دراسة التعدد الشكلي لجين Angiotensin I Converting enzyme لدى النساء المصابات بمرض السكري النوع الثاني.

لقاء حسون صكَبان١ رافد محمد كريم٢ هند حسين عبيد٣ مصطفى نهاد جمعة٤
رشا عبد الأمير جواد١
١ قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة كربلاء/ كربلاء/العراق.
٢ مركز علوم البحار/ جامعة البصرة/البصرة/العراق.
٣ قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بغداد/بغداد/العراق.
٤ قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة الأنبار/ الانبار/ العراق.

الخلاصة :

هدفت الدراسة الى التحري عن مدى ارتباط التعدد الشكلي (الحذف والإدخال) Insertion(I) and Deletion(D)لجين Angiotensin converting enzyme (ACE) وإصابة النساء بداء السكري (النوع الثاني) Type 2 Diabetes Mellitus. شملت الدراسة ١٢٠ امرأة تتراوح اعمارهن مابين (25–60) سنة، قسمت الى مجموعتين ، الأولى شملت ٦٠ امرأة مصابة بالداء السكري النوع الثاني أما المجموعة الثانية فحوت ٦٠ امرأة سليمة (مجموعة السيطرة). درس التعدد الشكلي والطرز الوراثية لجين ACE بواسطة تقنية Polymerase chain reaction (PCR). اوضحت النتائج وجود زيادة معنوية ($P\leq 0.001$) و ($P\leq 0.01$) باستخدام مربع كاي Chi–Square بين العدد والنسب المئوية لتكرار كل من الطراز الوراثي (DD) والاليل D الكلي في مجموعة النساء المصابات بالـ (DM) مقارنة بمجموعة النساء السليمات، فقد بلغت الاعداد والنسب % (25) 15 و %(٤٠)٤٨ مقابل % (٢٨,٣) ٤٣ و%(8.3) 5 على الترتيب. كذلك ظهرت زيادة معنوية ($P\leq 0.001$) بين المجموعتين عند قياس المعايير الكيموحيوية التي شملت كل من من تركيز الكلسريدات الثلاثية mg/dl (T.G Triglycerides) و تركيز الكولسترول الكلي Total Cholesterol (T.Ch) و البروتينات الدهنية الواطئة الكثافة low–density

تركيز (P≤ 0.001) lipoprotein cholesterol (L.D.L–C) ، بينما انخفضا" معنويا" البروتينات الدهنية العالية الكثافة high–density lipoprotein cholesterol (H.D.L–C) في مجموعة النساء المصابات بالـ (DM) مقارنة بمجموعة النساء السليمات.

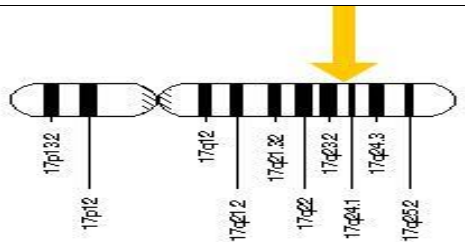
Study the Angiotensin Converting enzyme gene polymorphism in women in type 2 diabetes mellitus.

Abstract

The Present study was aimed to determine the Correlation between polymorphism (Insertion and Deletion) of Angiotensin converting enzyme gene (ACE) and infection women of Diabetes Mellitus (Type II) .The study involved (120) women the average old (25-60) years. The women divided in to two groups, the first group was involved (60) women of Diabètes Mellitus(Type II) , the second group was involved (60) healthy women of (control group) . Study the polymorphism and genotype for ACE gene by Polymerase chain reaction (PCR).The results of this study was found significantly was increase (P≤ 0.01), (P≤ 0.001) by statistical analysis Chi-Square between the numbers and percents to the frequency for each one the genotype (DD) and to total allele D in women of Diabètes Mellitus (Type II) Comparison with healthy women , the numbers and percents reached 15 (25) % , (٤٠)% opposite ٤٣ (٢٨,٣) % , 5 (8.3) % Respectively . A significant increase also appeared (P≤ 0.001) between the two groups when measuring the biochemical criteria that included both the concentration of (TG Triglycerides), total cholesterol concentration(T.chol), (low-lying density lipoproteins cholesterol (LDL-C), while the concentration of high density lipoproteins cholesterol(HDL-C) decreased significantly (P≤ 0.001) in the of Diabètes Mellitus group Comparison with healthy women group.

المقدمة : Introduction

مرض السكري (DM) Diabètes Mellitus من الأمراض الشائعة على مستوى العالم، قُدر عدد المصابين به حوالي 171 مليون شخص لعام ٢٠٠٠ و يتوقع أن يصل العدد إلى 366 مليون شخص مصاب بحلول سنة 2030 ميلادية (١) . مرض السكري هو مرض إستقلابي (أيضي) مزمن Metabolic Diseaseيتميز بزيادة مستوى السكر في الدم Hyperglycemia نتيجة لنقص نسبي أو كامل في الأنسولين Insulin في الدم أو لخلل في تأثير الأنسولين على الأنسجة ، ما ينتج عنه مضاعفات مزمنة في أعضاء مختلفة من الجسم، ويُعد النوع الثاني من مرض السكري (Type 2 –diabetes mellitus) الأكثر شيوعا الذي يصيب الاشخاص البالغين، أذ تقدر نسبة المصابين بهذا النوع حوالي(90%) من المرضى المصابين بالسكري (2) ، وفيه تصبح خلايا الجسم اقل استجابة لعمل الانسولين أذ تكون العضلات والنسيج الشحمي غير قادرة على استعمال الانسولين بشكل مناسب او ان البنكرياس لا تنتج الانسولين بشكل كافي لحاجة الجسم ومعظم المرضى المصابين بهذا النوع هم من البدينين، والبدانة بحد ذاتها تسبب درجة من مقاومة انسجه الجسم للأنسولين (3). تلعب الوراثة دورا اساسا" في هذا النمط من السكري وهو اضطراب غير متجانس heterogenous disorder إذ تشترك كل من العوامل الوراثية مثل الخلل الحاصل في إفراز ومقاومة الأنسولين والعوامل البيئية ومنها السمنة Obesity والإفراط في تناول الطعام وعدم ممارسة الرياضة، والإجهاد فضلا" عن الشيخوخة في حدوث المرض (4). يعد أنزيم Angiotensin I converting enzyme (ACE) أحد مكونات جهاز الرنين(RAAS) Renin–Angiotensin–Aldosterone System (٥)، يقع جين أنزيم المحول لانجيوتنسين ACE على الذراع الطويل لكروموسوم ١٧ عند القطعة 23 .3 (17 q 23.3)، (شكل ١) (٦). يختلف معدل تركيز أنزيم ACE البلازمي بين الأشخاص الذي يعود بطبيعته إلى التعدد الشكلي لجين ACE التي تشمل الإدخال (I) Insertion والحذف (D) Deletion في المنطقة الغير مترجمة للتتابع القاعدي (DNA bp–287) الذي تقع في انترون رقم 16 من جين ACEويدعى الشكل (ACE I / D polymorphism) والتي يعزى لها الاصابة بالكثير من الامراض المختلفة كأمراض ضغط الدم والسكري وأمراض القلب المختلفة (7).



شكل (١) كروموسوم (17)

طرائق العمل Methods

تم جمع عينات الدم (7 ml) لـ ٦٠ امرأة مصابة بالـداء السكري النوع الثاني و٦٠ عينة دم لنساء يخلون من الأمراض (السيطرة) أثناء الصيام وقبل الفطور من مستشفى الحسين التعليمي في محافظة كربلاء المقدسة ،ووضع (3) مل من الدم في أنابيب مانعة للتخثر EDTA بعد ما تم رجها بلطف لمنع تخثر الدم للاختبارات الوراثية الجزيئية والمتبقى منه فصل منه المصل Serum للاختبارات الكيميائية الحياتية التي شمـــلت قياس كل من (البروتينات الدهنية العالية الكثافة high- mg/dl density lipoprotein cholesterol (H.D.L-C) و البروتينات الدهنية الواطئة الكثافة low- density lipoprotein cholesterol (L.D.L-C) mg/dl و تركيز الكولسترول الكلي mg/dl Total Cholesterol (T.Ch) و تركيز الكلسريدات الثلاثية Triglycerides(T.G) mg/dl (8) مع أخذ معدل العمر وحساب دليل كتلة الجسم Body mass index (Kg/m^2) للمجموعتين (9).

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، أجريت عملية الترحيل الكهربائي لـ DNA الناتج من الاستخلاص إذ أن تركيز الهلام المناسب لترحيل DNA هو % 0.8 للتاكد من وجود الـDNA. تمت عملية الترحيل الكهربائي حسب طريقة (10). حُفظ الدنا المعزول بدرجة حرارة -٢٠ C° حتى القيام بإجراء تفاعل PCR وتقصي دراسة التعدد الشكلي اعتماداً على وجود القطعة 287 bp على انترون رقم ١٦. أجري تفاعل الـ PCR باستخدام جهاز (Thermal cycler DAN incubator لشركة Boeco Germany). ضُخِمت منطقة محددة من جين الـ ACE باستخدام برايمرات متخصصة Primers لشركة Alpha DNA (F-5'-CTG

R- 5'-GAT GTGGCC ATC ACA (GAG ACCACT CCC ATC CTTTCT- 3 '(TTC GTC AGA T-3)(11) ، وعدة 2×PCR Master Mix لشركة Bioneer (جدول ١) . اعتمد البرنامج الحراري التالي في عملية التضخيم(جدول ٢) ، أجري بعدها الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر بتركيز(2 %) تحت فرق جهد 70 فولت/سم وتيار 40 ملي أمبير ولمدة ساعتين، إذ يتم فحص الحزم تحت جهاز الأشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغها بصبغة أثيديوم بروماید جدول (1) .

جدول(1):المواد المستخدمة في تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل

Component	reaction ٢٠ Reaction size
Taq DNA polymerase	1 U
Each: d NTP(d ATP ,d CTP, d GTP, d TTP)	250 µ M
Tris- Hcl (PH 9.0)	10 mM
Kcl	30 mM
Mgcl2 Stabilizer and tracking dye	1.5 mM
Template DNA	5-10 ng
Primer	1.5-2-pmole
H2O	18 µl

جدول (٢): البرنامج المستخدم للتعرف على التعدد الشكلي لجين(ACE)

Angiotensin –Converting (AC E) I /D gene Polymorphism Enzyme

No.	Steps	Temperature	Time	No. of cycles
1	Initial Denaturation	94C°	2.5 min.	1
2	Denaturation	94C°	30 sec.	30
3	Annealing	60C°	105	

			sec.	
4	Extension	72C°	60 sec	
5	Final Extension	72C°	5 min	1
6	Final hold	4	–	

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

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 ACE للأشكال الاليلية الثلاثة بين المجموعتين .

النتائج والمناقشة Result & Discussion

المعايير الكيموحيوية

جرى في هذه الدراسة قياس عدد من المتغيرات الكيموحيوية في الدم في كل من النساء الأصحاء والمرضى المصابات بالسكري النوع الثاني والتي شملت كل من الكولسترول الكلي و البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL ، البروتينات الدهنية ذات الكثافة المنخفضة VLDL,LDL والكلسريدات الثلاثية TG، فضلا عن دليل كتلة الجسم والعمر BMI. تشير النتائج في جدول (3) إلى وجود زيادة معنوية (P<0.001) في دليل كتلة الجسم (BMI) والعمر(Kg/m2 (30.83 ± 7.3) و 50) ± 9.14

على الترتيب في مجموعة النساء المصابات بـ (DM–type 2) مقارنةً مع مجموعة النساء السليمات (27.23 ± 6.30) (Kg/m2) و(41 ± 7.47) على الترتيب. كذلك يظهر من خلال الجدول (3) وجود زيادة معنوية(P<0.001) (70.950 ± (4.021) (mg/dl) مقابل (mg/dl) .

(48.025 ± 2.235). ان الارتفاع المعنوي في تركيز الكلسريدات الثلاثية في مصل الدم لمرضى السكر النوع الثاني يعزى إلى عدة أسباب مها هو السمنة مما يؤدي إلى ظهور حالة مرضية تدعى Hyper triglyceridaemia ، كما موضحة نتائجها في الجدول (٣) وجود زيادة معنوية في مستوى الكولسترول عند النساء المصابات بالداء السكري ٢ بالمقارنة مع الاشخاص الاصحاء اذ بلغ مستواه (199.3±364) (mg/dl) و(19.5 ±163.6) (mg/dl) على الترتيب. اتفقـت نتائج هذه الدراسة مع ما توصـل إليه العديد من الباحثـين (12,13,14) الذين أشاروا الى وجود ارتفاع معنوي لمستوى الكولسترول عند مرضى السكري مقارنة مع الأشخاص الأصحاء 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 (١٥) الذي لاحظ بان هذه تحدث عند انخفاض الأنسولين، وربما يعود السبب الى نمط التغذية التي تعد من العوامل التي تسبب ارتفاع في مستوى الدهون في بلازما الدم وبالتالي تؤدي الى ارتفاع مستوى الكولسترول (16). إن الانخفاض المعنوي في هذه الدراسة بالنسبة لإنخفاض 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 (17). إن انخفاض مستوى البروتين ألدهني 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-١ (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 (١٨) .فضلا" عن ذلك يتضح من الجدول (3) حصول إرتفاع

معنوي ($p<0.001$) في مستوى تركيز LDL–C عند النساء المصابات بالسكري مقارنة بنساء السيطرة، فقد بلغت 134.50 ±5.56 mg/d و 115.55 ± 3.246 mg/d على الترتيب (19) ، اذ أن الزيادة في مستوى TC في الأنسجة والأوعية الدموية يؤدي إلى تقليل فعالية مستقبلات LDL مما يعمل تجمع هذه الجزئيات وبتركيز عالٍ في الدم (20).

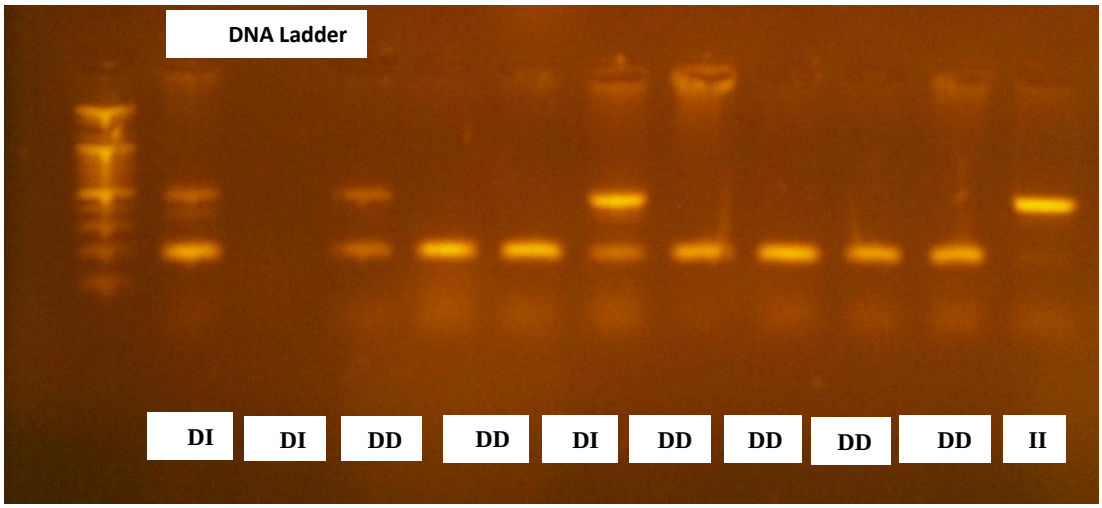
جدول (٣): مقارنة تراكيز بعض المتغيرات الكيموحيوية بين مجموعة نساء الـ DM–type 2 ومجموعة النساء السليمات

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 L.D.L (mg/d) Mean ± SD
مجموعة النساء المصابات بـ diabetes) mellitus Type2	A 30.83 ± 7.3	A 50 ± 9.14	A 70.950 ± 4.021	A 199.3±36.4	A 3٥.93 ± 0.87	A 134.50 ±5.56
مجموعة النساء السليمات مجموعة السيطرة	B 27.23 ± 6.30	B 41 ± 7.47	B 48.025 ± 2.235	B 163.6± 19.5	B 43.60 ± 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 ACE.

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لناتج الـ PCR وجود ثلاثة أنواع من الطرز الوراثية للمجموعتين ، الطراز الوراثي مثماثل الزيجة الحذف Homozygous (Deletion) (DD) تمثل بالحزمة ذات الحجم الجزيئي (190 bp) والطراز الوراثي المتماثل الزيجة الادخال Homozygous (Insertion) (II) تمثل بالحزمة (490 bp) والطراز الـــوراثي المتباين الزيــجة Insertion/ Deletion (ID) Heterozygous تمثل بالحزمتين (490 bp, 190 bp) (الشكل ٢).



شكل (2) ناتج الترحيل الكهربائي الـ PCR لتوصيف التعدد الشكلي Polymorphism (D / I) لجــين (ACE) في النساء المصابات بالـDM-Type2 ونساء السيطرة ، على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% وبفرق جهد 70 فولت/ سم وتيار ٤٠ ولمدة ساعتين.

المجال (1) DNA Ladder(*Promega*) (100-1000 bp)
المجال (2,4,7) الشكل الاليلي (DI) (190 bp, 490 bp).
المجال (5,6,8,9,10,11) الشكل الاليلي (DD) (190 bp).
المجال (12) الشكل الاليلي (II) (490 bp).

يلاحظ من الجدول (4) وجود فروق معنوية عالية ($P\leq 0.01$) في تكرار الأليل (DD) بين مجموعة نساء DM ونساء السيطرة (25) 15 و (8.3) 5 على الترتيب، كذلك الأمر بالنسبة لتكرار الاليل (D) الكلي. لوحظ زيادة معنوية بين المجموعتين ($P\leq 0.001$) فقد بلغت اعداد ونسب التكرار الكلي للاليل

(D) (40)٤٨ و(٢٨,٣) ٣٤ وتكرار الاليل (I) الكلي (60)٧٢ و (71.7) 86 على الترتيب. في حين لم تظهر أي فروق معنوية بين المجموعتين لكل من تكرار الاليل II و DI.

جدول (4): النسب المئوية للتعدد المظهري لتوصيف جين (ACE) في النساء المصابات بـ DM–type 2 والسيطرة.

الطراز الوراثي genotype للجين AC E	مجموعة النساء المصابات بـ T2DM (n= 60)	مجموعة نساء السيطرة (n= 60)	Chi-Square	P Value
DD n (%)	15 (25)	5 (8.3)	6.000	0.01*
DI n (%)	18 (30)	24 (40)	1.319	0.251
II n (%)	27 (45)	31 (51.7)	1.645	0.200
ACE Alleles				
D n (%)	٤٨ (40)	٣٤ (٢٨,٣)	59.613	0.001*
I n (%)	٧٢(60)	86 (71.7)	28.807	0.001*

*** p is significant**

يعد أنزيم (ACE) البلازمي ببتيد معدني Zinc metallopeptidase يـقوم بتحويل (I - Ang) – Angiotensin الــى II – Ang في الكبد و الأنسجة الحاوية على bradykinin الغير فعال في العديد من الانسجة، اذ يقوم II – Ang على تضييق الأوعية الدموية ويعد عامل فعال للتوتر الوعائي اذ يلعب أنزيم ACE دوراً هاماً في عملية تكوين الأوعية الدموية Angiotensin وأمراض الضغط والقلب الوعائية لكونه جزءاً من جهاز الرينين (RAS) Rennin angiotensin system وجهاز Kallikrein –Kinin System الذي ينتج البراديكينين (Bradykinin)وكاليدين (Kallidin) في الدم (21). وعادة يمتاز الاشخاص الذين يحملون الطراز الوراثي (DD) زيادة في انزيم (ACE) البلازمي و II – Ang وقلة مستوى bradykinin الـذي يرجع اليه الاصابة بالكثير من الأمراض الخطيرة كالضغط والسـكري وأمـراض القـلب الوعائية (22).

جاءت نتائج هذه الدراسة مطابقة للكثير من الدراسات والبحوث التي أجريت في العديد من المجتمعات السكانية المختلفة التي أشارت فيـها وجــود أرتباط وعلاقة مابين الشكل الاليلي (DD) لجين ACE والإصابة بالسكري (Type 2–DM) (7,23,24). وعادة يرتبط الشكل الاليلي (DD) مع المستوى العالي لإنزيم ACE في حين يمثل الأليل (DI) الشكل المتوسط من مستوى الإنزيم بينما يمثل الإليل (II) انخفاض مستوى إنزيم ACE (25).

اثبت الباحث Stephen وجماعته أن الأشخاص الذين يحملون النمط الوراثي DD يمتازون بالتعبير والفعالية العالية لإنزيم (ACE) والتي تعمل على زيادة تعرضهم للإصابة بالسكري (Type 2–DM) ومضاعفاته (26) . كذلك قد يسهم العرق البشري والمكان الجغرافي دوراً في التعدد الشكلي لجين (ACE) (27)

References:

1-Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.(2004) . Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care.; 27: 1047-1053.

2-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.

3-Rask-Madsen, C. and Kahn ,C. R..(2012). Tissue–specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease," Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 32, (9): 2052–2059.

4- Kaku K (2010). Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. JMAJ, 53(1):41-46.

5- Karabulut , A; Turgut,S ; Turgut, G.(2010). Angiotensin converting enzyme gene insertion /deletion polymorphism in patients with polycystic ovary syndrome . Gynecol. Endocrinol.26 (6): 393-398.

6- Riordan, JF.(2003). Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. Genome Biol;4:225. 6.

7- Wang, Y.; Peng, W.; Zhang, X.; Qiao,H.; Wang, L.; Xu, Z. and Wu, Ch. (2016). The association of *ACE* gene polymorphism with diabetic kidney disease and renoprotective efficacy of valsartan. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*: 1–6.

8- Lopes – Virella , M.F .et al.,(1977). clinical chemistry.,*23*:882.

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

10- 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.

11- Naresh, V.V.S.; Reddy,A.L.K; Sivaramakrishna,G;Sharma,P.V.G;Vardhan,R.V. and Kumar,V.(2009). angiotensin converting enzyme gene polymorphisms in

Type II diabetics with nephropathy. *Indian Journal of Nephrology,19(14):145-148.*

12- Basu R., Breda E., Oberg A., Powell C., Man P., Basu A., Vittone J. Klee G., Arora P.Jenson and Rizza A.(2003) Mechanisms of the age- associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion action and clearance ., Diabetes, 52 (7) : 1738 – 1748 .

13- Mehta, K.N. Parik K.H. Chag. M.C., Shah V.G. (2003). Effect of Treatment on homocysteine Mia in cardiac patients: a prospective study. Indian J. of Pharma. 35(5):410.

14- 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.

15-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.

16- 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.

17- 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.

١٨-الأشيال، عبد الأمير عبد الله (٢٠٠٩)، الداء السكري الوقاية منه والطرق العلاجية الحديثة للسيطرة الشاملة ، الجزء الثالث الطبعة الأولى ، كلية طب المستنصرية ، الشؤون الثقافية العامة ، بغداد .

19-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.

20-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.

21- Solini, H.; Vestra, M.D.; Saller. A.; Nosadini R.; Crepaldi, G.and Fioretto, P. (2002). The angiotensin-converting enzyme DD genotype is associated with glomerulopathy lesions in T2D. *Diab*, 51(1): 251-55.

22- Turgut, G.; Akin, F., Turgut, S., Dursunoğlu, D., Karasu, U. & Gur, S. (2009). ACE gene polymorphism and cardiac structure in patients with insulin resistance. Mol Biol Rep; 36:623-9.

23-Nikzamir,A.R.;Golmohammadi,T.;Nakhjavani,M.;Zahtaei,M. and Amirzargar,A.A. (2006). Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in Iranian Patients With Type 2 Diabetes.Iran.J.Immunol.3(1):23-29.

24- Ruggenenti P, Bettinaglio, P.; Pinares, F. et al.(2008). Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and renoprotection in diabetic and nondiabetic nephropathies. *Clin J Am Soc Nephrol*; 3: 1511–1525.

25- Al-Serri, A.; Ismael, F.G.; Al-Bustan, S.A.and Al-Rashdan, I. (2015*).*Association of the insertion allele of the common *ACE gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus among Kuwaiti cardiovascular disease patients. J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.;16:910–6.*

26- Stephens, J.W., Dhamrait, S.S.; Cooper, J.A.; Acharya, J.; Miller, G.J.; Hurel, S.J.and Humphries, S.E. (2005). The D allele of the ACE I/D common gene variant is associated with type 2 diabetes mellitus in Caucasian subjects. Mol. Genet. Metab., *84*: 83-89.

27- Pereira,A.C.; Mota,G.A.; Benseñor,I.; Lotufo,P.A. and Krieger1,J.E. (2001). Effect of race, genetic population structure, and genetic models in two-locus association studies: clustering of functional renin-angiotensin system gene variants in hypertension association studies. *Braz J Med Biol Res* 34(11):1421-1428 .