پلی‌مورفیسم ژن IL_{18} در بیماران دیابتی نوع I: یک مطالعه مورد- شاهدی

احمد مسعود[1*]، نوشین شیخ بهایی[1]
مهتاب مسعود[2]، عیسی صالحی[1]
امیرحسین مسعود[3]، محمد وجگانی[1]
اسدالله رجب[4]

۱- گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- گروه ایمونولوژی دانشگاه مونترال- کانادا
۴- انجمن دیابت ایران

*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه ایمونولوژی تلفن: ۶۶۴۹۵۹۹۱
email: massoud.ahmad@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۴/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۷/۰۷

چکیده

زمینه و هدف: بیماری دیابت نوع I، یکی از بیماری‌های اتوایمیون به‌شمار می‌رود که بیشتر، جوانان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل متعدد ژنتیکی، محیطی و ایمونولوژیکی در بروز این بیماری مؤثر می‌باشند. اینترلوکین- ۱۸ یک سایتوکاین قوی التهابی است که از طریق القاء تولید اینترفرون گاما نقش مؤثری در بروز پاسخ‌های ایمنی نوع Th1 دارد و نقش آن در بروز بیماری دیابت در موش NOD و بیماری دیابت نوع یک انسانی نشان داده شده است. هدف مطالعه بررسی پلی‌مورفیسم ژن کد کننده IL_{18} در نوکلئوتیدهای ۱۳۷- و ۶۰۷- و مقایسه آن در مبتلایان دیابت نوع I و افراد سالم است. ***روش بررسی:*** در این مطالعه مورد- شاهدی ۷۵ بیمار مبتلا به دیابت نوع I و ۸۸ فرد سالم مورد مطالعه قرار گرفتند. بعد از استخراج DNA از سلول‌های خون محیطی پلی‌مورفیسم ژن کد کنندهٔ IL_{18} در موقعیت ۱۳۷- و ۶۰۷- به‌روش PCR-SSP بررسی شد. تجزیه و تحلیل داروها با نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۲ و آزمون χ^2 با حدود اطمینان ۹۵٪ انجام شد. ***یافته‌ها:*** ۵۳٪ بیماران دیابتیک ژنوتیپ GG در موقعیت ۱۳۷- را نشان دادند و شیوع ژنوتیپ CC در بیماران ۱۶٪ بود که تفاوت قابل‌توجهی نسبت به افراد کنترل سالم داشت (p=۰/۰۰۰). در موقعیت ۶۰۷- ژنوتیپ‌های AA، AC و CC در افراد دیابتیک تغییر آماری قابل توجهی نسبت به افراد طبیعی نشان نمی‌دهند (p=۰/۵۴۳). ***نتیجه‌گیری:*** فراوانی ژنوتیپ GG در موقعیت ۱۳۷- و نیز ژنوتیپ CC در همین‌موقعیت در مبتلایان دیابت نوع I دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به افراد سالم بود (p<۰/۰۰۰۱) و دو آلل دارای نوکلئوتیدهای C و G با افزایش میزان بیان IL_{18} همراه بوده و در پاتوژنز بیماری نقش مهمی دارند.

کلمات کلیدی: پلی مورفیسم ژن IL_{18}، دیابت نوع I، IL_{18}، سایتوکاین.

مقدمه

بیماری دیابت نوع I (Diabetes mellitus type I) یکی از بیماری‌های خودایمن رو به گسترش است که با تخریب اتوایمیون سلول‌های (بتا) β جزائر لانگرهانس لوزالعمده و از دست دادن مادام‌العمر توانایی تولید انسولین مشخص می‌شود.[1] زمینه‌های ژنتیکی و عوامل محیطی در بروز این بیماری نقش مهمی داشته و بیماری غالباً در سنین پایین بروز می‌کند. وابستگی مطلق بیماران به درمان‌های طولانی‌مدت و عوارض ناشی از بیماری هزینه‌های انسانی و اقتصادی زیادی را به جامعه تحمیل می‌کند.[2] مطالعات مختلف، اختلالات سایتوکاین‌ها و به‌هم‌خوردگی تعادل شبکه سایتوکاینی را در پاتوژنز بیماری دخیل می‌داند. غالب محققین بر این عقیده‌اند که در این بیماری لنفوسیت‌های Th_1 که الگوی ترشح سایتوکاینی خاصی دارد، موجب فعال شدن لنفوسیت‌های اوتوراکتیو (aoutoreactive) شده و باعث تهاجم آنها به پانکراس و در نهایت تخریب سلول‌های β می‌گردد.[3-5] جابه‌جایی نوکلئوتیدها در نواحی تنظیمی ژن‌های سایتوکاین‌ها که از آن به‌عنوان پلی‌مورفیسم یاد می‌شود تأثیر زیادی بر میزان ترشح سایتوکاین‌ها دارد و از طرفی حضور آلل‌های متفاوت ژن‌های سایتوکاین‌های مختلف بر تعادل نهایی شبکه سایتوکاینی تأثیر دارد.[6-8] بنابراین با توجه به نکات فوق تشخیص زودهنگام و استفاده از امکانات ایمونولوژیک و بررسی پلی‌مورفیسم سایتوکاین‌ها برای پیش‌گویی احتمال وقوع بیماری در افراد در معرض خطر اهمیت ویژه‌ای دارد. در این مطالعه نقش پلی‌مورفیسم ژن IL_{18} در جایگاه نوکلئوتید ۶۰۷- و ۱۳۷- در پاتوژنز بیماری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.[9و10]

Archive of SID
www.SID.ir

روش بررسی

این مطالعه مورد- شاهدی با مساعدت انجمن دیابت‌ایران و دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. ۷۵ بیمار مبتلا به دیابت نوع I که ۳۳ نفر آنها مرد (۴۴٪) و ۴۱ نفر زن (۵۶٪) بودند مورد مطالعه قرار گرفتند. معیار ورود بیماران به مطالعه گذشت حداقل دو سال از زمان تشخیص قطعی بیماری نوع I توسط متخصص غدد بود و تمامی بیماران تحت درمان با انسولین بودند که برای انجام آزمایشات دوره‌ای به انجمن دیابت ایران مراجعه می‌کردند و پس از اخذ رضایت کتبی، نمونه‌گیری از آنان انجام گرفت. تمام آزمایشات در گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و در سال ۱۳۸۵ انجام گرفت. دامنه سنی افراد فوق از بدو تولد تا ۵۲ سالگی با میانگین سنی ۱۵ سال بوده و زمان ابتلا به بیماری از بدو تولد تا ۴۵ سالگی بوده است. گروه شاهد ۸۸ نفر فرد سالم بودند که به‌طور تصادفی از میان داوطلبان اهداء خون که به تشخیص پزشک متخصص در زمان انجام مطالعه سالم بودند انتخاب شدند و پس از اخذ رضایت کتبی برای شرکت در طرح تحقیقاتی از آنان نمونه‌گیری خون به‌عمل آمد. ۴۲٪ آنها زن و ۵۷٪ مرد با میانگین سنی ۲۰ سال بوده و هیچ‌گونه سابقه بیماری خود ایمنی نیز نداشته‌اند (جدول ۱). از افراد بیمار و سالم مقدار پنج میلی‌لیتر خون کامل گرفته شد و نمونه‌ها با EDTA مخلوط شده و تا زمان اتمام نمونه‌گیری و انجام آزمایشات در فریز $-70^{\circ}C$ نگهداری شدند. استخراج DNA به‌روش استاندارد[۷و۲] از خون کامل انجام شد و کیفیت DNA استخراج شده براساس OD 260/OD 280 بررسی و در تمامی نمونه‌ها این نسبت بین ۱/۹-۱/۷ بود. برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها در موقعیت ۱۳۷- و ۶۰۷- به‌روش PCR-SSP از پرایمرهایی با توالی AGGAGGGCAAAATGCACTGT برای‌موقعیت ۱۳۷- و TAACCTCATTCAGGACTTCC برای موقعیت ۶۰۷- به عنوان Common reverse و دو پرایمر Forward با توالی‌های CCCCAATTTTACGAAGAAAAT, CCCCACTTTTACGAAGAAAAC برای موقعیت ۱۳۷- و GTTGCAGAAAGTGTAAAAATTATTAC, GTTGCAGAAAGTGTAAAAATTATTAA برای موقعیت ۶۰۷- در لوله‌های مجزا استفاده شد. برای تکثیر قطعه ۱۱۶ جفت بازی توسط دستگاه Master cycler (Eppendorf Germany) میکروتیوب‌ها ابتدا به‌مدت دو دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند و سپس ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه پنج بار و در مرحله بعد ۲۵ بار در توالی ۲۰ ثانیه ۹۵ درجه، ۲۰ ثانیه ۶۷ درجه و ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه حرارت داده شد و در مرحله آخر به‌مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه حرارت داده شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۲٪ حاوی Ethidiom Bromide توسط ترانس ریلومیناتور بررسی شدند.

تجزیه و تحلیل داروها با نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۲ و آزمون χ^2 با حدود اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

یافته‌ها

۱- تحلیل داده‌های ما توزیع ژنوتیپ IL_{18} را در نوکلئوتید ۱۳۷- به شرح زیر نشان می‌دهد: ۵۳٪ بیماران دیابتیک ژنوتیپ GG (گوانین- گوانین) را نشان داده‌اند در حالی که این ژنوتیپ در افراد طبیعی ۳۸/۶٪ بوده است ($p<0/0001$). شیوع ژنوتیپ CC (سیتوزین- سیتوزین) در بیماران دیابتیک نیز مانند ژنوتیپ قبلی دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به افراد کنترل بوده ($p<0/0001$) ولی ژنوتیپ GC چنین تغییری را نشان نمی‌دهد. ۲- در جدول ۳ توزیع ژنوتیپ IL_{18} در نوکلئوتید ۶۰۷- نشان داده شده است. ژنوتیپ‌های AA، AC و CC در افراد دیابتیک نسبت به افراد طبیعی تغییر آماری قابل توجیه را نشان نمی‌دهد ($p<0/543$).

جدول-۱: مشخصات‌افراد مورد مطالعه در دو گروه‌بیماران(دیابتی) و شاهد(سالم)

متغیرها		بیماران (دیابتی)	شاهد (سالم)
جنس	مرد تعداد (درصد)	۳۲(۴۲/۷)	۵۰ (۵۶/۸)
	زن تعداد (درصد)	۴۳ (۵۷/۳)	۳۸ (۴۳/۲)
میانگین سنی (سال)		۱۵	۲۰
میانگین سن شروع بیماری (سال)		۷/۳	-
میانگین زمان ابتلا به بیماری (سال)		۹/۹	-
مجموع		۷۵ (۱۰۰)	۸۸(۱۰۰)

جدول-۲: توزیع ژنوتیپ IL_{18} در نوکلئوتید ۶۰۷- در افراد طبیعی و دیابتیک

ژنوتیپ	افراد طبیعی	افراد دیابتیک	p*
AA	٪۱۶	٪۲۲	۰/۵۴۳
AC	٪۵۴/۵	٪۴۸	
CC	٪۲۹/۵	٪۳۰	

* آزمون آماری χ^2 و $p<0/05$ معنی‌دار می‌باشند.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

دیابت نوع I یک بیماری اوتوایمون می‌باشد که در پاتوژنز آن عوامل ژنتیک و محیطی نقش مهمی دارند.[۱۳-۱۱و۷] IL_{18} یک سایتوکاین التهابی است که توسط ماکروفاژهای فعال و سلول‌های دندرتیک تولید شده و به کمک اینترفرون گاما (IFNγ) در تکامل و شکل‌گیری دیابت نوع I مؤثر است.[۱۴] ژن این سایتوکاین در کروموزوم 11Q22.2-Q22.3 قرار داشته و شامل شش اگزون و پنج اینترون می‌باشد.[۱۵] تجزیه و تحلیل به روش کلونینگ و ظهور ژن (Gene expression) پلی‌مورفیسم دو نوکلئوتید ساده (single) را در مناطق ۱۳۷- و ۶۰۷- پروموتوژن IL_{18} نشان می‌دهد که نقش مهمی در فعال شدن ژن سایتوکاین مزبور داشته و در نتیجه اینترفرون گاما را نیز فعال می‌کند.[۱۶و۱۴] اخیراً همچنین دریافته‌اند که همزمان با ابتلا فرد به بیماری دیابت نوع I مقدار IL_{18} در مراحل اولیه بیماری در سرم افزایش می‌یابد[۱۷و۱۰] و در نتیجه باعث افزایش رده فرعی لنفوسیت Th_1 همراه با اثر تقویتی با IL-12 و متعاقباً افزایش قدرت سایتوتوکسیتی سلول‌های فوق و نیز سلول‌های کشنده با up-regulation لیگاند Fas و همچنین تولید پرفورین (Perforin) می‌شود. نتیجه این مکانیسم ایجاد یک التهاب مزمن در فرد بیمار خواهد شد. چنین سازوکاری به تخریب سلول‌های β پانکراس نقش مستقیمی خواهد داشت.[۳] مطالعات متعدد در حیوانات آزمایشگاهی و انسان نشان داده است که کمبود IL_{18} فعالیت Th_1 را کاهش داده و مقدار IL_{18} در مرحله Sub-clinical که در بیماران همراه افزایش آنتی‌بادی ضد جزائر بتا می‌باشد افزایش یافته و بدین‌وسیله نقش سایتوکاین فوق در بخشی از پاتوژنز بیماران مزبور مشخص می‌شود.[۱۸] در مطالعه ما که در ۷۵ بیمار مبتلا به دیابت نوع I انجام شد مشخص گردید که ژنوتیپ CC و GG در موقعیت ۱۳۷- در منطقه پروموترژن IL_{18} از نظر آماری افزایش قابل توجهی نسبت به افراد کنترل طبیعی نشان می‌دهد (p<۰/۰۰۱) در صورتی که ژنوتیپ AA در بیماران مزبور در موقعیت ۶۰۷- تغییر چشمگیری نسبت به افراد کنترل نشان نمی‌دهد (p=۰/۵۴۳). چنانچه ژنوتیپ GG/CC در موقعیت ۱۳۷- را با ژنوتیپ AA در موقعیت ۶۰۷- با هم محاسبه نماییم ملاحظه می‌کنیم که این مجموعه تأثیر مثبتی بر دخالت این سایتوکاین در پاتوژنز بیماری دیابت نوع I خواهد داشت. مطالعاتی که توسط Kretowski در جمعیت دیابتیک لهستان به عمل آمد نشان می‌دهد که آلل C در موقعیت ۱۳۷- در ژنوتیپ ۱۳۷- یک آلل حساس به‌عنوان ژنوتیپ مؤثر در ایجاد دیابت نوع I محسوب می‌شود.[۱۸] مطالعات مشابهی در ژاپن انجام شد که نتیجه آن نشان‌دهنده تأثیر ژنوتیپ CA در بیماران دیابتیک نسبت به افراد کنترل می‌باشد. در همین مطالعه ژنوتیپ AA کاهش چشمگیری را در بیماران فوق نشان می‌دهد که نتایج حاصل مشابه تحقیقات ما است. تحقیقات گروه دیگری در چین نیز مشابه یافته‌های ما می‌باشد. در حالی که Szeszko در تحقیقی در سال ۲۰۰۶ که بر روی نژاد قفقازی در انگلستان انجام شد چنین نتایجی را به دست نیاورد.[۱۵] چنین نتایج متنوع و گوناگون می‌تواند تأثیر سایر شرایط ژنتیکی و یا عوامل محیطی را بر روی دخالت IL_{18} در پاتوژنز بیماری دیابت نوع I نشان دهد. بنابراین تعجب‌آور نخواهد بود که بگوییم امکان دارد پلی‌مورفیسم IL_{18} در پاتوژنز دیابت نوع I در برخی نژادها هیچ‌گونه تأثیری ندارد.

برای شناخت واقعی آنچه که بیان شد می‌باید مطالعات بسیار وسیع‌تر در تعداد زیادی از افراد یک جامعه از نقطه‌نظر عوامل ژنتیکی و محیطی صورت بگیرد تا با قاطعیت بیشتری از نقش پلی‌مورفیسم IL_{18} در پاتوژنز بیماری دیابت نوع I صحبت نمود.

References

1. Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 2001; 414: 792-8.
2. Kantárová D, Buc M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. *Physiol Res* 2007; 56: 255-66.
3. al-Kassab AS, Raziuddin S. Immune activation and T cell subset abnormalities in circulation of patients with recently diagnosed type I diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol* 1990; 81: 267-71.
4. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995; 268: 1185-8.
5. Cebeci AN, Nuhoglu Y, Arslanoglu I, Erguven M, Agachan N. The role of IL-18 in Th1/Th2 balance in children. *Allergy Asthma Proc* 2006; 27: 365-70.
6. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. *Genes Immun* 2002; 3: 313-30.
7. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes Immun* 2001; 2: 61-70.
8. Kallmann BA, Lampeter EF, Hanifi-Moghaddam P, Hawa M, Leslie RD, Kolb H. Cytokine secretion patterns in twins discordant for Type I diabetes. *Diabetologia* 1999; 42: 1080-5.
9. Lewis EC, *Dinarello* CA. Responses of IL-18- and IL-18 receptor-deficient pancreatic islets with convergence of positive and

Archive of SID
www.SID.ir

negative signals for the IL-18 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 16852-7.
10. Akerblom HK, Knip M. Putative environmental factors in Type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 31-67.
11. Eerligh P, Koeleman BP, Dudbridge F, Jan Bruining G, Roep BO, Giphart MJ. Functional genetic polymorphisms in cytokines and metabolic genes as additional genetic markers for susceptibility to develop type 1 diabetes. *Genes Immun* 2004; 5: 36-40.
12. Weelen KE, Hotamisligil SG. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115: 1111-9.
13. Novota P, Kolostova K, Pinterova D, Novak J, Treslova L, Andel M, et al. Interleukin IL-18 gene promoter polymorphisms in adult patients with type 1 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes in adults. *Immunol Lett* 2005; 96: 247-51.
14. Dong GP, Yu ZS, Liang L, Zou CC, Fu JF, Wang CL. IL-18 gene promoter -137C/G and -607C/A polymorphisms in Chinese Han children with type 1 diabetes mellitus. *Int J Immunogenet* 2007; 34: 75-9.
15. Szeszko JS, Howson JM, Cooper JD, Walker NM, Twells RC, Stevens HE, et al. Analysis of polymorphisms of the interleukin-18 gene in type 1 diabetes and Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Diabetes* 2006; 55: 559-62.
16. Katakami N, Kaneto H, Matsuhisa M, Yoshiuchi K, Kato K, Yamamoto K, et al. Serum interleukin-18 levels are increased and closely associated with various soluble adhesion molecule levels in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 159-61.
17. Oikawa Y, Shimada A, Kasuga A, Morimoto J, Osaki T, Tahara H, et al. Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2003; 171: 5865-75.
18. Kretowski A, Mironczuk K, Karpinska A, Bojaryn U, Kinalski M, Puchalski Z, et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 3347-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 1, Apr 2009: 20-24

IL_{18} gene polymorphism in type I diabetic patients: a case- control study

Massoud A.[1*]
Sheikh Bahai N.[1]
Massoud M.[2]
Salehi E.[1]
Massoud A H.[3]
Vojgani M.[1]
Rajab A.[4]

1- Department of Immunology
2- General Physician

Tehran University of Medical Sciences

3- Department of Immunology, University of Mac Gill, Montreal, Canada
4- Iranian Diabetes Society

[*] Corresponding author: Dept. of Immunology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN
Tel: +98-21-66495991
email: massoud.ahmad@yahoo.com

Received: June 24, 2008 Accepted: September 28, 2008

Abstract

Background: Type I diabetes is an autoimmune disease characterized by T-cell Mediated destruction of pancreatic β-cells. A variety of environmental, genetic and Immunologic factors are involved in the development of the disease. IL_{18} is a cytokine secreted by macrophage and monocytes and play an important role in the pathogenesis of diabetes Type I through inducing IFN-γ production. It is shown to be strongly associated with the development of diabetes in NOD mice. It is also shown to have increased level in the subclinical stage of diabetes mellitus (type 1). Genetic polymorphisms in the IL-18 gene influence production and secretion of cytokine and are considered as a risk factor in auto-Immune diseases.

Methods: In this case control study, 75 type I diabetic patients and 88 healthy controls studied for polymorphism at positions -137 and -607. DNA extraction from the whole blood was performed according to the standardized method and polymorphism was determines by SSP-PCR. Data were analyzed by SPSS- 12 using Chi-Square Test with 95% Confidence interval.

Results: A statistical significant difference in GG genotype (53%) and CC genotype (16%) at the -137 position of IL_{18} gene was found, as compared to the control subjects (p=0.000) whereas we have not shown any statistical significance at the position -607.

Conclusion: IL_{18} is a key cytokine secreted by macrophages and monocytes and stimulate the Th_1 lymphocyte. This cytokine can activate cytotoxic T lymphocytes (CTL) and destroy the pancreatic β cell. Our results show that the frequency of GG and CC genotypes at the position -137 may be associated with susceptibility to diabetes.

Keywords: IL-18, gene polymorphism, diabetes type I, IL_{18}, cytokine.

Archive of SID

www.SID.ir