Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 18(104): 27-33

Analysis of GPX-1 Pro198 Leu Gene Polymorphism in Patients with Diabetic Retinopathy in Rasht

Sonya Zamani[1], Farhad Mashayekhi[2]*, Zivar Salehi[2], Nasim Abbasi[1]

1- MSc, Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Received: 26 May 2015, Accepted: 9 Sep 2015

Abstract

Background: Diabetic retinopathy (DR) is the complication of diabetes mellitus (DM) and causes blindness among adults. Chronic extra cellular hyperglycemia in diabetes stimulates reaction oxygen species ROS production and increases oxidative stress. GPX-1 that was coded by GPX-1 gene is a key enzyme in protecting vessels against oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the association of GPX-1 gene Pro 198 Leu polymorphism in patients with diabetic retinopathy.

Materials and Methods: In this case-control study, 160 blood samples of participants including 80 patients with diabetic retinopathy and 80 healthy individual were tested. Genotyping of GPX-1 gene was determined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) by ApaI enzyme. Data analysis was performed using MedCalc (12.1) program.

Results: The genotype frequencies of the GPX-1 in DR patients for Leu/Leu, Leu/Pro, Pro/Pro were 10%, 62.5% and 27.5%, respectively, while for the control groups were 10%, 70% and 20%, respectively.In ohter words, Ile/Pro heterozygote was the most frequent genotype in patients and controls. According to the results of this study, there was not significant difference between patients with diabetic retinopathy and controls(p=0.52).

Conclusion: It is concluded that GPX-1 gene Pro 198 Leu polymorphism is not associated with DR. Further research is required to clarify the role of GPX-1 gene in DR in Rasht population along higher sample size.

Keywords: Diabetic retinopathy, *GPX-1* polymorphism, PCR-RFLP

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran.
Email: mashayekhi@guilan.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۸، شماره ۱۱ (شماره پیاپی ۱۰۴)، بهمن ۱۳۹۴، ۳۳-۲۷

بررسی پلی مورفیسم Pro198 Leu ژن گلوتاتیون پراکسیداز-۱ (Gpx-1) در بیماران مبتلا به رتینوپاتی دیابتی در شهر رشت

سونیا زمانی[1*]، فرهاد مشایخی[2]، زیور صالحی[2]، نسیم عباسی[1]

۱ـ کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲ـ استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: رتینوپاتی دیابتی عارضه‌ای ناشی از دیابت است که باعث کوری در بزرگ‌سالان می‌شود. با افزایش قند خارج سلولی، استرس‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد که در نتیجه گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن تولید می‌شود. گلوتاتیون پراکسیداز۱ که از طریق ژن GPX-1 کد می‌شود، آنزیم کلیدی حفاظت رگ‌ها در برابر استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط پلی مورفیسم Pro 198 leu ژن GPX-1 در بیماران مبتلا به رتینوپاتی دیابتی است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق مورد- شاهدی، ۱۶۰ نمونه خون از ۸۰ بیمار مبتلا به رتینوپاتی دیابتی و ۸۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین ژنوتیپ ژن GPX-1 از تکنیک PCR- RFLP به کمک آنزیم *ApaI* استفاده گردید. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار مدکالک نسخه‌ی ۱۲.۱ انجام شد.

یافته‌ها: فراوانی ژنوتیپ‌های Leu/Leu، Leu/Pro، Pro/Pro ژن GPX-1 در بیماران به ترتیب ۱۰، ۶۲/۵ و ۲۷/۵ درصد بود، در حالی که در گروه کنترل به ترتیب ۱۰، ۷۰ و ۲۰ درصد محاسبه شد. به عبارت دیگر، فراوان ترین ژنوتیپ در گروه بیمار و کنترل هتروزیگوت Ile/Pro بود. بر پایه نتایج به دست آمده از این مطالعه، تفاوت معنی‌داری در توزیع ژنوتیپی GPX-1 بین افراد مبتلا به رتینوپاتی دیابتی و کنترل دیده نشد(p=۰/۵۲).

نتیجه‌گیری: بر اساس این مطالعه، پلی مورفیسم Pro 198 leu ژن Gpx-1 با بیماری رتینوپاتی مرتبط نیست. با این وجود، جهت تعیین نقش دقیق ژن Gpx-1 در بیماری رتینوپاتی دیابتی به مطالعات وسیع‌تری با تعداد نمونه‌های بیشتر در جمعیت رشت نیاز است.

واژگان کلیدی: رتینوپاتی دیابتی ،پلی مورفیسمGPX-1 , PCR- RFLP

***نویسنده مسئول:** ایران، رشت، دانشگاه گیلان، گروه زیست شناسی

Email:mashayekhi@guilan.ac.ir

مقدمه

دیابت قندی یک بیماری متابولیک است که در آن بدن با کمبود انسولین یا مقاومت نسبت به انسولین مواجه می‌شود. این بیماری اغلب به دو نوع دیابت وابسته به انسولین (IDDM) و دیابت غیر وابسته به انسولین (NIDM) تقسیم می‌شود(۱). آمار افراد مبتلا به دیابت در سال ۱۹۹۷ حدود ۱۲۵میلیون نفر بوده است‌که برآورد اخیر سازمان‌جهانی بهداشت نشان می‌دهد که در سال ۲۰۲۵ تعداد دیابتی‌ها به ۳۰۰ میلیون درجهان افزایش یابد(۲). عوارض شبکیه‌ای بیماران دیابتی یکی از مشکلاتی است‌که باعث نابینایی و عوارض اجتماعی- اقتصادی فراوانی شده و شیوع این بیماری تا ۵ درصد افراد جامعه می‌باشد(۳).

افزایش مزمن قند خون باعث ایجاد اختلالات و آسیب‌های گوناگونی در بدن به خصوص در چشم، کلیه،اعصاب و سیستم قلبی عروقی می‌شود. یکی ازعوارض مهم دیابت، رتینوپاتی دیابتی است که به دلیل تغییرات ایجاد شده در عروق خونی شبکیه رخ می‌دهد(۴). رتینوپاتی دیابتی پنجمین علت ازدست رفتن برگشت ناپذیر بینایی در بزرگ‌سالان می‌باشدکه علت ۴/۸ درصد از مواردکوری در جهان است(۵)، هم‌چنین استرس‌های اکسیداتیو، آسیب‌ها و اختلالات گوناگونی در بدن به وجود می‌آورد و در نهایت باعث ایجاد بیماری رتینوپاتی دیابتی می‌گردد(۶، ۷). گونه‌های فعال اکسیژن مثل سوپراکسید و یا هیدروژن پراکسید در تمام سلول‌ها به واسطه‌ی میتوکندری و منابع آنزیمی تولید می‌شوند(۸). رادیکال‌های آزاد باعث آسیب‌های اکسیداتیو شده و این فاکتورها نیز در گسترش بیماری آب مروارید وابسته به سن نیز موثر هستند(۱۱-۹). گلوتاتیون پراکسید، یکی ازآنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درون سلولی است که هیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن کاتالیز می‌کند تا اثرات مضرآن از بین برود(۵).

گلوتاتیون پراکسیداز ۱(GPX-1) اولین بار در سال ۱۹۵۷به عنوان آنزیم اریتروسیتی شناخته شدکه هموگلوبین را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند(۱۲). ژن GPX در انسان بر روی کروموزوم 3P21.3 قرار دارد. تاکنون بیش از ۳۸ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) برای ژن GPXگزارش شده است که بیشتر این SNPها در نواحی ´3 و´5 قرار می‌گیرند. پلی مورفیسم‌های مهم آن عبارت از جایگزینی اسیدآمینه لوسین با پرولین در موقعیت ۱۹۸ به علت جانشینی باز تیمین با سیتوزین می‌باشد(۱۳). GPX سلولی دارای چهار نوع GPX-1 (گلوتاتیون H_2O_2 اکسی رداکتیو)، GPX- 2 (معده- روده‌ای)، GPX-3 (GPX خارج سلولی) و GPX- 4 (هیدروکسید فسفولیپیدGPX) می‌باشد(۱۴). در طول چند دهه‌ی اخیر، بررسی‌های زیادی در رابطه با نقش عوامل ژنتیکی و شناسایی ژن‌های مؤثر در رتینوپاتی دیابتی صورت گرفته است(۱۵، ۱۶). به علت اهمیت ژن GPX-1 به عنوان یک آنتی آکسیدان و نقش آن در برابر استرس‌های اکسیداتیو و با توجه به افزایش روز به روز تعداد افراد مبتلا به دیابت و هم‌چنین شایع بودن ابتلای افراد به بیماری رتینوپاتی که یکی از علت‌های کوری می‌باشد، در این تحقیق به بررسی پلی مورفیسم ژن GPX-1و ارتباط آن با بیماری رتینوپاتی در جمعیتی از استان گیلان پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق مورد- شاهدی، ۱۶۰نمونه شامل ۸۰ بیمار مبتلا به رتینوپاتی دیابتی و۸۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل بررسی شدند. محدوده سنی افراد مورد مطالعه اعم از بیماران و گروه کنترل ۳۰ تا۷۰ سال بود. تعداد نمونه‌ها با توجه به مقالات مشابه چاپ شده در مجلات معتبر علمی تعیین شد. در این مطالعه، رضایت نامه کتبی آگاهانه از افراد اخذ گردید.

در ابتدا، معاینات دقیقی شامل معاینه‌ی شبکیه با گشاد کردن مردمک و استفاده از آفتالموسکوپ غیر مستقیم و لنز تماسی توسط پزشک متخصص از افراد مورد مطالعه به عمل آمد. هم‌چنین آزمایشات مربوط به قند خون ناشتا، تری گلیسیرید کلسترول و هم‌چنین اندازه‌گیری فشار خون از آن‌ها صورت گرفت. در نهایت، تحت نظر پزشک متخصص و با اطمینان از ابتلا به رتینوپاتی دیابتی در گروه بیماران، مقدار ۱ میلی‌لیتر خون از افراد مورد مطالعه جهت بررسی‌های ژنتیکی گرفته شد و در لوله‌های استریل حاوی

EDTA قرار داده شد. سپس DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت GPP Solution و مطابق پروتکل جهت بررسی اطلاعات ژنتیکی استخراج گردید. از طریق دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز آگارز باندهای حاصل از استخراج DNA مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین ژنوتیپ ژن Gpx درکدون ۱۹۸ از تکنیک PCR-RFLP استفاده گردید. ابتدا جهت تعیین شرایط بهینه PCR، گرادیان دمایی انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا با کمک PCR ، قطعه‌ی مورد نظر (قطعه ۳۱۴ جفت بازی ژن Gpx-1) تکثیر گردید. سپس تمامی نمونه‌ها به منظور اطمینان از تکثیر قطعه‌ی هدف روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند و آشکارسازی باندها از طریق دستگاه مستند ساز ژل انجام شد. طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزار Oligo نسخه ۷ صورت گرفت(جدول۱). واکنش RFLP با استفاده از آنزیم *ApaI* صورت گرفت. انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت و بدین ترتیب محصولات حاصل از PCR در حضور آنزیم *ApaI* تحت هضم قرار گرفتند. در پایان، به منظور بررسی نحوه عمل آنزیم از الکتروفورز ژل آگارز ۳ درصد استفاده گردید.

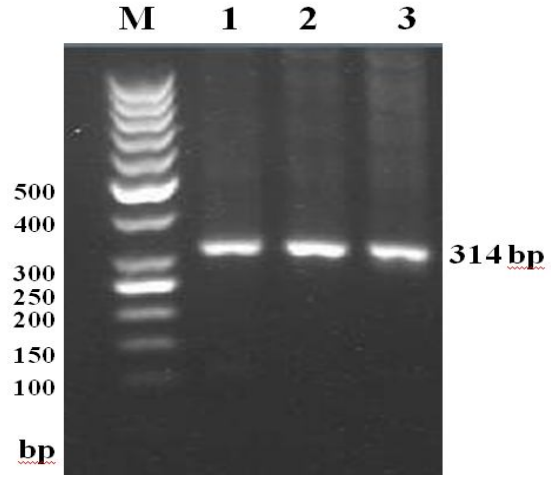
تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار مدکالک نسخه ۱۲.۱ صورت گرفت. از آزمون کای مربع به منظور به دست آوردن اختلافات فراوانی آللی و ژنوتیپی بین گروه‌های بیمار و کنترل استفاده شد. هم‌چنین با استفاده از تحلیل آماری، نسبت شانس (OR) و فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد (CI) محاسبه شد و ارتباط بین پلی مورفیسم و بیماری مشخص گردید. $p\leq ۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی‌دار بین دو گروه در نظر گرفته شد(کد مربوط به ثبت مقاله یاIRCT ، ۲۳۶۴۳ می‌باشد).

جدول ۱. توالی پرایمر مورد استفاده در تکثیر ژن GPX-1

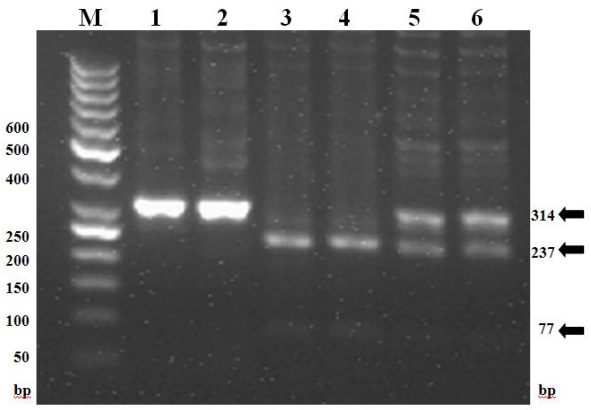
توالی آغازگرها (۳´ ⟵ ۵´)	اندازه قطعه تکثیر شده (bp)	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	ژن
F: GTGTGCCCCTACGCAGGA R: CACACAGTTCTGCTGACACC	۳۱۴	۶۸	GPX-1

یافته‌ها

تکثیر قطعه ۳۱۴ جفت بازی ژن GPx-1 از تمامی DNA های استخراج شده با موفقیت صورت گرفت(شکل ۱). در واکنش RFLP ، ژنوتیپ هموزیگوت Leu/Leu تنها دارای یک باند ۳۱۴bp، هتروزیگوت Pro/Leu دارای سه باند ۷۷bp، ۲۳۷bp و ۳۱۴bp و هموزیگوتPro/Pro حاوی دو باند ۷۷bp و ۲۳۷bp بود (شکل ۲). بررسی نتایج نشان داد که از ۸۰ بیمار، ۱۰ درصد دارای ژنوتیپ L/L، ۲۰ درصد دارای ژنوتیپ P/P و ۷۰ درصد دارای ژنوتیپ L/P بودند. در گروه کنترل، ۱۰ درصد ژنوتیپ L/L، ۲۷/۵ درصد ژنوتیپ P/P و ۶۲/۵ درصد ژنوتیپ هتروزیگوت L/P داشتند. با استفاده از نرم افزار مدکالک، مقدار کای مربع و سطح معنی‌داری به ترتیب برابر با ۱/۲۸ و ۰/۵۲ به دست آمد. از این رو، ارتباط معنی‌داری بین دو گروه بیمار و کنترل از نظر میزان ژنوتیپ های ژن GPx-1 مشاهده نشد(جدول ۲).



شکل۱. تصویر ژل آگارز ۲ درصد محصولات PCR. در تمامی نمونه‌ها باند مورد نظر با کیفیت مناسب وجود دارد. M، DNA مارکر ۱۰۰ جفت بازی می‌باشد. در ردیف‌های ۱ تا ۳، محصولات حاصل از PCR، GPX1 نشان داده شده است.



شکل۲. ژل آگارز۳ درصد. ردیف‌های ۱، ۳ و ۵ به افراد بیمار و ردیف‌های ۲، ۴ و ۶ به افراد سالم مربوط می‌باشند. ردیف‌های ۱و ۲ ژنوتیپ Leu/Leu، ردیف‌های ۳ و ۴ ژنوتیپ هتروزیگوتPro/Leu و ردیف‌های ۵ و ۶ ژنوتیپ Pro/Pro را نشان می‌دهند. M، DNA مارکر ۵۰ جفت بازی است. قطعات ۳۱۴ و ۲۳۷ جفت بازی قابل رویت بودند، اما قطعه ۷۰ جفت بازی به علت کوچک بودن قابل رویت نبود.

جدول ۲. نتایج مربوط به تحلیل آماری ژنوتیپ های ژنGPX1 در بیماران مبتلا به رتینوپاتی دیابتی و افراد سالم

χ^2=۱/۲۸

ژن	ژنوتیپS	مورد n (%)	کنترل n (%)	OR (95% CI)	p
GPX1	Leu/Leu	۱۶(۲۰)	۲۲(۲۷/۵)	Reference	_
	Leu/ Pro	۵۶(۷۰)	۵۰(۵۰/۵)	۱/۱۲(۰/۳۹-۳/۲۰)	۰/۸۳
	Pro/Pro	۸۰(۱۰)	۸(۱۰)	۰/۷۲(۰/۲۲-۲/۳۴)	۰/۵۹

بحث

رتینوپاتی دیابتی بر اثر عوامل پیچیده ژنتیکی و فاکتورهای محیطی ایجاد می‌شود(۱۷). چندین مکانیسم می‌توانند در آسیب‌های سلولی و تغییرات سازگار برای ایجاد دیابت نقش داشته باشند(۱۸). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در رگ‌های خونی بیان می‌شوند و نقش حفاظتی در برابر استرس‌های اکسیداتیو دارند(۱۹). Gpx-1 یک آنزیم کلیدی حفاظت رگ‌ها در برابر استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد(۲۰). Gpx-1 جزء آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیماتیک بوده و یک آنزیم وابسته به سلنیوم است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن کاتالیز می‌کند. حضور سلنوسیستئین در Gpx-1 برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ گزارش شد(۸). به دلیل اهمیت بیماری رتینوپاتی دیابتی و با در نظر گرفتن نقش آسیب اکسیداتیو در بروز این بیماری، در این تحقیق ارتباط پلی مورفیسم ژن Gpx-1 در بیماری رتینوپاتی دیابتی در جمعیتی از استان گیلان مطالعه شد. بررسی نتایج نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین دو گروه بیمار و کنترل از نظر میزان ژنوتیپ‌های ژن Gpx-1 وجود ندارد. در تحقیقاتی که لوبوس ادیت و همکاران در سال ۲۰۱۱ درباره نقش گلوتاتیون پراکسید-۱ در سلامت و بیماری انجام دادند، این نتیجه به دست آمد که Gpx-1 نقش مهمی در بسیاری از سرطان‌ها و بیماری‌های قلبی - عروقی دارد(۸). بر اساس تحقیقاتی دیگر که توهرو و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام دادند، عملکرد ژن Gpx-1 احتمال ابتلا به بیماری‌های قلبی در بیماران دیابتی نوع ۲ را افزایش می‌دهد(۲۰). در مطالعه‌ای که توسط راون هارن و همکاران در سال ۲۰۰۶ صورت گرفت، ارتباط معنی‌داری بین بیماری سرطان ریه و ژن Gpx1 مشاهده نشد(۲۱). در مطالعه دیوید و همکاران در سال ۲۰۰۴ ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی Pro198 Leu ژن Gpx-1 و بیماری سرطان سینه در زنان قفقازی مشاهده نشد(۲۲). هم‌چنین در مطالعه‌ی دیگری که توسط کولیوزلر و همکاران در سال ۲۰۱۲ صورت گرفت، ارتباطی بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی Pro198 Leu ژن Gpx-1 در بیماری التهاب لوزه یافت نشد(۲۲). به طور کلی، نتایج حاصل از این پروژه نشان دهنده‌ی عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین ژن Gpx-1 با بیماری رتینوپاتی دیابتی می‌باشد.

با این وجود، برای ارزیابی دقیق تر نقش این ژن در رتینوپاتی دیابتی به مطالعات بیشتر و بررسی در جمعیت‌های بزرگ‌تر و اقوام گوناگون نیاز می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتیجه حاصل از این مطالعه مورد- شاهدی که بر روی ۸۰ بیمار مبتلا به رتینوپاتی دیابتی و ۸۰ فرد سالم صورت گرفت، بیان کننده‌ی عدم نقش پلی مورفیسم Pro198 Leu ژن گلوتاتیون پراکسیداز-۱ (Gpx-1) در ابتلا به بیماری رتینوپاتی دیابتی می‌باشد. به عبارت دیگر، در جمعیت مورد مطالعه، افراد با پلی مورفیسم Pro198 Leu در معرض خطر بیشتر ابتلا به رتینوپاتی دیابتی قرار ندارند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه گیلان و کلیه افرادی که با اهداء خون به انجام این تحقیق کمک نموده‌اند تشکر می‌نماییم.

منابع

1. Jerreat L. Diabetes for Nurses. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2005.P.17-8.
2. Group DPPR. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. The New England journal of medicine. 2002;346(6):393-4.
3. Midthjell K, Bjørndal A, Holmen J, Krüger Ø, Bjartveit K. Prevalence of known and previously unknown diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in an adult Norwegian population. Indications of an increasing diabetes prevalence. The Nord-Trøndelag Diabetes Study. Scandinavian journal of primary health care. 1995;13(3):229-35.
4. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. Ophthalmology. 1984;91(12):1464-74.
5. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. Bulletin of the World Health Organization. 2004; 82(11):844-51.
6. Valko M, Morris H, Cronin M. Metals, toxicity and oxidative stress. Current medicinal chemistry. 2005; 12(10):1161-208.
7. Phillips M, Cataneo RN, Cheema T, Greenberg J. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. Clinica Chimica Acta. 2004; 344(1):189-94.
8. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxidants & redox signaling. 2011;15(7):1957-97.
9. Spector A, Garner WH. Hydrogen peroxide and human cataract. Experimental eye research. 1981;33(6):673-81.
10. Spector A. Aging of the lens and cataract formation. In: Sekuler R, Kline D, Dismukes K, eds. *Aging and Visual Function*. New York:Alan R. Liss; 1982.p.27–43.
11. Reddy V, Giblin FJ, editors. Metabolism and function of glutathione in the lens. Ciba Foundation Symposium 106-Human Cataract Formation; 1984: Wiley Online Library.
12. MILLS GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. J Biol Chem. 1957; 229(1):189-97.
13. Foster CB, Aswath K, Chanock SJ, McKay HF, Peters U. Polymorphism analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at the glutathione peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. BMC genetics. 2006; 7(1):56-7.
14. Cheng W-H, Ho Y-S, Ross DA, Valentine BA, Combs GF, Lei XG. Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. The Journal of nutrition. 1997; 127(8):1445-50.
15. Liew G, Klein R, Wong TY. The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy. International ophthalmology clinics. 2009; 49(2):35-52.
16. Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig JE. A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. Diabetes. 2009; 58: 2137-47.

17. Ma J, Li Y, Zhou F, Xu X, Guo G, Qu Y. Meta-analysis of association between the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator–activated receptor-γ2 gene and diabetic retinopathy in Caucasians and Asians. Molecular vision. 2012; 18:2352-60.
18. Paine SK, Basu A, Mondal LK, Sen A, Choudhuri S, Chowdhury IH, et al. Association of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta, and interferon gamma gene polymorphisms with proliferative diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. Molecular vision. 2012; 18:2749-57.
19. Kobayashi S, Inoue N, Azumi H, Seno T, Hirata K-i, Kawashima S, et al. Expressional changes of the vascular antioxidant system in atherosclerotic coronary arteries. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2002; 9(4):184-90.
20. Hamanishi T, Furuta H, Kato H, Doi A, Tamai M, Shimomura H, et al. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients. Diabetes. 2004; 53(9):2455-60.
21. Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin H, et al. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. Carcinogenesis. 2006; 27(4):820-5.
22. Cox DG, Hankinson SE, Kraft P, Hunter DJ. No association between GPX1 Pro198Leu and breast cancer risk. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2004; 13(11):1821-2.