropathy or retinopathy.

Conclusion: Understanding the role of polymorphisms of *SOD1* gene to modify the course of retinopathy could be an important target for future pharmacological interventions.

Keywords: Diabetes mellitus, *SOD1* gene, Polymorphism, Genetic, Case-Control study

Citation: Mohammadi-Asl J, Soleimanizadeh A, Shahbazian HB, Shahbazian H, Neda Golchin. Genetic Polymorphisms of Superoxide Dismutase 1 and Its Relationship to Diabetic Neuropathy and Nephropathy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Ahvaz, Iran. J Isfahan Med Sch 2014; 32(280): 442-52

1- Assistant Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

2- Department of Genetics, Noor Genetics Lab, Ahvaz, Iran

3- Assistant Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

4- Assistant Professor, Department of Urology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

5- Department of Biochemistry, Noor Genetics Lab, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Javad Mohammadi-Asl PhD, Email: mohammadi-asl@ajums.ac.ir