Study of Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms of woman diabetic retinopathy Type II in Kerbala Province

دراسة التعدد الشكلي لجين عامل النمو البطاني الوعائي عند النساء المصابات باعتلال شبكية العين السكري(النوع الثاني) في محافظة كربلاء

م.د.لقاء حسون صكبان
جامعة كربلاء – كلية التربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة

الخلاصة :

تهدف هذه الدراسة لبيان مدى ارتباط التعدد الشكلي (الحذف والإدخال) لجين عامل النمو البطاني الوعائي وإصابة النساء بالاعتلال الشبكي السكري . شملت الدراسة مجموعتين المجموعة الأولى تضمنت 60 امرأة مصابة بالاعتلال الشبكي السكري والمجموعة الثانية تضمنت 60 امرأة سليمة (مجموعة السيطرة) ودرس التعدد الشكلي والطرز الوراثية لجين عامل النمو البطاني الوعائي بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل .

اوضحت النتائج وجود زيادة معـــــنوية (P≤ 0.003) (P≤ 0.001) باستخدام مربع كاي Chi- Square بين عدد والنسب المئوية لتكرار كل من الطراز الوراثية (DD) والاليل D الكلي لمجـموعة النساءاء المصابات بالاعتلال الشبكي السكري النوع الثاني مقارنة مع مجموعة النساء السليمات حيث بلغت % (31.67) 19 و % (55.83) 67 مقـــــابل % 6 (10) و % (30.0) 36 على الترتيب . وظهرت زيادة معنوية (P≤ 0.001) بالنسبة لعدد والنسب المئوية لتكرار الطراز الوراثي II والاليل I الكلي لمجـموعة النساء المصابات بالـــ (DR) النوع الثاني مقارنة مع مجموعة النساء السليمات إذ بلغت % (20) 12 و % (44.17) 53 مقابل % (50) 30 % (70) 84 ، بينما لم تظهر فروق معنوية لتكرار الشكل الاليل DI بين المجموعتين ، كذلك ظهرت زيادة معنوية بين المجموعتين عند قياس الاختبارات الكيموحيوية التي شملت كل من (البروتينات الدهنية الواطئة الكثافة ، تركيز الكولسترول الكلي ، تركيز الكلسريدات الثلاثية) فضلاً عن دليل كتلة الجسم بينما انخفض مستوى البروتينات الدهنية العالية الكثافة.

Abstract

The study was included to determine the Correlation between polymorphism (Insertion and Deletion) of Vascular Endothelial Growth Factor gene(VEGF) .The Study included to the two groups, the first group was included (60) women of Diabètes retinopathy (Type II) , the second group was included (60) healthy women as control group. the polymorphism and genotype for (VEGF) gene were studied by Polymerase chain reaction (PCR)..

The results were indicated to increase significantly (P≤ 0.003), (P≤ 0.001) by statistical analysis Chi-Square between the numbers, And showed to the frequency for each one the genotype (DD) , and total allele D in women of Diabètes retinopathy (Type II) comparison with healthy women , reached 19 (31.67) % , 67(55.83) % opposite 43 (28.3) % , 5 (8.3) % Respectively . And was a significant increase (P≤ 0.001) in the number and percentage of repeat genotype II and total I allele in women of Diabètes retinopathy (Type II) Comparison with healthy women reached 12 (20)% and 53 (44.17)% opposite 30 (50)% (84) (70%), while no differences in of repeat genotype DI. also,the study was included increase significantly (P≤ 0.001) between the two groups when measuring of biochemical tests that included levels of Triglycerides(TG), total cholesterol concentration(T.chol), (low-lying density lipoproteins cholesterol (LDL-C), And Body Mass Index(BMI), while the concentration of high density lipoproteins cholesterol(HDL-C) decreased significantly (P≤ 0.001) in the of Diabètes retinopathy group Comparison with healthy women group.

المقدمة :

مرض السكري Diabètes Mellitus (DM) من الأمراض الشائعة على مستوى العالم ، وقُدر عدد المصابين به بحوالي (171) مليون شخص لعام 2000 و يتوقع أن يصل العدد إلى (366) مليون شخص مصاب بحلول سنة 2030 ميلادية، ويُعد النوع الثاني من مرض السكري (Diabetes Mellitus Type II) الأكثر شيوعا والذي يصيب الاشخاص البالغين ، حيث تقدر نسبة المصابين بهذا النوع حوالي(90%) من المرضى المصابين بالسكري [1]. تعد حالة الاصابة بإعتلال شبكية العين السكري والتي يطلق عليها Diabetic Retinopathy (DR) من المضاعفات الاكثر انتشارا بين مرضى السكر حول العالم [2]، والتي يمكن ان تتطور لاحقا الى ما يعرف بالاستسقاء التبقعي macular edema و هي مضاعفات بصرية كبيرة قد تؤدي الى فقدان البصر(العمى) أحيانا بشكل تام، وتصل نسبة المصابين بهذه المضاعفات الى 20 % من مرضى السكري من النوع (I) و تزداد هذه النسبة لتصل الى 25 % لدى المصابين بمرض السكري النوع (II) حول العالم [3].

يفرز عامل VEGF من أنواع كثيرة من خلايا وأنسجة متعددة بما في ذلك العضلات والهيكل العظمي والقلب ، الخلايا الكيراتينية [4]، والأنسجة الدهنية البنية ، خلايا CD34 الجذعية ، والخلايا البطانية ، الخلايا الليفية (5). ان كل من حالتي نقص الاوكسجين hypoxia و و فرط السكر في الدم hyperglycemia تعملان كمحفز قوي داخل الخلايا للتعبير الجيني لعامل VEGF [6] . ان الآلية التي تؤثر من خلالها هذه النيوكليوتيدات في اعتلال الشبكية تبقى غير معروفة بشكل كامل، لكن يمكن القول بشكل عام انها تؤثر في مستويات لـ mRNA الذي يعمل على انتاج عامل VEGF [7]. تتكون عائلة VEGF من اربع جزيئات ببتيدية متتابعة و هي : VEGF-A ، VEGF-B ، VEGF-C و VEGF-D كل واحدة من هذه الجزيئات مكونة من 121 ، 165، 189 و 205 حامض اميني على التوالي [8]. ان هذا العامل يحفز نمو و تطور الاوعية الدموية محفزاً إنتاج الخلايا البطانية الجديدة مما يؤدي الى تكوين اوعية دموية جديدة غير الطبيعية neovascularization ، ومن ثم زيادة النفاذية [9].

وتلعب العوامل الوراثية المختلفة دورا هاما في انتاج البروتين ، اذ يتم التعبير الجيني لهذا العامل وفق مستويات مختلفة تخضع لعوامل وراثية ، اذ تضطرب عملية التعبير الجيني لـ*VEGF* بالتزامن مع عدد من الحالات المرضية المختلفة ، فقد بينت الدراسات ازدياد التعبير الجيني له بشكل موازٍ لحالات اضطرابات مرض السكري مثل اعتلال الشبكية السكري و اعتلال الكلية [10]. و يقع الجين المسؤول عن انتاج VEGF على الكروموسوم 6 (6p21.3) في الانسان ، ويتكون الجين من (8) اكسون مع (7) انترون وله عدة أشكال مظهرية مع وجود ما لا يقل عن 30 (SNPs) وظيفياً Functional Single-Nucleotide Polymorphism في منطقتي UTR (5 – Untranstated , 3- Untranstated) ومنطقة المحفز Promoter [11] ، اذ يمتلك هذا الجين تعدد مظهري عالي جدا ، و بالأخص منها عند منطقة الحذف/ اضافة (I/D) insertion/deletion في القطعة 18bp عند الموقع 2549 في منطقة التحفيز promoter region و التي يظهر ثلاث طرز مظهرية مختلفة (DD ، ID و II) ، ، كذلك عند زوج القواعد النتيروجينية G-C عند الموقع 405+ [12]. أثبت وجود طرازين وراثيين للجين المنتج للعامل VEGF مرتبط بإعتلال شبكية العين السكري لمرضى السكري من النوع الثاني وهما الطراز DD و ID لكن لم يحدد اذ ما كان التعبير الجيني لعامل نمو بطانة الاوعية هو سبب هذه التغيرات الموضعية في شبكية العين [10].

المواد و وطرق العمل

تم جمع عينات الدم (7 ml) لـ 60 امرأة مصابة بإعتلال شبكية العين السكري النوع الثاني (DR) و60 عينة دم لنساء يخلوهن من الأمراض (السيطرة) أثناء الصيام وقبل الفطور من مستشفى الحسين التعليمي في محافظة كربلاء المقدسة ،وضع (3) مل من الدم في أنابيب مانعة للتخثرEDTA بعد ما تم رجها بلطف لمنع تخثر الدم للاختبارات الوراثية الجزيئية والمتبقى منه فصل Serum للاختبارات الكيميائية السريرية والتي شمـــلت قياس كل من (البروتينات الدهنية العالية الكثافة mg/dl high-density lipoprotein cholesterol (H.D.L-C) ، البروتينات الدهنية الواطئة الكثافة low-density lipoprotein cholesterol (L.D.L-C) mg/dl ، تركيز الكولسترول الكلي Total Cholesterol (T.Ch) mg/dl ، تركيز الكلسريدات الثلاثية Triglycerides(T.G) mg/dl [13] مع أخذ معدل العمر وحساب دليل كتلة الجسم Body mass index (Kg/m^2) للمجموعتين [14].

طريقة استخلاص الـ DNA و الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز

تم استخلاص الـ DNA من عينات الدم حسب تعليمات العدة (Kit) المجهزة من شركة Geneaid و أجريت عملية الترحيل الكهربائي لـ DNA الناتج من الاستخلاص إذ أن تركيز الهلام المناسب لترحيل DNA هو 0.8 % للتاكد من وجود الــDNA وتمت عملية الترحيل الكهربائي حسب طريقة [15] حُفظ الدنا المعزول بدرجة حرارة -20 C̊ حتى القيام بإجراء تفاعل PCR وتقصي دراسة التعدد الشكلي باستخدام جهاز Thermal Cycler Biocycler TC-S لشركة Boeco Germany). ضُخِمت منطقة محددة من جين VEGF باستخدام برايمرات متخصصةPrimers لشركة Alpha DNA F-5'-GCTGAGAGTGGGGCTGACTAGGTA-3 وR-5'GTTTCTGACCTGGCTATTTCCAGG-3 (جدول 1) وعدة PCR Master Mix×2 لشركة Bioneer (جدول 2). اعتمد البرنامج الحراري التالي في عملية التضخيم (جدول 3) ، أجري بعدها الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر بتركيز(2 %) تحت فرق جهد 70فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين ، إذ يتم فحص الحزم تحت جهاز الأشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغها بصبغة أثيديوم برومايد لدراسة التعدد الشكلي لجين (*VEGF*) والذي يشمل الحزمة 211bp(D) و 229bp(I).

جدول (1) تسلسل البرايمر المستخدم في انجاز البحث المجهزة من قبل شركةAlpha DNA

أسم الجين	التسلسل
Vascular Endothelial Growth Factor (*VEGF*)	F- 5'-GCTGAGAGTGGGGCTGACTAGGTA-3
	R-5'GTTTCTGACCTGGCTATTTCCAGG-3'

جدول (2) يوضح المواد المستخدمة في تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل

Component	Reaction size 20 reaction
Taq DNA polymerase	1 U
Each: d NTP(d ATP ,d CTP, d GTP, d TTP)	250 µ M
Tris- Hcl (PH 9.0) kcl	10 mM
Mgcl2 Stabilizer and tracking dye	30 mM
Template DNA	1.5 mM
Primer	5-10 ng
H2O	18 µl

جدول (3) يوضح البرنامج المستخدم للدراسة التعدد الشكلي (Deletion)– (Insertion)) لجين *VEGF*

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	Initial Denaturation	94C°	4 min.	1
2	Denaturation	94C°	45 sec.	35
3	Annealing	57 C°	60 sec.	
4	Extension	72C°	60 sec	
5	Final Extension	72C°	5 min	1
6	Final hold	4	-	

التحليل الإحصائي

تم تحليل البيانات باستخدام البرنامج SPSS لتحليل الاختبارات والفحوصات الكيموحيوية ، اعتمد اختبار T-test للمقارنة بين المجموعتين (المعدل ± الخطأ القياسي) (Mean ± SD) ، تم حساب التكرار الاليلي للطرز الوراثية باستخراج قانون هاردي واينبرك (Hardy Weinberg) وقدرت قيمة ($\chi 2$) chi-squared test لدراسة الطرز الوراثية والتعدد الشكلي لجين VEGF للأشكال الاليلية الثلاثة بين المجموعتين .

النتائج والمناقشة

المعايير الكيموحيوية وكتلة الجسم

قيست في هذه الدراسة عدد من المتغيرات الكيموحيوية للدم لكل من النساء المصابات باعتلال الشبكي السكري ونساء السيطرة والتي شملت كل من الكولسترول الكلي ، البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL ، البروتينات الدهنية ذات الكثافة المنخفضة VLDL,LDL والكلسريدات الثلاثية TG بالإضافة الى دليل كتلة الجسم والعمر BMI.

تشير النتائج في جدول (4) إلى وجود زيادة معنوية P<0.001 في دليل كتلة الجسم (BMI) عند النساء المصابات بالـ DR حيث بلغت (6.3 ± 28.56) Kg/m2 في مجموعة النساء المصابات بـــ DR مقابل (3.66 ± 23.00) (Kg/m2) في مجموعة السيطرة.

تُعد السمنة وزيادة الوزن من أهم الأعراض المصاحبة لمرض السكري النوع الثاني ومع المرضى المعرضيين لحدوث المضاعفات السكري مثل (الاعتلال الشبكي والكلوي) [17] والذي قد يعود إلى انخفاض مستوى السكر التراكمي الـ أ-1-سي HbA1c وأرتفاع ضغط الدم الانقباضي الذي يعتبر من أهم المضاعفات التي تصيب مرضى السكري ، فقد يؤثر هذا الارتفاع على الأوعية الدموية الصغيرة (Microvascular) فيسبب أذى قد يصيب شبكية العين (Retinopathy) أو الكلى (Nephropathy) [18]، وكثيراً ما يصيب الأوعية الدموية الكبيرة (Macrovascular) فيسبب تصلب الشرايين (Atherosclerotic) مما يؤدي إلى حدوث حالات الوفاة المبكرة [19]

كذاك يظهر جدول (4) وجود زيادة معنوية (p<0.001) في تركيز الكلسريدات الثلاثية في مصل الدم لدى المريضات المصابات بالـ DR مقارنة مع تساء السيطرة ، كذلك لوحظ وجود زيادة معنوية (70.950 ± 4.021) mg/dl) (P<0.001)

مقابل (2.235 ± 48.025) (mg/dl) ان الارتفاع المعنوي في تركيز الكلسريدات الثلاثية في مصل الدم لمرضى السكري يعزى إلى عدة أسباب مها هو السمنة مما يؤدي إلى ظهور حالة مرضية تدعى Hyper triglyceridaemia [20]. كذلك ان غياب الأنسولين ادى الى تنشيط انزيم lipase في الخلايا الدهنية مسبباً زيادة في تحلل الكلسريدات المخزونة وتحرير كميات كبيرة من الأحماض الدهنية والكلسيرول الى الدم وعندما انتقلت الى الكبد حيث اعيد تصنيعها وان زيادة الحوامض الدهنية في الكبد ادت الى تحويل قسم منها الى دهون مفسفرة وكليسيرول وقد انتقلت مع الكلسريدات الثلاثية المتكونة في الكبد الى الدم وبذلك تنتج عنها زيادة في مستوى الدهون في الدم مسبباً ارتفاع في مستوى الكلسريدات الثلاثية [21].

وكما موضحة نتائجها في الجدول (4) وجود زيادة معنوية في مستوى الكولسترول عند النساء المصابات بالداء السكري 2 بالمقارنة مع الاشخاص الاصحاء اذ بلغ مستواه (199.3±36.4) (mg/dl) و(19.5 ±163.6) (mg/dl) على التوالي ، اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه العديد من الباحثين منهم [22] وربما يعود السبب الى زياد امتصاص الكولسترول من قبل الأمعاء بسبب نشاط انزيم اسيل ترانسفريز كولسترول Cholesterol Acyl Transferase وهذا ما تم توضحيه من قبل[23] الذي لاحظ بان هذه تحدث عند انخفاض الأنسولين ، وربما يعود السبب الى نمط وتوع التغذية والتي تعتبر من أهم العوامل التي تؤدي إلى ارتفاع مستوى الدهون في بلازما الدم وبالتالي تؤدي الى ارتفاع مستوى الكولسترول [24].

أن الانخفاض في مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL بين النساء ربما يعود إلى سرعة تطور مضاعفات مرض السكري بين النساء لاسيما لدى الفئات العمرية الكبيرة بعد انقطاع فترة الطمث واختلال نسب الهرمونات الأنثوية مع قلة النشاط البدني وتناول الأغذية ذات المستويات العالية من السعرات الحرارية وتأثيرها على زيادة الوزن (ارتفاع دليل كتلة الجسم) وبالتالي انخفاض مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL ومستويات الاستراديول estradiol levels [25]. كذلك اعتقد ان غياب الأنسولين يؤدي الى زيادة في نشاط إنزيم اللايبيز الكبدي Hepatic liapse وهذا الاخير يعمل على تسهيل عملية ازالة HDL [26].

إن انخفاض مستوى البروتين الدهني عالي الكثافة HDL يلعب دورا مباشرا في تعجيل عملية تصلب الشرايين بين مرضى السكري النوع الثاني إذ تعمل على نقل الكولسترول من جدران الشرايين الى الكبد لغرض طرحه والتخلص منه ولذا يطلق عليه بالكولسترول الحميد أو الجيد لكونه غني بجزيئات بروتينية تدعى ابولايبوبروتين أ-1 (Apo A-1) Apolipoproteins وجزيئات أخرى يوفر الحماية ضد تصلب الشرايين وهو يتناسب عكسيا مع مستويات الكليسريدات الثلاثية TG ومع مستويات البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL الذي يطلق عليه بالكولسترول السيئ أو الخبيث لأنه غني هو الأخر بجزيئات بروتينية تدعى (Apo B) Apolipoproteins الذي يعد من مصلبات الشرايين وعند تصنيف خطر الإصابة بالأمراض القلبية الوعائية بين عموم الناس وبين مرضى داء السكري [27] .

كذلك يتضح من الجدول (4) حصول إرتفاع معنوي $p<0.001$ في مستوى تركيز LDL-C عند النساء المصابات بالسكري مقارنة بنساء السيطرة حيث بلغت 134.50 ±5.56 mg/d و 115.55 ± 3.246 mg/d على الترتيب وقد يرجع السبب إلى أن انعدام الأنسولين يؤدي الى تحلل الدهون المخزونة في الأنسجة الدهنية ينتج عنه ارتفاع في مستويات هذه المركبات [28] ، حيث أن الزيادة في مستوى TC في الأنسجة والأوعية الدموية يؤدي إلى تقليل فعالية مستقبلات LDL مما يعمل تجمع هذه الجزئيات وبتركيز عالٍ في الدم [29].

جدول (4) مقارنة تراكيز بعض المتغيرات الكيموحيوية بين مجموعة نساء الـــ DR-type 2 ومجموعة النساء السليمات

المجموعة	دليل كتلة الجسم (BMI) (Kg/m2 Mean ± SD	العمر Age (Yeas) Mean ± SD	تركيز الكلسريدات الثلاثية T.G. (mg/dl) Mean ± SD	تركيز الكولسترول الكلي T.Ch (mg/dl) Mean ± SD	البروتينات الدهنية العالية الكثافة H.D.L. (mg Mean ± SD	البروتينات الدهنية الواطئة الكثافة (mg/d) L.D.L Mean ± SD
مجموعة النساء المصابات بـــ (DR-type 2)	A 28.56 ± 6.3	A 59 ± 9.14	A 41.65 ± 3. 21	A 199.3±36.4	A 38.73 ± 0.87	A 134.50 ±5.56
مجموعة النساء السليمات مجموعة السيطرة	B 23.00 ± 3.66	B 41 ± 7.47	B 46.1 ± 2.235	B 163.6± 19.5	B 44.20 ± 1.02	B 115.55 ± 3.246
مستوى المعنوية	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

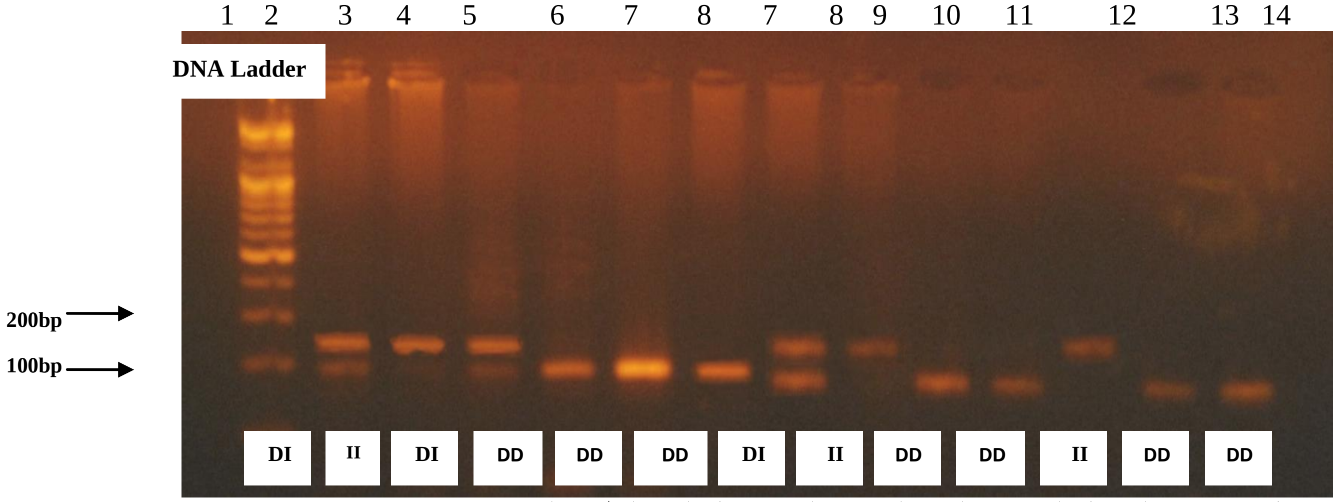
(Mean ± SD) المتوسط ± الانحراف القياسي.

التنميط الوراثي لجين *VEGF*.

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لناتج الـ PCR وجود ثلاثة أنواع من الطرز الوراثية للمجموعتين ، الطراز الوراثي متماثل الزيجة الحذف (Homozygous (Deletion) (DD تمثل بالحزمة ذات الحجم الجزيئي 211 bp والطراز الوراثي المتماثل الزيجة الادخال (Homozygous (Insertion) (II تمثل بالحزمة 229 bp والطراز الـــوراثي المتباين الزيـــجة Heterozygous (ID) Insertion/ Deletion تمثل بالحزمتين (211 bp ,229) (الشكل (1) .

يلاحظ من الجدول (5, 6) وجود زيادة معنوية عالية (P≤ 0.003) في تكرار الأليل (DD) في مجموعة نساء الـــ DR مقارنة مع نساء السيطرة (31.67) 19 و10) 6 على الترتيب وكذلك الأمر لوحظ زيادة معنوية (P≤ 0.001) بالنسبة لتكرار الاليل (D) الكلي لمجموعة نساء الـ DR حيث بلغت اعداد ونسب التكرار الكلي للاليل (D) (55.83)67 مقابل (30) 36 لمجموعة السيطرة ، كذلك ظهر انخفاض معنوي في عدد ونسب تكرار الطراز الوراثي (II) والاليل الكلي (I) في مجموعة نساء المصابات بالـDR مقارنة بمجموعة نساء السيطرة حيث كانت (20) 12 و (50) 30 على التوالي و (44.17)53 و(70.0) 84 على الترتيب. في حين لم تظهر أي فروق معنوية بين المجموعتين لتكرار الطراز الوراثي (DI).

يعتبر مرض اعتلال الشبكية السكري (DR) من أهم المضاعفات الأكثر شيوعا للأوعية الدموية الدقيقة للأشخاص المصابين بمرض السكري النوع الثاني [30] واعتلال شبكية العين السكري هو نتيجة طبيعية لعدم السيطرة على داء السكري و على مدى طويل من الزمن ، و تشير الاحصائيات الى أن عدد المصابين باعتلال شبكية العين السكري (DR) يصل الى% 20 من مرضى السكري [31]. ان خطورة و تطور حالة (DR) ، يخضع لعوامل وراثية و بيئية متعددة ، اذا يعتبر عامل النمو البطاني الوعائي (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF هو العامل المؤثر الرئيسي و الهام في تطور هذا المرض [32]. إن كلا من نقص الاوكسجين بالدم hypoxia و فرط السكر في الدم hyperglycemia يعملان كمحفز قوي لإنتاج بروتين VEGF [33] . تعُد حالة الادخال والحذف (Insertion , Deletion) للقطعة(18 bp) عند الموقع 2549 لمنطقة المحفز أحد الأشكال او الطرز المظهرية لجين *VEGF* والتى تعزى لها تطور الاصابة بالعديد من الامراض المختلفة وخاصة التي لها علاقة بتكوين الأوعية الدموية Angiogenesis ومنها اعتلال الشبكية السكري [34]. ان آلية التعدد الشكلي (الحذف والإدخال) وارتفاع الاليل (D) لجين *VEGF* في حدوث اعتلال الشبكية تبقى غير معروفة بشكل كامل ، لكن يمكن القول بشكل عام انها تؤثر في مستويات لـ mRNA الذي يعمل على انتاج عامل VEGF [7] . وقد بينت دراسة [35] الدور الحقيقي الذي يلعبه العامل VEGF-C ، والتي تتم من خلال تنشيط نوعين من الاغشية لأرتباط بالمستقبلات Tyrosine kinase ، مما يؤدي الى تفعيل مسار protein kinase signalling وبالتالي يؤدي الى زيادة نفاذية الأوعية الدموية في الشبكية ، وأن هذا العامل يحفز نمو و تطور الاوعية الدموية للشبكية محفزاً انتاج خلايا بطانية جديدة مما يؤدي الى تكوين واتساع الأوعية الدموية neovascularization ومن ثم زيادة النفاذية [9]



شكل (1) ناتج الترحيل الكهربائي لناتج الـPCR لجين عامل النمو البطاني الوعائي Vascular endothelial growth factor (*VEGF*) لتوصيف التعدد الشكلي على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% عند فرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين.

- المجال 1 DNA Ladder (100-1500 bp) .
- المجال (2, 4,8) الشكل الاليلي (Heterozygous)DI (211bp, 229 bp)
- المجال (3,5,6,7,10,11,13,14) الشكل الاليلي (Homozygous) DD (211 bp)
- المجال (9,12) الشكل الاليلي (Homozygous) II (229 bp)

جدول (5) التعدد المظهري لتوصيف الطرز الوراثية لجين (VEGF) في النساء المصابات DR-type 2 ونساء السيطرة.

الطراز الوراثي لجين *VEGF* العدد / النسبة المئوية	النساء المصابات بالـ DR (n= 60)	نساء السيطرة (n= 60)	Chi- Square	P Value
DD n (%)	19 (31.67)	6 (10)	8.539	0.003*
DI n (%)	29 (48.33)	24 (40)	0.845	0.358
II n (%)	12 (20)	30 (50)	11.868	0.001*

*p is significant

جدول (6) عدد والنسب المئوية لاليلات جين (*VEGF*) في النساء المصابات DR-type 2 ونساء السيطرة.

اليلات جين *VEGF* العدد (النسبة المئوية)	النساء المصابات بالـ DR (n= 60) العدد (النسبة المئوية)	نساء السيطرة (n= 60) العدد (النسبة المئوية)	Chi- Square	P Value
D n (%)	67 (55.83)	36 (30.0)	56.578	0.001*
I n (%)	53(44.17)	84 (70.0)	34.081	0.001*

*p is significant

References:

1- González EL, Johansson S, Wallander MA, Rodríguez LA (2009). Trends in the prevalence and incidence of diabetes in the UK: 1996 – 2005. J. Epidemiol. Community Health. 63: 332-336.

2- Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. "Management of diabetic retinopathy: systematic review". JAMA 2007; 298:902–916.

3- Klein, R.; Klein, B.E.; Moss, S.E.; Davis, M.D.and DeMets, D.L.(1984). The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV Diabetic macular edema Ophthalmology; 91(12): 1464-74.

4- Sugishita, Y.; Shimizu, T.; Yao, A. et al.(2000). Lipopolysaccharide augments expression and secretion of vascular endothelial growth factor in rat ventricular myocytes. Biochem Biophys Res Commun; 268:657–62.

5- Nauck M.; Roth, M.; Tamm, M.; Eickelberg, O.; Wieland, H.; Stulz, P.and Perruchoud, AP. (1997). Induction of vascular endothelial growth factor by plateletactivating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids Am. *J. Respir. Cell. Mol. Biol.;* 16(4):398-406.

6- Robert, N.and Frank, M.D. (2004). Diabetic retinopathy. N Engl *J Med*;350(1):48-58.

7- Chun M.Y., Hwang HS, Cho HY, Chun HJ, Woo, JT.; Lee, KW.; Nam, MS.; Baik, SH.; Kim, YS.and Park, Y. (2010). Association of vascular endothelial growth factor polymorphisms with nonproliferative and proliferative diabetic retinopathy. J Clin Endocrinol Metab; 95(7): 3547-51.

8- Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev ; 25: 581–611.

9- Zhang, X. L.; Wen, L..; Chen, Y. J. and Zhu, Y. (2009). Vascular endothelial growth factor up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1 in retinal endothelial cells via reactive; oxygen species, but not nitric oxide, Chinese Medical Journal, vol. 122(3): 338–343.

10- Buraczynska, M..;Ksiazek, P.; Baranowicz-Gaszczyk, I. and L. Jozwiak (2007). Association of the *VEGF* gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients., Nephrol Dial Transplant , 22: 827–832.

11- Jain L, Vargo, CA.; Danesi, R et al., (2009). The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. Mol Cancer Ther; 8: 2496–508.

12- Summers, A., Coupes, B. M..; Brennan, M.. F..; Ralph, S.A., Short, C.D. and Brenchley, P.E. (2005).VEGF 460 genotype plays an important role in progression to chronic kidney disease stage 5. Nephrol Dial Transplant; 20: 2427–2432.

13- Lopes-Virella, MF.; Stone, P.; Ellis, S.and Colwell, JA. (1977). Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods, Clin Chem,23 (5):882-4.

14- Garrow, J.S. and Webster, J. (1985). Quetelts index (W/H2) as a measure of fatness. Inter. J. Obesit. *9*: 147-153.

15-Sambrook,J. ; Fritsch,E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual . 2nd edition, Cold spring harbor laboratory press,cold spring Harbor, New York.

16- Stoian, A.; Bacârea, A.; Moţăţăianu, A.; Stoian, M.; Gliga, F.; Bacârea, V.; Carmen,D. and Banescu,C.(2014) Vascular Endothelial Growth Factor Insertion/Deletion gene polymorphism in patients with type 2 diabetes and diabetic peripheral polyneuropathy. *Rev Romana Med Lab*.;22(2):165-72.

17-Katuˇsi´c,D.; Tomi´c,M .; Juki´c ,T.; Kordić, R.; Sikić, J.; Vukojević, N.and Sarić, B.(2005).Obesity—a risk factor for diabetic retinopathy in type 2 diabetes?, *Collegium Antropologicum*, . 29, supplement: 47–50.

18- Janice, P. ; Lea, MD.; Susanne, B.and Nicholas, MD.(2002). Diabetes mellitus and hypertension: key risk factors for kidney disease., J Natl Med Assoc. , 94.(8): (SUPPL).

19- Cade, WT.(2008). Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the PhysicalTherapy Setting. *Phys Ther*.;88(11):1322-35.

20- Goldberg, I.J. (1996) Lipoprotein lipase and lipolysis: Central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research*, **37**, 693-707.

21- Bishop M., Duben – Engel Kirk J.and fody E.(2000) Clinical chemistry 4th ed ., Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, USA., PP . 220 – 221.

22- Maghrani, M. Lemhadri, A. Zeggwagh, N.A. and Eddouks, M. (2004). Effect of retama raetam on lipid metabolism in normal and recentonset diabetic rates. Journal of Ethnopharmacology V(90):323-329.

23- Maechler, P., Wollheim C., Bentzen, C. and Niesors E. (1993). Importance of exogenous cholesterol in diabetic rates: effect of treatment with insulin deficiency or with an Acyl-coA: cholersterol acyltrance ferase-inhibtor. Ann. Nutr. Metab., 37: 199-209.

24- Steyn, , NP., Mann, J ., Bennett, PH., Temple, N., Zimmet, P., Tuomilehto,J., Lindstrom,J. and Louheranta, A.(2004). Diet, nutrition and the prevention of type 2 diabetes, Public Health Nutrition: 7(1A), 147–165.

25-Zinah, A U. A. and Mahmood, Sh.Z.(2011). The Association Between Body Mass Index, Lipid Profile and Serum Estradiol Levels in a Sample of Iraqi Diabetic remenopausal Women. Oman Medical Journal., *26*(4): 263- 266.

26- Howard, B.V. (1999). Insulin resistance and liped metabolism. Am. J. cardiology 84(1A): 28J-32J.

27- الأشيال، عبد الأمير عبد الله (2009)، الداء السكري الوقاية منه والطرق العلاجية الحديثة للسيطرة الشاملة ، الجزء الثالث الطبعة الأولى ، كلية طب المستنصرية ، الشؤون الثقافية العامة ، بغداد

28- Bury,J.E.;Stroup,J.S.;Stephens,J.R.andBaker,D.L.(2007). Achieving American diabetes association goals in HIV- seropositive Patients with diabetes mellitus . Proc. Bayl. Univ. Med.Cent. 20:118-123.

29- Iwase, T.; Nakanishi, S. ; Nishi, Y. ; Ishiwata, S.; Komiyama, N. and Nishiyoma, S.(1998) .Relation between evaluation of IHD and changes in lipid profile. J. Cardiol. 32: 227-233

30- Ishaq, H.; Ali,M.; Kazmi,N.; Naqvi,B.S. and Shaikh, D.(2016). Prevalence of diabetic retinopathy in type II diabetic patients in a health facility in Karachi, Pakistan. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15 (5): 1069-1076.

31- Omolase, C. O.; Adekanle, O.; Owoeye, J. F .A. and Omolase, B .O.(2010). Diabetic retinopathy in a Nigerian Community. Singapore Med J, 51(1) : 57.

32- Penn J.S. , Madan A., Caldwell R.B. , Bartoli M, Caldwell RW.. endothelial growth factor in eye disease. Hartnett ME. (2008). Vascular Prog Retin Eye Res;27:331-71.

33- Fattah, RAA,; Eltanamly, RM.; Nabih, MH.and Kamal, MM.(2016). Vascular endothelial growth factor gene polymorphism is not associated with diabetic retinopathy in Egyptian patients. Middle East Afr J Ophthalmol.;23(1):75-78.

34-Gupta,N. ;Mansoor,S .; Sharma,A, Sapkal,A.; Sheth, J..; Falatoonzadeh, J.; Kuppermann, B.D.and Kenney, M.C.(2013). Diabetic Retinopathy and VEGF. *The Open Ophthalmology Journal, 7,* 4(10):1874-3641.

35- Joussen, A.M.; Poulaki, V.; Qin, W.; Kirchhof, B.; Mitsiades, N.; Wiegand, SJ.; Rudge, J.; Yancopoulos, GD. and Adamis, AP. (2002). Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo, American Journal of Pathology, 160 (2): 501–509.