مجله دیابت و لیپید ایران. فروردین- اردیبهشت ۱۳۹۰؛ دوره ۱۰ (شماره ۴) ۳۸۷-۳۷۸

ارتباط پلی‌مورفیسم‌های ژن واسکولوتروپین با زخم پای دیابتی

مهدیه مهراب محسنی[۱]، پروین امیری[۲]، فروغ اعظم سیاح پور[۲]، شیرین حسنی زنجبر[۲]، ناهید روحی‌پور[۲]، رامین حشمت[۲]، باقر لاریجانی[۲]، جواد توکلی بزاز[۲]، مهسا محمد آملی[۲*]

چکیده

مقدمه: پلی‌مورفیسم‌های ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) با عوارض گوناگون از جمله نوروپاتی و رتینوپاتی دیابتی ارتباط دارد. ما در این مطالعه ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن VEGF و زخم پای دیابتی را بررسی نمودیم.

روش‌ها: گروه مورد مطالعه شامل بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ واجد زخم پای دیابتی (N=۲۴۷) و فاقد زخم پای دیابتی (N=۲۴۱)؛ گروه کنترل شامل ۹۸ فرد سالم بود (N=۹۸). از روش ARMS-PCR برای تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوئیدی ژن VEGF در موقعیت‌های C/T ۷- و C/A ۲۵۷۸- استفاده شد.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ AA در بیماران واجد زخم پای دیابتی در مقایسه با افراد دیابتی فاقد زخم پای دیابتی کاهش معنی‌داری داشت (OR=۰/۴۴، ۹۵٪ CI=۰/۲۴-۰/۸۰، AA vs. CA+CC). همچنین کاهش معنی‌داری در فراوانی آلل A در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی در مقایسه با کنترل‌های سالم وجود داشت (OR=۰/۶۸، ۹۵٪ CI= ۰/۴۸-۰/۹۶، P=۰/۰۲).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که فراوانی آلل A در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی کمتر بود که نشان دهنده اثر حمایتی این آلل است. سازوکار احتمالی، کاهش رگزایی در بیماران فاقد این آلل می‌باشد.

واژگان کلیدی: VEGF (واسکولوتروپین)، زخم پای دیابتی، پلی‌مورفیسم

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

۲- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

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

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-16]

مقدمه

واژه پای دیابتی به همه زخم‌های پا که در نتیجه دیابت و عوارض آن بروز نموده‌اند، اشاره دارد [۱]. خطر رویداد زخم پای دیابتی در طول زندگی بیماران دیابتی ۲۵٪ است و رخداد سالانه زخم پای دیابتی، ۴-۱٪ تخمین زده می‌شود در حالی که بیش از ۵۰٪ بیماران مبتلا به دیابت نوع۲، نوروپاتی دیابتی را در سنین بالاتر از ۶۰ سال نشان می‌دهند [۴-۲]. در بین چندین فاکتور رشد دخیل در گسترش عوارض تأخیری دیابت، به VEGF توجه روزافزونی می‌شود [۸-۵]. نام دیگر VEGF، واسکلو-تروپین یا فاکتور نفوذپذیری عروق (VPF) است که به وسیله اندوتلیوم عروقی، پری سیت‌ها، اپتیلیوم پیگماندار شبکیه، ماکروفاژها، لنفوسیت‌های T و برخی سلول‌های دیگر تولید می‌شود [۹]. ژن VEGF روی کروموزوم شماره ۶ قرار گرفته و حاوی ۸ اگزون و ۷ انترون می‌باشد و طولی معادل ۱۴kb دارد [۱۰]. VEGF میتوژنی برای سلول‌های اندوتلیال عروقی بوده و موجب القای نفوذ-پذیری می‌گردد [۱۱]. پلی‌مورفیسم VEGF اثر مهمی بر میزان بیان mRNA دارد [۱۲]. VEGF همچنین باعث القای کلاژناز شده و رگزایی را از طریق هضم ماتریکس تحریک کرده، سبب تسهیل مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیال می‌شود [۱۳]. همچنین تغییر در بیان ژن VEGF، روشی مؤثر در درمان عوارض دیابت است [۱۴]. رگزایی نامناسب در بیماران دیابتی از بهبود زخم ممانعت بعمل می‌آورد زیرا رگزایی برای تشکیل بافت جدید، اکسیژن رسانی و تغذیه زخم ضروری است [۱۵،۱۶]. گیرنده‌های VEGF (VEGFR-1,2) به میزان زیادی در سطح سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شوند. VEGFR-1(Flt) باعث افزایش نفوذپذیری عروق می‌شود و VEGFR-2 (Flk-1) در رگزایی شرکت می‌کند [۹].

نوروپاتی محیطی یکی از رایج‌ترین عوامل مؤثر در ایجاد زخم پای دیابتی است. گروه‌بندی فامیلیال عوارض دیابتی در T1DM [۱۷-۲۱] و T2DM گزارش شده است [۲۲-۲۴]. نقش نژاد در پیشرفت نوروپاتی دیابتی و شیوع متفاوت زخم پا در جمعیت‌های گوناگون، ممکن است نقش فاکتورهای ژنتیکی در دیابت و متعاقباً زخم پای دیابتی، را متذکر گردد [۱،۲۵]. برخی از مطالعات ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن VEGF و عوارض گوناگون [۲۶-۲۷] شامل نفروپاتی [۲۸] و رتینوپاتی دیابتی [۲۹] را بررسی کرده‌اند.

بررسی تنوع ژن VEGF با انجام مطالعات ارتباط ژنتیکی، می‌تواند وسیله‌ای برای اندازه‌گیری اثر فنوتیپی این پلی‌مورفیسم‌ها بر روی مقاومت یا استعداد ابتلا به زخم پای دیابتی باشد. در این مطالعه، ما ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های VEGF در دو موقعیت C/A-۲۵۷۸- و T/C-۷- را با زخم پای دیابتی در جمعیت ایرانی بررسی نمودیم.

روش‌ها

جمعیت بیمار

جمعیت مورد مطالعه شامل بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ واجد زخم پای دیابتی (N= ۲۴۷) و فاقد زخم پای دیابتی (N= ۲۴۱) و کنترل سالم (N= ۹۸) بود که در سال‌های ۸۸-۱۳۸۷ به کلینیک دیابت بیمارستان علی‌بن ابیطالب وابسته به دانشگاه رفسنجان مراجعه می‌نمودند. 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 تهیه اطلاعات شخصی و دموگرافیک، ۵cc-۳ خون وریدی در لوله‌های EDTA جمع‌آوری شد و برای استخراج DNA در دمای ۲۰°C- ذخیره شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه تهران تصویب شد. از همه بیمارانی که در مطالعه شرکت کردند، رضایت‌نامه کتبی تهیه شده است.

معیارهای تشخیص

تشخیص بیماری دیابت بر طبق ضوابط American Diabetes Association Criteria انجام شد [۳۰]. رتینوپاتی دیابتی بوسیله متخصص چشم بر اساس بررسی و معاینات شبکیه و چشم تأیید شد. نفروپاتی دیابتی با میکرو آلبومینوریای بیشتر از ۳۰ mg/۲۴ h و پروتئینوری در ۲ یا

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-16]

۳ نمونه ادرار تأیید شد [۳۱]. نوروپاتی بر اساس علائم تعریف شده از سوی Diabetes Control and Complication Trial criteria تشخیص داده شد [۳۱]. تشخیص زخم پا و تعیین درجه آن (شدت زخم) بر اساس سیستم درجه‌بندی واگنر صورت گرفته است [۳۲].

تعیین ژنوتیپ SNPs

تکنیک ARMS-PCR برای تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوئیدی ژن VEGF در دو موقعیت C/T-۷ و C/A-۲۵۷۸ به کار رفته است. توالی پرایمرهای طراحی شده و اندازه محصولات در جدول ۱ توضیح داده شده‌اند. از محلول master mix برای تکثیر DNA در موقعیت C/T-۷ استفاده شد که شامل مواد ذیل بود:

DNA ژنومی ۴ µl، جفت پرایمرهای اختصاصی برای هر آلل ۲ Pmol/µl، جفت پرایمرهای β-actin ۰/۷ mol/µl، $mgcl_2$ ۴ mM/۸، dNTPs ۵۰µM، DMSO (V/V) ۱۰٪، آنزیم Taq DNA پلی‌مراز ۱ U/ml، ۱/۵ µM از ×۱۰ بافر حاوی (V/V) tween۲۰ ٪۰/۱ $mM(NH_4)_2SO_4$ ۲۰۰ (۷۵۰ ml tris-Hcl "pH= ۸/۸, ۲۵°C") پس از درب‌بندی این مخلوط واکنش ۱۵ میکرولیتری در یک دستگاه ترموسایکلر (MJ Research Inc) با برنامه زیر تکثیر شد:

تغییر ماهیت اولیه °C ۹۵ به مدت ۴ دقیقه، ۹ چرخه با شرایط:۳۰ ثانیه در °C۹۵ (Denaturation)،۵۰ ثانیه در °C۶۵ (annealing)، ۹۰ ثانیه در °C۷۲ (extention) (مرحله امتداد یافتن پرایمر)، و در هرچرخه دما °C ۰/۵ کاهش یابد و ۲۹ چرخه با شرایط: ۳۰ ثانیه در °C۹۵ (Denaturation)، ۵۰ ثانیه در °C۴۴/۵ (annealing)، ۹۰ ثانیه در °C۷۲ (extention) و در هر چرخه دما °C ۰/۵ کاهش یابد (هنگامی که اختلاف forward Tm با reverse Tm از °C ۵ بیشتر است Annealing رخ نمی‌دهد. برای غلبه بر این مشکل باید از برنامه Touchdown PCR استفاده نمود). از محلول master mix برای تکثیر DNA در موقعیت A/C-۲۵۷۸ استفاده نمودیم که شامل مواد ذیل بود:

DNA ژنومی۲ µl، جفت پرایمرهای اختصاصی برای هر آلل ۵ Pmol/µl، جفت پرایمر β-actin ۰/۲mol/µl، آمپلی‌کون ۳/۵µl حاوی (۰/۴ mM dNTPs، آنزیم Taq DNA پلی‌مراز 0.05 Units/ul (این آنزیم باید به صورت 0.5 X استفاده شود)، رنگ قرمز و یک پایدار کننده، mM $(NH_4)_2so_4$ ۴۰ یا ۴-۳mM $mgcl_2$، ۲٪ tween۲۰، mM ۱۵۰ Tris-HCl و PH=۸/۵) پس از درب‌بندی این مخلوط واکنش ۱۰ میکرولیتری در یک دستگاه ترموسایکلر (MJ Research Inc) با برنامه ذیل تکثیر شد:

تغییر ماهیت اولیه °C ۹۵ به مدت ۴ دقیقه، ۲۹ چرخه با شرایط: ۳۰ ثانیه در °C۹۵ (Denaturation)،۳۰ ثانیه در °C۶۰ (annealing)، ۳۰ ثانیه در °C۷۲ (extention) و ۵ دقیقه در °C۷۲ (extention) (مرحله نهایی امتداد یافتن پرایمر) محصول PCR در ژل آگاروز ۲٪ که با ۵ml اتیدیوم بروماید ۰/۵mg/ml رنگ‌آمیزی شده بود، رویت شد و ژنوتیپ‌ها بر اساس حضور یا عدم حضور توالی تکثیر شده هدف مشخص شدند (شکل ۱ و ۲).

آنالیز آماری

میزان ارتباط بین گروه‌های متفاوت و آلل‌ها یا ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم ژن eNOS، با استفاده از confidence interval (CI), odds ratios (OR) ۹۵٪، تخمین زده شد. برای آنالیز داده‌ها از chi-square یاFisher exact استفاده شد. آنالیز رگرسیون لجستیک برای adjustment استفاده شد. در رگرسیون لجستیک گروه کنترل سالم، بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲، بیماران دیابتی دارای عوارض، به عنوان متغیرهای مستقل و سن، جنسیت، سابقه خانوادگی ابتلا به دیابت و مدت زمان ابتلا به دیابت به عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. همه آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار STATA ویرایش ۸ و SPSS ویرایش ۱۱/۵ صورت گرفت. $P\leq ۰/۰۵$ به عنوان اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشخصات دموگرافیک بیماران و افراد کنترل سالم در جدول ۲ نشان داده شده است. فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها برای هر یک از پلی‌مورفیسم‌ها در بیماران واجد و فاقد زخم پای دیابتی با کنترل‌های سالم مقایسه شدند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-16]

مطالعه ما نشان داد که توزیع پلی‌مورفیسم ژن VEGF در موقعیت ۲۵۷۸- در بیماران واجد زخم پای دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم تفاوت معنی‌داری دارد. فراوانی ژنوتیپ AA در بیماران واجد زخم پای دیابتی در مقایسه با دیابتی‌های فاقد زخم پای دیابتی نیز کاهش چشم‌گیری داشت، که وجود یک اثر حمایتی را پیش‌بینی می‌کند (CI=۰/۲۴-۰/۸۰ ،۹۵٪ OR= ۰/۴۴ ،P=۰/۰۰۳، AA vs CA+CC) (جدول ۳). همچنین کاهش چشم‌گیری در فراوانی آلل A در بیماران واجد زخم پای دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم مشاهده شد (CI= ۰/۴۸-۰/۹۶ ،۹۵٪ OR=۰/۶۸، P=۰/۰۲).

در مورد پلی‌مورفیسم‌های C/T۷- و C/A ۲۵۷۸- هیچ تفاوت معنی‌داری در فراوانی ژنوتیپ و آلل آن بین بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و گروه کنترل سالم مشاهده نشد (جدول ۳). همچنین ارتباط معنی‌داری بین این دو پلی‌مورفیسم ژن VEGF و نفروپاتی، رتینوپاتی و نوروپاتی دیابتی مشاهده نشد.

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

	Primer name	Sequence	NT.	Pcr product size
VEGF (-۷ C/T)	Generic primer	5´- GGTGTGCGCAGACAGTGCT -3´	19	۱۸۳ bp
	Primer C anti- sense	5´-AGCAGAAAGTTCATGGTTTCG-3´	21	
	Primer T anti- sense	5´-AGCAGAAAGTTCATGGTTTCA-3´	21	
VEGF (-۲۵۷۸ A/C)	Generic primer	5´ -TTAGGACACCATACCGATGG-3´	20	۲۲۳ bp
	Primer C anti- sense	5´ -TCTGATTATCCACCCAGATCG-3´	21	
	Primer A anti- sense	5´ -TCTGATTATCCACCCAGATCT-3´	21	
Beta actin (control primer)	Forward primer sequence	5´ - CTTCCTTCCTGGGCATGGAG-3´	20	۳۱۵ bp
	Reverse primer sequence	5´ - TGGAGGGGCCGGACTCGTCA-3´	20	

جدول۲- مشخصات بیماران دیابتی مبتلا به زخم پای دیابتی، بیماران دیابتی فاقد زخم پای دیابتی و کنترل‌های سالم

متغیرهای کیفی تعداد (درصد)	کنترل های سالم تعداد (درصد)	بیماران دیابتی فاقد زخم پای دیابتی تعداد (درصد)	زخم پای دیابتی تعداد (درصد)
جنسیت			
مرد	۵۷ (۵۸/۲)	۶۶ (۲۸/۱)	۱۵۴ (۶۲/۳)
زن	۴۱ (۴۱/۸)	۱۶۹ (۷۲)	۹۳ (۳۷/۷)
سن (سال)	۱۰±۵۴	۱۰/۳±۵۳	۱۰/۱±۵۸ *
سابقه خانوادگی ابتلا به دیابت			
دارد	۲۷ (۲۸/۱)	۱۳۱ (۶۵/۲)	۱۶۵ (۶۵/۶) **
ندارد	۲۶ (۷۱/۹)	۱۰۲ (۴۳/۸)	۸۲ (۳۵/۵)
مدت زمان ابتلا به دیابت (سال)		۵/۷±۷/۶	۱۰±۱۶/۲ ***

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

*سن افراد مبتلا به زخم پای دیابتی نسبت به دو گروه کنترل سالم و بیماران دیابتی فاقد زخم پا به طور معنی‌داری افزایش داشت (P< ۰/۰۵).

**در افرادی که دارای سابقه خانوادگی ابتلا به دیابت بودند، افزایش معنی‌داری در ابتلا به زخم پای دیابتی مشاهده گردید.

***در افرادی که مدت مدیدی است به دیابت مبتلا شده‌اند، افزایش معنی‌داری در ابتلا به زخم پای دیابتی مشاهده گردید.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-16]

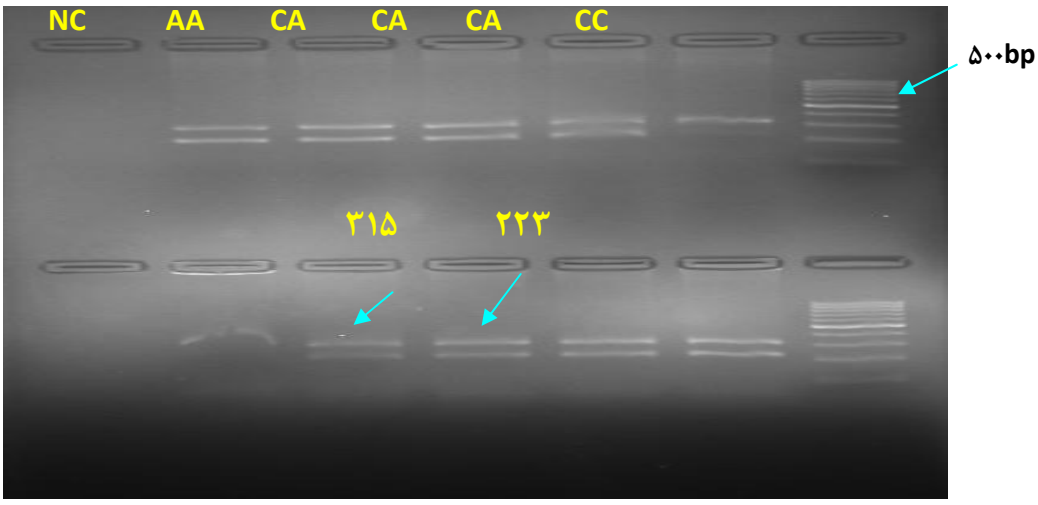
جدول ۳- توزیع فراوانی ژنوتیپ و آلل پلی‌مورفیسم C/A*۲۵۷۸- و C/T*۷- ژن VEGF در کنترل‌های سالم، افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ و افراد دیابتی مبتلا به زخم پای دیابتی

C/A* VEGF ۲۵۷۸-	کنترل های سالم تعداد(درصد)	بیماران مبتلا به دیابت تیپ۲ تعداد(درصد)	زخم پای دیابتی تعداد(درصد)
ژنوتیپ			
CC	(۲۲/۴) ۲۲	(۲۹/۰) ۶۳	(۲۷/۵) ۶۸
CA	(۴۸/۰) ۴۷	(۴۹/۸) ۱۰۸	(۵۶/۶) ۱۴۰
AA	(۲۹/۶۱) ۲۹	(۲۱/۲) ۴۶	$ (۱۵/۷) ۳۹
آلل			
C	(۴۶/۰) ۹۱	(۵۳/۹) ۲۳۴	(۵۶/۰) ۲۷۶
A	(۵۴/۰) ۱۰۵	(۴۶/۰) ۲۰۰	#(۴۴/۰) ۲۱۸
C/T* VEGF ۷-			
ژنوتیپ			
CC	(۷۵/۸) ۷۲	(۷۱/۸) ۱۵۸	(۷۷/۸) ۱۸۶
CT	(۲۳/۲) ۲۲	(۱۷/۳) ۳۸	(۱۷/۹) ۴۳
TT	(۱/۱) ۱	(۰/۹) ۲	(۴/۰) ۱۰
آلل			
C	(۸۷/۳) ۱۶۶	(۸۹/۳) ۳۵۴	(۸۶/۸) ۴۱۵
T	(۱۲/۶) ۲۴	(۱۱/۷) ۴۲	(۱۳/۱) ۶۳

* در آزمون Chi-square، از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد (P< ۰/۰۵).

$ AA vs CA+CC ،OR=۰/۴۴ ،٪۹۵ CI=۰/۲۴-۰/۸۰

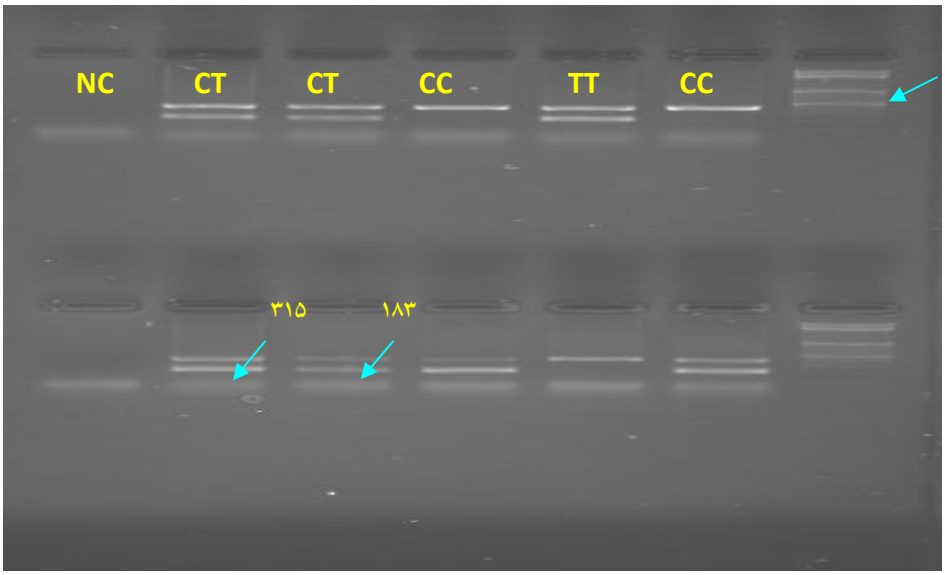
OR=۰/۶۸ ،٪۹۵ CI=۰/۴۸-۰/۹۶



شکل ۱- تصویر ژل آگاروز برای تعیین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم ۲۵۷۸ - ژن VEGF

باند مربوط به ژن بتا اکتین می باشد که به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است. در ردیف بالا در ساخت master از پرایمر مربوط با آلل A و در ردیف پایین از پرایمر مربوط به آلل T استفاده نمودیم که محصول بدست آمده از PCR، bp ۲۲۳طول دارد .

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-16]



شکل۲- تصویر ژل آگاروز برای تعیین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم ۷- ژن VEGF

باند ۳۱۵ bp مربوط به ژن بتا اکتین می باشد که به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است. . در ردیف بالا در ساخت master از پرایمر مربوط با آلل T و در ردیف پایین از پرایمر مربوط به آلل C استفاده نمودیم که محصول بدست آمده از PCR، ۱۸۳ bpطول دارد .

بحث

شواهدی وجود دارند که دلالت می‌کند استعداد ابتلا به عوارض دیابت به طور نسبی تحت کنترل فاکتورهای ژنتیکی قرار دارد. بنابراین با توجه به این که VEGF به عنوان یک واسطه در عوارض دیابت نقش دارد، بررسی پلی‌مورفیسم‌های ژن VEGF در یک مطالعه شاهد-کنترل می‌تواند روش مناسبی برای تجزیه و تحلیل اثر این ژن در بروز زخم پای دیابتی باشد.

ما در این مطالعه مشاهده نمودیم که پلی‌مورفیسم ۲۵۷۸C/A- ژن VEGF با زخم پای دیابتی در جمعیت ایرانی همبستگی دارد. پیش از این همبستگی بین این پلی‌مورفیسم و چندین بیماری دیگر از جمله آترواسکلروز، سرطان ریه، بیماری آلزایمر و بقای عضو پیوندی (graft survival) گزارش شده است [۲۹].

شواهد موجود حاکی از نقش VEGF در گسترش عوارض مزمن دیابت و پیامدهای آن می‌باشد. توانایی VEGF در القای نفوذپذیری عروقی ۵۰ هزار بار بیشتر از اثر هیستامین در مویرگ‌های پوست است [۳۳].

در پاتوژنز عوارض دیابتی به VEGF توجه روزافزون می‌شود زیرا VEGF، رگزایی و نفوذپذیری بالای مویرگ‌ها و همچنین اتساع عروقی وابسته به اندوتلیال را تحریک می‌کند. شواهدی مبنی بر تغییر سطح سرمی و بافتی VEGF در عوارض دیابت وجود دارد. VEGF در عملکرد اندوتلیوم که نقص در آن یک سازوکار واحد در پاتوژنز عوارض دیابتی است نقش دارد [۳۲]. بر طبق نتایج حاصل از مطالعه Bao و همکارانش، VEGF از طریق تحریک اپیتلیزاسیون و رسوب‌گذاری کلاژن موجب بهبود زخم می‌گردد. استفاده از پروتئین VEGF با روش‌های جدید انتقال مثل ژن درمانی، موجب افزایش بهبود زخم‌های مزمن می‌گردد [۳۴]. در مطالعه‌ای که Isner و همکارانش انجام دادند، DNA برهنه کد کننده VEGF را به ماهیچه ایسکمی خرگوش منتقل کردند و مشاهده نمودند که هدایت عصبی افزایش یافته یا هدایت عصبی بهبود می‌یابد و پتانسیل عمل عصب حسی نیز بهبود می‌یابد [۳۵]. به علاوه، ژن درمانی به وسیله VEGF از نابودی اکسون و تجزیه میلین جلوگیری می‌کند یا آن را بهبود می‌بخشد. این ناهنجاری‌ها در جانورانی دیده می‌شد که دچار درجاتی از ایسکمی اندام انتهایی بودند. VEGF باعث تحریک مهاجرت و جلوگیری از القای آپوپتوز سلول‌های شوآن در شرایط هیپوکسی می‌گردد [۳۵]. در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-16]

مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که تزریق ایزوفرم $VEGF_{165}$-A به تنهایی موجب تحریک رشد اعصاب و بهبود آن می‌گردد. در مدل‌های خرگوش و موش صحرایی واجد DNU، انتقال ژن $VEGF_{165}$-A موجب بهبود کامل سرعت هدایت عصبی می‌گردد که در اثر دیابت آسیب دیده بود [۳۶].

در چندین مطالعه اثبات شده است که VEGF-A نقش مهمی در بهبود سیستم عصبی دارد. شواهدی وجود دارد که بر نقش مستقیم VEGF-A در حمایت از سیستم عصبی دلالت می‌کند. در مطالعات انجام شده نقش VEGF بر عملکرد رده سلولی مشتق شده از اعصاب (مانند NSC34,HN33) و همچنین در برابر کمبود سرم و گرسنگی سلولی، شرایط نامساعد هیپوکسی، فاکتور کشنده تومور-α (TNF-α) و استرس اکسیداتیو اثبات شده است. بعلاوه، VEGF-A فاکتور حمایتی و فاکتور رشد سلول شوآن است که وظیفه اصلی آن میلین‌سازی است و از عملکرد نورون حمایت می‌کند [۳۶].

حضور فیبروبلاست در ترمیم زخم ضروری است. در فیبروبلاست سالم در شرایط هیپوکسی تولید VEGF، به ۳ برابر افزایش می‌یابد، در حالی که در فیبروبلاست دیابتی در شرایط هیپوکسی تولید VEGF افزایش نمی‌یابد (۰/۰۰۱ >P). فیبروبلاست دیابتی دارای نقایص متعددی در فرآیندهای سلولی است از جمله مهاجرت سلولی، تولید VEGF و پاسخ به هیپوکسی است که در ترمیم بافت ضروری‌اند. همزمان با آغاز هیپرگلیسمی، ناهنجاری‌های مرتبط با VEGF نیز رخ می‌دهد که نشانگر نقش عملکرد ناقص فیبروبلاست در ترمیم ناقص زخم دیابتی است و همچنین مکانیسمی برای نتایج بالینی ضعیف که بعد از آسیب ایسکمی در افراد دیابتی رخ می‌دهد، می‌باشد [۳۷].

بر اساس مطالعات قبلی افزایش بیان ژن VEGF با تنوع ساختار ژن ارتباط دارد [۳۸-۴۰]. به عنوان مثال نشان داده شده است که بیماران دیابتی مبتلا به رتینوپاتی در پاسخ به شرایط هیپوکسی VEGF کمتری تولید می‌کنند که ممکن است توجیه کننده این موضوع باشد که در برخی از بیماران دیابتی با وجود گذشت مدت مدیدی از ابتلا به دیابت، رتینوپاتی رخ نمی دهد [۴۱]. بنابراین پلی‌مورفیسم‌های ژن VEGF، مارکرهای بالقوه‌ای برای بررسی اساس ژنتیکی عوارض دیابت می‌باشند. به ویژه در حالتی که این پلی‌مورفیسم‌ها میزان بیان ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند، احتمال اثرگذاریشان بیشتر است. در مطالعه‌ای که توکلی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، نقش پلی‌مورفیسم ژن VEGF در بروز استعداد یا مقاومت افراد دیابتی نسبت به رتینوپاتی دیابتی را ارزیابی نموده و توزیع فراوانی چهار پلی‌مورفیسم در موقعیت‌های ۷C/T-، ۱۰۰۱ G/C-، ۱۱۵۴ G/A- و ۲۵۷۸ G/A- در بین بیماران مبتلا به TIDM (۲۴۸ نفر) و زیرگروه‌های واجد رتینوپاتی (۱۳۵ نفر) و فاقد رتینوپاتی (۱۱۳ نفر) و گروه کنترل سالم (۹۵ نفر) که همگی از جمعیت بریتانیایی- قفقازی بودند را بررسی کردند [۴۲].

با مقایسه توزیع فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیک در بین جمعیت‌های بیمار، کنترل سالم و همچنین در بین دو زیرگروه دیابتی‌های واجد رتینوپاتی (DR^+) و فاقد رتینوپاتی (DR^-)، تنها در فراوانی پلی‌مورفیسم ۷ C/T- و در مقایسه دو زیرگروه اخیر (DR^+، DR^-) اختلاف معناداری قابل مشاهده بود (OR=۱/۹۸؛ P=۰/۰۰۲) [۴۲]. مطالعات نشان داده‌اند که بیان mRNA ژن VEGF در بیمارانی که ناقل آلل A هستند، بیشتر است [۱۲]. در مطالعه‌ای دیگر بیان mRNA ژن VEGF همچنین در مایع دیالیز صفاقی بیماران دارای ژنوتیپ ۲۵۷۸C/A- ژن VEGF در مقایسه با افرادی که ژنوتیپ A/A و C/A دارند، بسیار پایین‌تر گزارش شده است [۴۳].

عملکرد ناقص اندوتلیال و افزایش نفوذپذیری عروق خونی در نفروپاتی دیابتی مشاهده می‌شود. VEGF یک گلیکوپروتئین همودایمر به شدت محافظت شده است که رگزایی را تحریک کرده و یک عامل بالقوه برای نفوذپذیری عروق کوچک[۲] است و تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروقی را در بسیاری از انواع بافت‌ها از جمله مویرگ‌های گلومرول تنظیم می‌کند [۴۴].

چندین مطالعه نشان داده‌اند که بیان VEGF در بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی افزایش می‌یابد و VEGF در پیشرفت DN نقش دارد [۴۵].

1- Micro vascular

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-16]

در مطالعه حاضر از میان دو پلی‌مورفیسم مطالعه شده ژن VEGF، ارتباط قوی بین زخم پای دیابتی و پلی‌مورفیسم C/A ۲۵۷۸- مشاهده شد که تفاوت در دو سطح ژنوتیپ و آلل بین بیماران دیابتی مبتلا به زخم پا و کنترل‌های سالم دیده شد؛ در حالی که آلل کمیاب A، دارای نقش حمایتی می‌باشد. در یک مطالعه ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و رتینوپاتی دیابتی پرولیفراتیو (PDR) در جمعیت ژاپنی دیده شد [۲۹] و آلل A به عنوان فاکتور خطرزا در گسترش (PDR) شناخته شده است که نتایج به دست آمده از مطالعه ما را تأیید می کند. افزایش بیان VEGF باعث پیشرفت رتینوپاتی دیابتی می‌گردد در حالیکه بر پیشرفت نوروپاتی دیابتی اثر معکوس دارد. بنابراین از این مطالعه می‌توان این گونه نتیجه گرفت که فراوانی کمتر آلل A ممکن است منجر به رگ‌زایی نامناسب در بیماران و در نتیجه ابتلا به زخم پای دیابتی گردد.

اخیراً Brem و همکارانش در مطالعه‌ای ایزوفرم ۱۶۵ VEGF را با استفاده از وکتور آدنو ویروس به زخم منتقل کرده و شاهد بهبود زخم در مدل‌های حیوانات دیابتی بوده‌اند [۴۶،۲]. همچنین اخیراً استفاده از فرآورده‌های نوترکیب VEGF به منظور درمان زخم پای دیابتی پیشنهاد شده و تحت بررسی است [۴۷].

در نتیجه بر اساس اطلاعات به دست آمده در این مطالعه، پلی‌مورفیسم C/A۲۵۷۸- ژن VEGF می‌تواند در تشخیص زخم پای دیابتی کاربرد داشته باشد. انجام مطالعات بیشتر برای تأیید نتایج به دست آمده از این مطالعه در جمعیت‌های گوناگون مورد نیاز است.

سپاسگزاری

هزینه مالی ابن تحقیق توسط مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران تأمین گردیده است.

مآخذ

1. Boulton AJ. The diabetic foot: grand overview. Epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24 (Suppl 1):S3-6.
2. Rico T, Green J, Kirsner RS. Vascular endothelial growth factor delivery via gene therapy for diabetic wounds: first steps. *J Invest Dermatol* 2009; 129:2084.
3. Boulton AJ, Armstrong DG, Albert SF, Frykberg RG, Hellman R, Kirkman MS, Lavery LA, LeMaster JW, Mills JL Sr, Mueller MJ, Sheehan P, Wukich DK; Task Force of the Foot Care Interest Group of the American Diabetes Association.Comprehensive foot examination and risk assessment. *Endocr Pract* 2008; 14: 576-83.
4. Setacci C, de Donato G, Setacci F, Chisci E. Diabetic patients. Epidemiology and global impact. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2009; 50: 263-73.
5. Aiello LP, Wong JS. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int* 2000; 77: S113-9.
6. Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El-Remessy AE, Al-Shabrawey M, Platt DH, Caldwell RW.Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19: 442-55.
7. Khamaisi M, Schrijvers BF, De Vriese AS, Raz I, Flyvbjerg A. The emerging role of VEGF in diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:1427-1430.
8. Leinninger GM, Vincent AM, Feldman EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2004; 9:26–53.
9. Ferrara N .Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress.
10. Sfar S, Saad H, Mosbah F, Chouchane L Combined effects of the angiogenic genes polymerphhhisms on prostate cancer susceptibility and aggressiveness. *Mol Biol Rep* 2009; 36:37-45.
11. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146:1029-39.
12. Marsh S, Nakhoul FM, Skorecki K, Rubin A, Miller BP, Leibu R, Levy NS, Levy AP .Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is markedly decreased in diabetic individuals who do not develop retinopathy. *Diabetes Care* 2000; 23:1375-80.
13. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP.Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; 153:557-62.
14. Mu H, Zhang XM, Liu JJ, Dong L, Feng ZL Effect of high glucose concentration on VEGF

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-16]

and PEDF expression in cultured retinal Müller cells. *Mol Biol Rep* 2009; 36:2147-51. 24.
15. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Microsc Res Tech. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix 2003; 160: 107-14.
16. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1989; 320:1161-5.
17. Borch-Johnsen K, Norgaard K, Hommel E, Mathiesen ER, Jensen JS, Deckert T, Parving HH. Is diabetic nephropathy an inherited complication? *Kidney Int* 1992; 41:719-22.
18. Earle K, Walker J, Hill C, Viberti G. Familial clustering of cardiovascular disease in patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 1992; 326:673-7.
19. Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia* 1996; 39:940-5.
20. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* 1997; 46:1829-39.
21. Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990; 33:438-43.
22. Faronato PP, Maioli M, Tonolo G, Brocco E, Noventa F, Piarulli F, Abaterusso C, Modena F, de Bigontina G, Velussi M, Inchiostro S, Santeusanio F, Bueti A, Nosadini R. Clustering of albumin excretion rate abnormalities in Caucasian patients with NIDDM. The Italian NIDDM Nephropathy Study Group. *Diabetologia* 1997; 40:816-23.
23. Canani LH, Gerchman F, Gross JL. Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 1999; 48:909-13.
24. Abbott CA, Carrington AL, Ashe H, Bath S, Every LC, Griffiths J, Hann AW, Hussein A, Jackson N, Johnson KE, Ryder CH, Torkington R, Van Ross ER, Whalley AM, Widdows P, Williamson S, Boulton AJ; North-West Diabetes Foot Care Study.The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. *Diabet Med* 2002; 19:377-84.
25. Onen IH, Konac E, Eroglu M, Guneri C, Biri H, Ekmekci A .No association between polymerphism in the vascular endothelial growth factor gene at position -460 and sporadic prostate cancer in the Turkish population. *Mol Biol Rep* 2008; 35:17-22.
26. Tavakkoly-Bazzaz J, Amoli MM, Pravica V, Chandrasecaran R, Boulton AJ, Larijani B, Hutchinson IV. VEGF gene polymorphism association with diabetic neuropathy. *Mol Biol Rep* 2010; 37:3625-30.
27. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, Kitano S, Iwamoto Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of proliferative diabetic retinopathy. Graefes *Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247:21-6.
28. Senger DR, Connolly DT, Van de WL, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990; 50:1774-8.
29. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res* 1997; 34:55-68.
30. 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(9): 2019-22.
31. Mehrab-Mohseni M, Hasani-Ranjbar Sh, Amiri P, Kouroshnia A, Tavakkoly Bazzaz J, Farahani-Shrhabi M, et al. Endothelial nitric oxide synthase VNTR (intron 4 a/b) polymorphism association with type 2 diabetes and its chronic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011 91(3): 348-352.
32. Wagner FW Jr. The dysvascular foot: a system for diagnosis and treatment. *Foot Ankle* 1981; 2:64-122.
33. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:902-6.
34. Bao Ph, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko M.S, Ehrlich H.P, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research* 2009; 153(2):347-358.
35. Veves A, King G L. Can VEGF reverse diabetic neuropathy in human subjects?. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; 107(10):1215-8.
36. Price S A, Dent C, Duran-Jimenez B, Liang Y, Zhang L, Rebar E J, et al. Gene Transfer of an Engineered Transcription Factor Promoting Expression of VEGF-A Protects Against Experimental Diabetic Neuropathy. *DIABETES* 2006; 55: 1847-1854.
37. Lerman O.Z, Galiano R.D, Armour M, Levine J.P, Gurtner G.C. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: Impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *The American Journal of Pathology* 2003; 162(1): 303-312.
38. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-16]

vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000; 12: 1232-5.
39. Shahbazi M, Fryer M, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. Vascular endothelial growth factor gene polymorph isms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 260-4.
40. Wang T, Hu K, Ren J, Zhu Q, Wu G, Peng G. Polymorphism of VEGF-2578C/A associated with the risk and aggressiveness of nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. *Mol Biol Rep* 2010; 37:59-65.
41. Lin TH, Wang CL, Su HM, Hsu PC, Juo SH, Voon WC, Shin SJ, Lai WT, Sheu SH Functional vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and diabetes: effect on coronary collaterals in patients with significant coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1688-93.
42. Bazzaz JT, Amoli MM, Pravica V, Chandrasecaran R, Boulton AJ, Larijani B, Hutchinson IV. eNOS gene polymorphism association with retinopathy in type 1 diabetes. *Ophthalmic Genet* 2010; 31:103-7.
43. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146:1029-39.
44. Buraczynska M, ksiazek P, Baranowicz-Gaszczyk I, Jozwiak L. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 828-832.
45. McKnighta AJ, Maxwella AP, Pattersonb ChC, Bradyc HR, Savagea DA. Association of VEGF -1499CYT polymorphism with diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2007; 21: 242-245.
46. Brem H, Kodra A, Golinko MS, Entero H, Stojadinovic O, Wang VM, Sheahan CM, Weinberg AD, Woo SL, Ehrlich HP, Tomic-Canic M. Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 2275-87.
47. Hanft JR, Pollak RA, Barbul A, van Gils C, Kwon PS, Gray SM, Lynch CJ, Semba CP, Breen TJ. Phase I trial on the safety of topical rhVEGF on chronic neuropathic diabetic foot ulcers. *J Wound Care* 2008; 17:30-2, 34-7.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-16]