مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۸۰/هفته اول خرداد ماه ۱۳۹۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۸

بررسی پلی‌مورفیسم 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 سلیمانی‌زاده[۲]، دکتر حاجیه بی‌بی شهبازیان[۳]، دکتر حشمت اله شهبازیان[۴]، ندا گلچین[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: دیابت شایع‌ترین بیماری غدد درون‌ریز و یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غیر واگیر دنیا است که سالانه افراد زیادی را درگیر می‌کند. جمعیت فراوانی از افراد، از ابتلا به دیابت از نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی رنج می‌برند. استرس‌های اکسیداتیو در بروز این دو عارضه نقش به سزایی دارند. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD یا Superoxide dismutase) نقش عمده‌ای در سم‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن دارند. بنابراین، یک نقش محافظتی علیه نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی دارد. مطالعات مختلفی تأثیر پلی‌مورفیسم‌های مختلف این ژن را در بروز آسیب‌های بافتی افراد دیابتی آشکار کرده‌اند.

روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر، دو پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ۱۴۵ نفر از افراد بیمار (گروه مورد) و ۱۴۵ نفر از افراد سالم (گروه شاهد)، بررسی شد. نمونه‌های DNA بعد از جمع‌آوری نمونه‌ی خون افراد مورد و شاهد استخراج شد و پلی‌مورفیسم نمونه‌ها با به کارگیری روش PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با بررسی پلی‌مورفیسم rs۲۰۷۰۴۲۴ در افراد مورد و شاهد مبتلا به نفروپاتی، توزیع فراوانی ژنوتیپی معنی‌داری مشاهده شد (P = ۰/۰۰۵ و χ^2 = ۷/۵۵). در حالی که در افراد مبتلا به رتینوپاتی دیابتی، توزیع این پلی‌مورفیسم ارتباط معنی‌داری نشان نداد. از آن جا که در پلی‌مورفیسم rs۲۲۳۴۶۹۴، تمام افراد بیمار مورد مطالعه دارای ژنوتیپ AA بودند، بنابراین هیچ گونه آزمون آماری برای بررسی ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و نفروپاتی دیابتی و رتینوپاتی دیابتی قابل انجام نبود.

نتیجه‌گیری: توصیه می‌شود افرادی که در مراحل اولیه‌ی دیابت شناسایی می‌شوند، آزمایش بررسی مولکولی برای بررسی این پلی‌مورفیسم انجام شود تا افراد مستعد به ابتلا به نفروپاتی دیابتی مشخص شوند و اقدامات درمانی مناسب برای آن‌ها صورت گیرد.

واژگان کلیدی: دیابت ملیتوس، ژن Superoxide dismutase۱، پلی‌مورفیسم، ژنتیک، مطالعه‌ی مورد- شاهدی

ارجاع: محمدی اصل جواد، سلیمانی‌زاده ارغوان، بی‌بی شهبازیان حاجیه، شهبازیان حشمت اله، گلچین ندا. **بررسی پلی‌مورفیسم 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): ۴۵۲-۴۴۲

۱- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، آزمایشگاه ژنتیک نور، اهواز، ایران
۳-استادیار، گروه داخلی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۴- استادیار، گروه ارولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
۵- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی، آزمایشگاه ژنتیک نور، اهواز، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر جواد محمدی اصل
Email: mohammadi-asl@ajums.ac.ir

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 (۴-۳).

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 ۶۴-۳۵ 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 (۱۴-۱۲). 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 (Soperoxide dismutase) است.

سوپراکسید دیسموتاز مس/ روی معروف به سوپراکسید دیسموتاز ۱ یا SOD۱ (Superoxide dismutase۱) آنزیم سیتوزولی در انسان می‌باشد که توسط ژن SOD۱ با کد بین‌المللی ۶۶۴۷، کدگذاری می‌گردد (۱۵). این آنزیم یک آنتی اکسیدان قوی است که با تبدیل رادیکال‌های

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 هیپرگلاسیمی دیابتی، نقش مرکزی در آسیب سلول‌های عروقی ایفا می‌کند (۷).

مشاهدات مختلف نشان داده‌اند که میزان SOD۱ در ناحیه‌ی کلیوی بیماران مبتلا به دیابت کاهش پیدا می‌کند. در مدل‌های حیوانی فاقد SOD۱ زخم‌های کلیوی گسترش پیدا کردند و درمان آن‌ها با SOD۱ 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 SOD۱ در ایجاد نفروپاتی دیابتی دارای نقش است (۱۹).

دخالت *SOD۱* در ایجاد نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی، وجود بعضی پلی‌مورفیسم‌ها که فعالیت *SOD۱* را کاهش می‌دهند و شواهدی دال بر استعداد ژنتیکی بیماری کلیوی دیابتی، دلیل مطالعه‌ی پلی‌مورفیسم‌های ژن SOD۱ 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 SOD۱ در ارتباطند و با مراحل پیشرفته‌ی نفروپاتی و رتینوپاتی دیابتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ دخیل هستند.

در مطالعه‌ی حاضر، پلی‌مورفیسم (rs۲۲۳۴۶۹۴) +۳۵A/C که در مجاورت ناحیه‌ی اسپلایسینگ اینترون ۳/ اگزون ۳ قرار گرفت و پلی‌مورفیسم A/G (rs۲۰۷۰۴۲۴) 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 را 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 فالکون 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

(Polymerase chain reaction) بـــرای بررســـی پلـی‌مورفیســم rs۲۲۳۴۶۹۴ و rs۲۰۷۰۴۲۴ بـا کمـک پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ انجام شد. بـه منظور تکثیر قطعه‌ی ۲۳۵ بازی، واکنش PCR با دمای اتصال ۵۵/۹ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۳۰ سیکل و دمـای اتصال پرایمر ۵۸/۳ درجه‌ی سانتی‌گراد با همان تعـداد سیکل برای تکثیر قطعه‌ی ۲۵۸ بازی انجام شد.

به منظور بررسـی پلـی‌مورفیسـم‌هـا، ۱۰ واحـد از آنزیم‌های MspI و HhaI به طور جداگانـه بـرای هـر محصول PCR مورد استفاده قرار گرفتند. جهت انجام عمل هضم آنزیمـی نمونـه‌هـا در دمـای ۳۷ درجـه‌ی سانتی‌گراد برای مـدت ۱۲ سـاعت نگهـداری شـدند. ویژگی کامل آنزیم‌های برش دهنده در ایـن پـژوهش در جدول ۲ آماده است. در نهایت، نمونه‌هـا بـر روی ژل پلی‌آکریلامید ۸ درصد مورد تجزیه و تحلیل قـرار گرفتنـد. اطلاعـات بیمـاران و نتـایج بررسـی‌هـای مولکولی در نرم‌افزار SPSS وارد شد. سپس نتـایج در جداول درج گردید و بر اساس نوع متغیرها با استفاده از این نرم‌افزار، آنالیزهای آماری مناسب انجام گرفت.

آزمـون‌هـای انجـام گرفتـه شـامل آنـالیز χ^2 و محاسـبه‌ی OR (Odds ratio) بـا فاصـله‌ی اطمینـان ۹۵ درصد بودند و مقایسـه‌ی تفـاوت میـانگین‌هـا بـا استفاده از آزمون t انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه توزیع فراوانی دو پلی‌مورفیسـم SOD۱ در ۲۹۰ زن و مرد (۱۴۵ بیمار مبتلا به دیابت نـوع دو در شهر اهواز به عنوان گروه مورد و ۱۴۵ فرد سالم از جمعیت عمومی به عنوان گروه شـاهد) کـه از لحـاظ سن و جنس همسان‌سازی شده بودند، مـورد بررسـی قرار گرفتند. تعداد زنان و مردان در هـر دو گـروه بـه نسبت مساوی، بـه ترتیـب ۷۲ نفـر و ۷۳ نفـر بودنـد. میانگین سنی افراد سـالم ۱۰/۰ ± ۵۱/۳ سـال و افـراد بیمار ۹/۰ ± ۵۳/۹ سال بود..

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

نام ژن	نام پلی‌مورفیسم	توالی نوکلئوتیدی	طول محصول	نام آنزیم	طول قطعه‌ی برش خورده
SOD	(+۳۵ A/C) rs۲۲۳۴۶۹۴	F:AGGCTGTACCAGTGCAGGTC R:AAAAGCATTCCAGCATTTGG	۲۳۵	HhaI	۱۳۱ ۱۰۴
SOD	(Intron۳ A/G) rs ۲۰۷۰۴۲۴	F:TCAGAGGCCTTGGGACATAG R:GGGCTGATGCCACTAAACAT	۲۵۸	MspI	۲۲۳ ۵۸

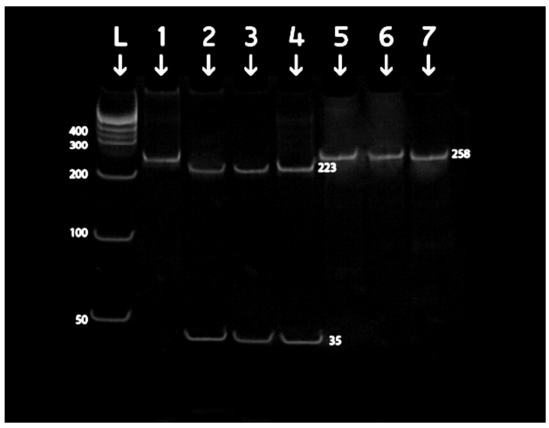
SOD: Superoxide dismutase

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

نام ژن	نام آنزیم	توالی شناسایی	شرایط واکنش (دما-درجه‌ی سانتی‌گراد)
SOD۱ (+۳۵ A/C)	HhaI	...GCGC... ...CGCG...	۳۷
SOD۱ rs :۲۰۷۰۴۲۴	MspI	...CCGG... ...GGCC...	۳۷

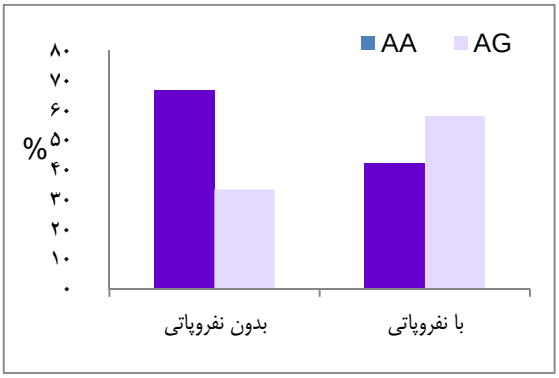
SOD: Superoxide dismutase

جهت تعیین ژنوتیپ‌های مورد نظر از تکنیک (Restriction fragment length polymorphism) RFLP استفاده شد. جهت تعیین پلی‌مورفیسم rs۲۰۷۰۴۲۴، 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).



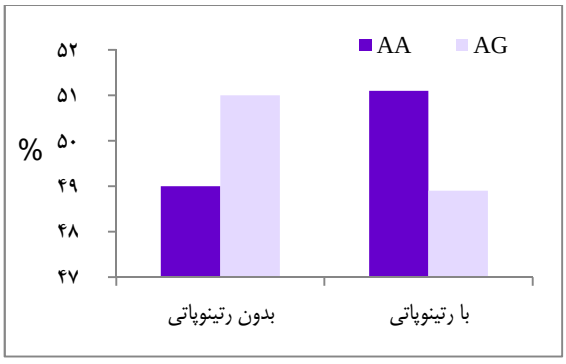
شکل ۱. پلی‌مورفیسم rs۲۰۷۰۴۲۴ در ژن SOD (Superoxide dismutase). ردیف L نشان دهنده‌ی نشانگر DNA (۵۰ bp). ردیف ۱ محصول PCR (Polymerase chain reaction) کات نشده bp ۲۵۰، ردیف‌های ۲، ۳ و ۴ محصولات کات شده با طول قطعات bp ۲۲۳ و bp ۳۵ و نشان دهنده‌ی ژنوتیپ AG، ردیف‌های ۵، ۶ و ۷ محصولات کات شده با طول bp ۲۵۸ 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 (χ^2 = ۷/۵۵ و P = ۰/۰۰۵). خطر 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.



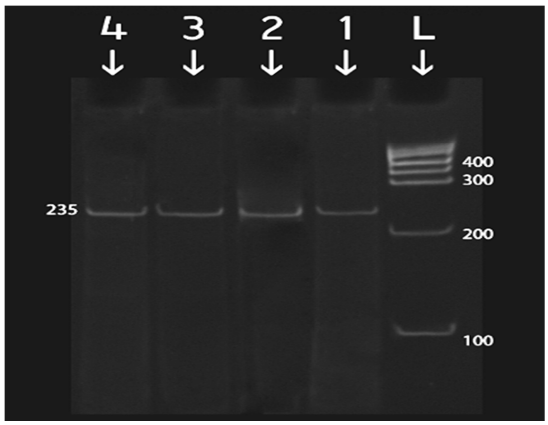
شکل ۲. ارتباط بین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs۲۰۷۰۴۲۴ در ژن SOD (Superoxide dismutase) با نفروپاتی در گروه مورد

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 (χ^2 = ۰/۰۵ و P = ۰/۸۱۰).



شکل ۳. ارتباط بین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs۲۰۷۰۴۲۴ در ژن SOD (Superoxide dismutase) با رتینوپاتی در گروه مورد

به منظور بررسی پلی‌مورفیسم A/C۳۵+ در ژن SOD۱ محصولات به دست آمده از PCR این پلی‌مورفیسم، 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. پلی‌مورفیسم A/C۳۵+ در ژن SOD۱ (Superoxide dismutase). ردیف L نشان دهنده‌ی نشانگر 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 bp ۲۳۵ و نشان دهنده‌ی ژنوتیپ AA

از آن جایی که در این نوع پلی‌مورفیسم، تمام افراد بیمار مورد مطالعه دارای ژنوتیپ AA بودند، بنابراین هیچ گونه آزمون آماری برای بررسی ارتباط بین این پلی‌مورفیسم 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 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 کنترل کننده‌ی اثر متقابل این دو عامل هنوز به درستی مشخص نیست. از این رو شناخت مکانیسم کنترل کننده‌ی 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 بیماری های چشمی دیابت (رتینوپاتی)، افزایش خطر مشکلات عصبی دیابت (نوروپاتی) در ارتباط است (۲۲).

رتینوپاتی دیابتی اغلب هیچ گونه 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 شبکیه آسیب می‌بینند، ممکن است باعث نشت مایع یا خون شوند یا منجر به رشد شاخه‌های عروقی شکننده و کلافه مانند شوند و باعث تخریب شبکیه شوند و در نتیجه، تصویری که شبکیه به مغز می‌فرستد، تار یا کج و معوج می‌شود (۲۳).

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

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 شبکیه‌ای است. هایپرگلیسمی باعث ضخیم شدن دیواره‌ی داخلی رگ‌ها می‌شود که به ناکارایی آن‌ها می‌انجامد. این آسیب‌ها و تغییرات باعث نشت کردن خون از شبکیه و همچنین نفوذ پذیری بیشتر مویرگ‌های خونی شبکیه 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).

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 ارگانل‌های سلولی نظیر میتوکندری‌ها و پراکسی زوم‌ها 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 به سزایی ایفا می‌کنند (۹).

با توجه به این که ژن SOD۱ کد کننده‌ی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است و عضوی از یک خانواده‌ی آنزیمی درگیر در تبدیل سوپراکسید به H_2O_2 می‌باشد، آنزیم SOD۱ یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در نفروپاتی دیابتی است؛ زیرا در این بیماری، میزان این آنزیم در ناحیه‌ی کلیوی کاهش می‌یابد (۱۸). چندین مطالعه به منظور بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم سوپراکسید دیسموتاز با رتینوپاتی و نفروپاتی دیابتی انجام شده است.

در مطالعه‌ی Fujita و همکاران در کشور ژاپن بر روی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، مشخص شد که پلی‌مورفیسم rs۲۰۷۰۴۲۷ در ژن *SOD۱* در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در ژاپن، با عامل نفروپاتی ارتباط داشت (۱۸). Panduru و همکاران در کشور رومانی ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم +۳۵A/C این ژن و نفروپاتی دیابتی پیدا نکردند (۳۱).

در مطالعه‌ی دیگر در کشور آمریکا، ارتباط این ژن با بروز رتینوپاتی در موش‌های مدل بررسی شد. در

این پژوهش مشخص شد که موش‌های ترانسژنیک با SOD۱ -/- در برابر آسیب ناشی از مواد اکسیداتیو، نسبت به مدل‌های موشی SOD۱ +/+ بسیار حساس‌تر و آسیب پذیرتر هستند. نتایج این آزمایش نشان داد که SOD۱، 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 پلی‌مورفیسم ۳۵A/C+ می‌باشند و در آن‌ها سطح ابتلا به نفروپاتی و رتینوپاتی بسیار کم است. در پلی‌مورفیسم rs۲۰۷۰۴۲۷، 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 هیچ گونه ارتباطی بین این پلی‌مورفیسم با رتینوپاتی مشاهده نشد.

تعداد مطالعات گزارش شده در ارتباط با تأثیر این پلی‌مورفیسم 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 بررسی اثر دیگر پلی‌مورفیسم‌های این ژن حایز اهمیت می‌باشد. بررسی پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی نقش مهمی در شناخت عوامل ژنتیکی درگیر در آسیب‌شناسی دیابت نوع ۲ دارد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که پلی‌مورفیسم ژنتیکی rs۲۰۷۰۴۲۴ در ناحیه‌ی اینترونی ۳ ژن سوپراکسید دیسموتاز ۱، سطح SOD۱ را تحت تأثیر قرار می‌دهد و ارتباط معنی‌داری با نفروپاتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ دارد. بنابراین، این پلی‌مورفیسم 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 پلی‌مورفیسم 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.

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, Abraira 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, Tangui 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. Geraldes 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):

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.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 28.01.2014
Vol. 32, No. 280, 1st Week, June 2014
Accepted: 17.04.2014

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 PhD[1], Arghavan Soleimanizadeh MSc[2],
Hajieh Bibi Shahbazian PhD[3], Heshmatollah Shahbazian PhD[4], Neda Golchin MSc[5]

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