Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هجدهم شماره ۶۶ مهر و آبان سال ۱۳۸۷ (۴۱-۳۵)

بررسی ارتباط بین پلیمرفیسمهای موجود در ژنهای اینترلوکین-۴ و اینترفرون- گاما با بیماری دیابت نوع ۲

سعید دانشمندی *+ علی اکبر پورفتح الله ** محمد کاظمی عرب آبادی***
غلامحسین حسن شاهی **** محسن رضاییان ***** مجید آسیابانها رضایی ******

چکیده

سابقه و هدف: در حالی که دیابت ملیتوس نوع ۲ شایعترین فرم در بین انواع دیابتهاست، اما علت اصلی ایجاد آن هنوز ناشناخته است. عوامل ژنتیکی و محیطی زیادی را در ایجاد دیابت دخیل می دانند. سایتوکاینها از جمله عوامل مربوط به سیستم ایمنی می باشند که اثر آنها بر ایجاد دیابت به اثبات رسیده است. میزان بیان سایتوکینها در افراد و جوامع مختلف، متفاوت می باشد. طی مطالعات قبلی ثابت شده است که پلیمرفیسمهای موجود در ناحیه ۸۷۴+ ژن اینترفرون-گاما و ۵۹۰- ژن اینترلوکین-۴ با میزان بیان این دو سایتوکین در ارتباط است. با توجه به این شواهد در این مطالعه به بررسی پلیمرفیسمهای موجود در این نواحی با بیماری دیابت تیپ ۲ پرداخته شد.

مواد و روش ها: نمونه خون محیطی از ۵۱ بیمار دیابتی نوع ۲ و ۵۰ نفر از افراد غیر دیابتی به همراه ضد انعقاد EDTA جمع آوری شد و DNA به روش salting out از خون محیطی جدا شد. پلیمرفیسمهای موجود در ناحیه ۸۷۴+ ژن اینترفرون-گاما با روش ARMS-PCR و پلیمرفیسمهای موجود در ناحیه ۵۹۰- ژن اینترلوکین-۴ با روش PCR-RFLP بررسی شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که ژنوتیپ IFN-γ TT در بیماران دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش داشت اما این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نبود بین تمام ژنوتیپهای IL-4 و گروه کنترل نیز هیچگونه اختلاف معنی داری پیدا نشد.

استنتاج: با توجه به نتایج این مطالعه و دیگر محققین به نظر می رسد که پلیمرفیسمهای موجود در ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 و ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN-γ نمی تواند با این مطالعات در ارتباط باشند.

واژه‌های کلیدی: اینترفرون-گاما، اینترلوکین-۴، پلیمرفیسم، دیابت ملیتوس نوع ۲

مقدمه

بیماری دیابت نوع ۲، بیماری با علت ناشناخته است، به گونه ای که محققین عوامل ژنتیکی و محیطی را در بروز این بیماری دخیل می دانند (۱). این بیماری بیشتر در سنین بالا بروز می کند و عوارض ناشی از آن مشکلات عدیده ای را برای بیماران ایجاد می کند (۱). در مطالعات مختلف اختلال سایتوکینها (Cytokine)

+ **مولف مسئول : سعید دانشمندی**- تهران، گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
E-Mail: daneshmandi2006@yahoo.com
* کارشناس ارشد ایمونولوژی ، دانشگاه تربیت مدرس
** دکترای ایمونولوژی، استاد دانشگاه تربیت مدرس
*** کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
**** دکترای هماتولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
*****دکترای اپیدمیولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
****** کارشناس ارشد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
تاریخ دریافت ۸۷/۱۲/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۷/۳/۱ تاریخ تصویب: ۸۷/۶/۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

و بر هم خوردن تعادل سایتوکینی را در ایجاد این نوع از دیابت دخیل می دانند (۲، ۳). اکثر محققین بر این باورند که بیماری دیابت نوع ۲ همانند نوع ۱ به سیستم ایمنی وابسته است به گونه ای که با تغییر الگوی سایتوکینی از Th2 به سمت Th1 همراه خواهد بود (۲). به گونه ای که مطالعات مختلفی به افزایش عملکرد سیستم ایمنی در این دسته بیماران اشاره دارند. مثلا یک مطالعه نشان می دهد که سلولهای مونوسیت بیماران دیابتی نوع ۲ تمایل بیشتری به تولید سایتوکینهای التهابی دارند (۴). مطالعات زیادی نیز به افزایش سطح سرمی سایتوکینهای التهابی همچون IL-12 (۵)، IL-I8 (۶)، IL-6 (۸،۷) و TNF-α (۸،۷) در این دسته بیماران اشاره دارند. عوامل مختلفی در میزان تولید این سایتوکینها توسط سیستم ایمنی اثر دارند از جمله این عوامل پلی مرفیسمهای موجود در ژنهای سایتوکینها در افراد مختلف می باشد (۹). جابجایی نوکلئوتیدها و ایجاد برخی پلیمرفیسمها در ژن سایتوکینها اثر مهمی در تولید و ترشح سایتوکینها دارد (۹). برای مثال نشان داده شده است که جابجایی نوکلئوتید C به جای T در موقعیت ۵۹۰- ژن IL-4 موجب کاهش بیان این سایتوکین خواهد شد به گونه ای که اگر فرد به صورت TT باشد بیان افزایش یافته، CT کاهش بیان و CC کمترین بیان را خواهد داشت (۹).IL-4 سایتوکینی با خصوصیات Th2 می باشد که به سرکوب سیستم ایمنی سلولی و در نهایت جلوگیری از تخریب سلولهای جزایر لانگرهانس توسط سلولهای سیستم ایمنی می پردازد (۲). از طرف دیگر IFN-γ سایتوکینی با خصوصیات Th1 می باشد و موجب تقویت سیستم ایمنی سلولی در جهت تخریب سلول هدف می باشد (۲). مطالعات قبلی نشان داده اند که جابجایی نوکلئوتید A در موقعیت ۸۷۴+ به جای T موجب کاهش بیان این سایتوکین می شود به گونه ای که حالت TT بیشترین بیان، AT بیان متوسط و AA کمترین بیان را دارد (۹). در این مطالعه به بررسی این پلیمرفیسمها در ژن سایتوکین IL-4 به عنوان سایتوکین سرکوب کننده سیسم ایمنی سلولی و IFN-γ به عنوان تقویت کننده ایمنی سلولی پرداخته شد.

مواد و روش ها

طی این مطالعه مورد شاهد، نمونه خون محیطی از ۵۱ بیمار دیابتی نوع ۲ (قند خون ناشتای بالای mg/ml ۱۲۶ در دو نوبت) و ۵۰ نفر از افراد غیر دیابتی (قند خون پایین تر از mg/ml ۱۰۰ در دو نوبت) به همراه ضد انعقاد EDTA جمع آوری شد و DNA به روش salting out از خون محیطی جدا شد (۱۰). قند خون تمام نمونه ها (دیابتی و سالم) قبل از انجام آزمایشات PCR مورد اندازه گیری قرار گرفت. به گونه ای که در سه نوبت از دو گروه در فواصل زمانی یک ماهه نمونه گیری به عمل آمد و قند خون ناشتای این افراد مورد بررسی قرار گرفت، انتخاب بیماران به صورت تصادفی از بین مراجعه کنندگان به کلینیک دیابت علی ابن ابیطالب رفسنجان صورت گرفت. بیماران به گونه ای انتخاب شدند که دیابت آنها کنترل شده بود (با اندازه گیری HbA1c توسط کلینیک دیابت) و فقط تحت درمان دارویی بودند (انسولین دریافت نمی کردند). گروه کنترل را اطرافیان این بیماران (به علت همکاری بیشتر این گروه و همچنین حذف عوامل مخدوش کننده) که از نظر سن، جنس و طبقه اجتماعی (درآمد ماهانه، شغل و تحصیلات) با گروه مورد مطالعه یکسان سازی شده بودند، تشکیل می داد و نمونه گیری با رضایت کتبی از افراد جمع آوری شد. دو گروه به گونه ای انتخاب شدند که عوامل مخدوش کننده به طور کامل حذف شوند مثلا دو گروه عاری از تمام بیماریهای عفونی و آلرژی بودند، سیگار نمی کشیدند و همانگونه که ذکر شد از نظر سن، جنس و طبقه

www.SID.ir

Archive of SID

اجتماعی که بر بیماری دیابت اثر می گذارد نیز همسان سازی شدند. پلیمرفیسم ژن IL-4 با استفاده از متد PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism) و با استفاده از پرایمرهای زیر انجام شد:

F: 5'-TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT-3'
R: 5'- TGG GGA AAG ATA GAG TAA TA-3'

PCR در حجم ۲۵µl انجام شد که شامل این موارد بودند: 50, 10 mM tris-HCL, 1.5 mM mM KCl, MgCl2 ژلاتین ۱٪، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، µM ۰/۶ از هر پرایمر، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه آنزیم 5 units recombinant Taq DNA polymerase. طی این PCR مقدار ۱۹۵ bp از ژن IL-4 تکثیر شد. سیکلهای PCR به این گونه بود: یک سیکل; ۹۵°c به مدت ۵ دقیقه، ۵۳°c به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲°c به مدت ۳۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: ۹۵°c به مدت ۵۰ ثانیه، ۵۳°c به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲°c به مدت ۳۰ ثانیه. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۲ ٪ به همراه اتیدیوم بروماید درست شد سپس ۱۰µl از محصول PCR تحت هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودالاثر AvaII قرار گرفت. شرایط هضم آنزیمی به این قرار بود: ۱۰µl از محصول PCR با ۲ یونیت از آنزیم AvaII (FERMENTAS, Vilnius, Lithuania) به مدت ۸ ساعت انکوبه شد و محصول نهایی به همراه ۴µl از بافر رنگی همراه (برومو فنل بلو به همراه ساکارز) بر روی این ژل الکتروفورز شد و با دستگاه UV transilluminator مورد بررسی قرار گرفت. محصول PCR ژن IL-4 یک قطعه ۱۹۵ bp بود که تحت اثر آنزیم محدودالاثر AvaII در صورت وجود نوکلئوتید C به دو قطعه ۱۷۵bp و ۲۰bp بریده می شد. در ضمن برای نشان دادن اندازه باند از ۵۰bp ladder از شرکت سیناژن استفاده شد. پلیمرفیسم ژن IFN-γ با استفاده از متد ARMS PCR و با استفاده از پرایمرهای زیر انجام شد:

F (common) : 5'- TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA-3'
R: 5'- TTC TTA CAA CAC AAA ATC T آلل: AAA TCT-3'
R: 5'- TTC TTA CAA CAC AAA ATC A آلل: AAA TCA-3'

پرایمرهای کنترل داخلی لازم جهت تایید PCR که قطعه ای به طول ۱۱۶bp از ژن بتا گلوبولین را تکثیر می دادند، دارای توالی زیر بودند:

F: 5'-ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC-3'
R: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'

PCR طبق پروتوکل قبلی انجام شد. وجود باند ۲۶۲bp در تیوب حاوی هر یک از پرایمرها نشان دهنده نوع پلیمرفیسم می باشد.

یافته ها

در طی این تحقیق تعداد ۵۱ نفر از بیماران دیابتی و ۵۰ نفر از افراد سالم از نظر پلیمرفیسمهای موجود در ژن IL-4 و IFN-γ مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سن افراد در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب ۹±۳۸ و ۸±۳۸ سال بوده است. آزمون آماری t-test هیچگونه اختلاف معنی داری را در بین دو گروه نشان نمی دهد (جدول شماره ۱). از نظر جنسی تعداد ۲۰ (۴۰٪) از گروه شاهد زن و تعداد ۳۰ (۶۰٪) مرد بوده اند. این نسبتها به ترتیب در گروه مورد برابر ۲۱ (۴۱٪) و ۳۰ (۵۹٪) بوده اند. آزمون آماری Chi-Square نشان می دهد که این اختلافها از نظر آماری معنی دار نبوده است (جدول شماره ۱). مضافا اینکه نسبت افراد دو گروه در طبقات اجتماعی موجود در جدول ۱ نیز اختلاف معنی دار آماری نداشته است. نتایج حاصل از بررسی پلیمرفیسم موجود در ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN-γ نشان می دهد که ۵۹/۱٪ از گروه مورد مطالعه دارای آلل TT بودند. این میزان اگر چه نسبت به گروه کنترل بالاتر می باشد اما آزمون های آماری هیچگونه اختلاف معنی داری را بین

www.SID.ir

دو گروه نشان نمی دهد. نتایج حاصل از ایـن مطالعـه در جدول شماره ۲ و شکل شماره ۱ نشان داده شـده اسـت. نتایج مربوط به پلیمرفیـسم ناحیـه ۵۹۰- ژن IL-4 نیـز در جدول شماره ۳ و شکل شماره ۲ آورده شده اسـت. ایـن جدول فراوانی و درصدهای مربوط به هر یک از حالات پلیمرفیسم موجود در ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 را در هر دو گروه مورد و شاهد نشان می دهد. بـا توجـه بـه ایـن کـه فراوانی منتظره در دو خانه جدول کمتر از ۵ بوده اسـت، انجام آزمون آماری Chi-Square مقدور نبوده است.

جدول شماره ۱: فراوانی و درصدهای مربوط به متغیرهای سن، جنس و طبقه اجتماعی را در دو گروه مورد و شاهد

متغیر		شاهد	مورد
سن (میانگین انحراف)		۳۸±۸	۳۸±۹
جنس	زن	۲۰ (٪۴۰)	۲۱ (٪۴۱)
	مرد	۳۰ (٪۶۰)	۳۱ (٪۵۹)
طبقه اجتماعی	ضعیف	۱۲ (٪۲۴)	۱۱ (٪۲۱)
	متوسط	۲۲ (٪۴۴)	۲۵ (٪۴۹)
	بالا	۱۶ (٪۳۲)	۱۵ (٪۳۰)

جدول شماره ۲: فراوانی و درصدهای مربوط به هر یک از حالات پلیمرفیسم موجود در ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN-γ را در هر دو گروه مورد و شاهد

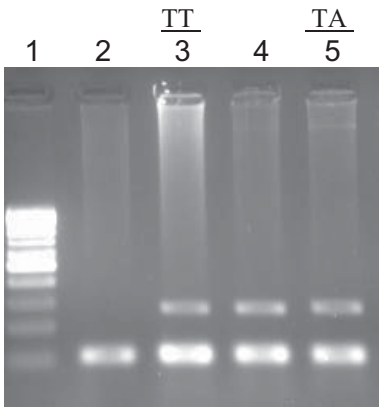
وضعیت / پلیمرفیسم	مورد	شاهد	جمع
TT n (%)	۲۶ ٪۵۹/۱	۱۸ ٪۴۰/۹	۴۴ ٪۱۰۰
AT n (%)	۱۶ ٪۴۳/۲	۲۱ ٪۵۶/۸	۳۷ ٪۱۰۰
AA n (%)	۹ ٪۴۵	۱۱ ٪۵۵	۲۰ ٪۱۰۰
جمع n (%)	۵۱ ٪۵۰/۵	۵۰ ٪۴۹/۵	۱۰۱ ٪۱۰۰

Chi-Square: 2.321 df: 2 p: 0.313

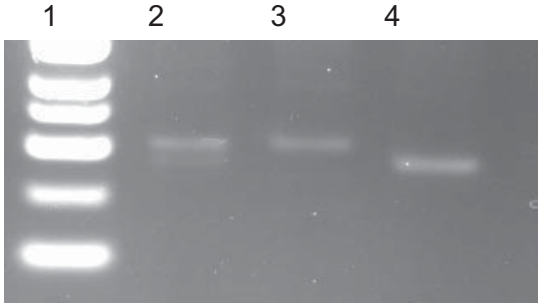
جدول شماره ۳: فراوانی و درصدهای مربوط به هر یک از حالات پلیمرفیسم موجود در ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 را در دو گروه مورد و شاهد

وضعیت / پلیمرفیسم	مورد	شاهد	جمع
CC n (%)	۳۷ ٪۴۹/۳	۳۸ ٪۵۰/۷	۷۵ ٪۱۰۰
CT n (%)	۱۲ ٪۵۲/۲	۱۱ ٪۴۷/۸	۲۳ ٪۱۰۰
TT n (%)	۲ ٪۶۶/۷	۱ ٪۳۳/۳	۳ ٪۱۰۰
جمع n (%)	۵۱ ٪۵۰/۵	۵۰ ٪۴۹/۵	۱۰۱ ٪۱۰۰

Not valid



تـصویرشماره۱: نمونـه ای از نتـایج تکثیـر ژن IFN-γ سـتون ۱: 100bp ladder سـتون ۲ و ۴: ویـال حـاوی پرایمـر دارای نوکلئوتیـد T در انتهـای '3 ستون ۳ و ۵: ویال حاوی پرایمر دارای نوکلئوتید T در انتهای '3 یک ستون ۴: آلل هموزیگوت CC که کاملا" برش داده شده است.



تصویر شماره۲: نمونه ای از نتایج هضم آنزیمی محصول PCR ژن IL-4 ستون ۱: ladder ستون ۲: آلل CT که یک باند بدون برش و بانـد دیگـر بـا برش می باشد ستون ۳: آلل هموزیگوت TT بدون برش اسـت سـتون ۴: آلـل هموزیگوت CC که کاملا" برش داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

دیابت نوع ۲ بیماری است که به عقیده بسیاری از محققین عوامل مربوط به سیستم ایمنی در ایجاد آن سهم عظیمی را دارا می باشند (۲). از جمله عواملی که موجب جهت گیری سیستم ایمنی و پاسخ‌های آن می شوند سایتوکینها می باشند (۲). میزان بیان و ترشح سایتوکینها از سلولهای ایمنی به عوامل مختلفی از جمله برخورد با عوامل عفونی، وضعیت هورمونی، پلیمرفیسم‌های موجود در ژن سایتوکینها و ... بستگی دارد (۲، ۹، ۱۰). ما در این مطالعه به بررسی پلیمرفیسمهای موجود در ژن IL-4 و IFN-γ به عنوان دو سایتوکین با عملکرد کاملا متفاوت پرداختیم. به این منظور پلیمرفیسمهایی را که بر بیان این دو سایتوکین اثر می گذارند را انتخاب کردیم، و به بررسی این پلیمرفیسمها در دو گروه مورد (دیابتی) و شاهد (افراد سالم) پرداختیم. همانگونه که نتایج حاصل از مطالعات آماری بر روی دو گروه مورد و شاهد نشان می دهد (جدول شماره ۱)، دو گروه به خوبی از نظر سن، جنس و طبقه اجتماعی همسان سازی شده بودند. همانگونه که جدول شماره ۲ نشان می‌دهد بین انواع حالات موجود در ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 در بین گروه مورد و شاهد اختلافی وجود ندارد. براساس توزیع اطلاعات جمع آوری شده از تست Chi-Square برای اندازه گیری اختلاف این میانگین‌ها استفاده شد و این آزمون هیچگونه اختلاف معنی داری را در میانگین‌های فوق نشان نداد. مطالعه بر روی پلیمرفیسم‌های موجود در ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN-γ نشان داد که آلل TT در بیماران دیابتی نسبت به گروه شاهد بالاتر بود اما این تفاوت نیز دارای اختلاف معنی دار آماری در بین دو گروه نبود. Tsiavou و همکاران نیز به بررسی پلیمرفیسم‌های موجود در ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN-γ و ارتباط آن با بیماری دیابت نوع ۲ در کشور یونان پرداخت اما نتایج وی کاملا متفاوت با نتایج این مطالعه بود، زیرا وی به یک ارتباط کاملا معنی دار آماری بین دیابت نوع ۲ و آلل AA در ژن مربوطه دست پیدا کرد (۱۱). این آلل با بیان کم IFN-γ در ارتباط است (۲، ۱۱). به نظر می رسد که نتایج این مطالعه اینگونه قابل تفسیر می باشد که با کاهش تولید IFN-γ اعمال سرکوبگری این سایتوکین بر روی سلول Th17 نیز کم می شود و در نتیجه با افزایش تولید IL-17 مواجه خواهیم بود. از آنجا که IL-17 یک سایتوکین التهابی می باشد و نقش آن در بیماریهای خود ایمنی زیادی به اثبات رسیده است به نظر می رسد که نتایج این محقق نیز قابل توجه می باشد. البته بایستی ذکر کرد که تیم تحقیقاتی ما در حال تحقیق بر روی میزان بیان IL-17، IFN-γ و پلیمرفیسم‌های موجود در ژن این دو سایتوکین در این دسته بیماران می باشد. نتایج این مطالعه ارتباط معنی دار آماری را بین این بیماری و هیچکدام از آللها نشان نداد. به نظر می رسد که اگر در آینده ما با تعداد نمونه بیشتری به بررسی این مسئله بپردازیم به نتایج بهتری دست خواهیم یافت. به نظر می رسد وجود آلل TT که با افزایش بیان IFN-γ در ارتباط است توسط محققین دیگر مورد تایید نیست زیرا همانگونه که ذکر شد به نظر می رسد که این سایتوکین نقش مهاری بر IL-17 دارد. بنابراین سعی داریم تا در مطالعات آینده نه تنها به بررسی پلیمرفیسمهای ذکر شده با تعداد نمونه به مراتب بالاتر بپردازیم بلکه سعی داریم تا میزان بیان این سایتوکینها را چه در In Vitro و چه در سطح سرمی این بیماران مورد ارزیابی قرار دهیم. در زمینه ارتباط این دو پلیمرفیسم با بیماری دیابت مطالعات بسیار کمی در سرتاسر دنیا صورت گرفته است اما محققین زیادی به بررسی ارتباط پلیمرفیسمهای موجود در ژن دیگر سایتوکینهای التهابی (۱۲) و غیر التهابی (۱۳) با دیابت نوع ۱ پرداخته اند. در

www.SID.ir

تمام این مطالعات به ارتباط معنی دار آماری بین این پلیمرفیسمها و بیماریهای مربوطه دست پیدا کرده اند. با توجه به مطالب ذکر شده و با توجه به این مطلب که در طی بیماری دیابت الگوی سایتوکینی به سمت Th1 می باشد، به نظر می رسد که مطالعات در این زمینه می توانند موارد جدیدی از علل ژنتیکی ایجاد کننده بیماری دیابت نوع ۲ را مطرح نمایند. در پایان ما پیشنهاد می کنیم که محققین دیگر به بررسی پلیمرفیسمهای موثر بر بیان سایتوکینها در ژنهای IFN-γ، TNF-α و IL-12 به عنوان سایتوکینهای اصلی سیستم ایمنی سلولی و همچنین IL-17 به عنوان سایتوکین مهم در بیماری‌های اتوایمیون بپردازند زیرا به نظر می رسد که سایتوکینهایی مثل IL-4 که به سرکوب سیستم ایمنی سلولی می پردازند در این امر نقش مهمی را دارا نباشند. به گونه ای که مطالعه حاضر نیز بر این مطلب صحه گذاشت.

References

1. angiomodulatory activity of sera from type 2 diabetic patients with background retinopathy.J Physiol Pharmacol 2005; 56 (4): 65-70.

2. Andrew G. Gianoukakis,Terry J. Smith. The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Endocrine Disease. Can J Diabet 2004; 28 (1): 30-42.

3. Piotr Skopin´skia,T, Ewa Rogala, Barbara Duda-Kro, Anna Lipinska, Ewa Sommer, Joanna Chorostowska-Wynimko, Jerzy Szaflik, Iwona Partyk, Ewa Skopin´ska-Ro´yewsk. Increased interleukin-18 content and angiogenic activity of sera from diabetic (Type 2) patients with background retinopathy. J Diabetes Complicat 2005; 19: 335– 338.

4. Annapaula Giulietti, Evelyne van Etten, Lut Overbergh, Katinka Stoffels, Roger Bouillon, Chantal Mathieu Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile: 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 works as anti-inflammatory. Diabetes Res Clin Pr 2007; 77 (1): 47-57.

5. Małgorzata Wegner, Hanna Winiarska, Teresa Bobkiewicz-Kozłowska, Marzena Dworacka. IL-12 serum levels in patients with type 2 diabetes treated with sulphonylureas. Cytokine 2008; 42: 312–316.

6. Piotr Skopin´skia,T, Ewa Rogalac, Barbara Duda-Kro´ld, Anna Lipin´skae, Ewa Sommer, Joanna Chorostowska-Wynimkof, Jerzy Szaflika, Iwona Partykaa, Ewa Skopin´ska-Ro´yewska. Increased interleukin-18 content and angiogenic activity of sera from diabetic (Type 2) patients with background retinopathy. J Diabetes Complicat 2005; 19: 335– 338.

7. Mavridis G, Souliou, E. Diza E, Symeonidis G, Pastore F, A M Vassiliou Karamitsos D, Inflammatory cytokines in insulin- treated patients with type 2 diabetes. Nutr Metab Cardiovas 2008; 18(7):471-476.

www.SID.ir

Archive of SID

8. John C. Pickup, Gary D. Chusney, Stephen M. Thomas, Davina Burt Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor-α and blood cytokine production in type 2 diabetes. Life Sci 2000; 67: 291-300.

9. Eskandar Kamali- Sarvestani, Jale Zolghadri, Behrouz Gharesi-Fard, Jamal Sarvari. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. J Reprod Immunol 2005; 65: 171–178.

10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16: 1215.

11. Tsiavou. A, Hatziagelaki. E, Chaidaroglou . A, Koniavitou. K., Degiannis. D, Raptis. S.A, Correlation between intracellular interferon-g (IFN-g) production by CD4C and CD8C lymphocytes and IFN-g gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes of adults (LADA). Cytokine 2005; 31: 135-141.

12. Manoochehr Rasouli, Simin Kiany. Association of interferon- gamma and interleukin- 4 gene polymorphisms with susceptibility to brucellosis in Iranian patients. Cytokine 2007; 38: 49–53.

13. Awata T, Kurihara S, Iitaka M, Takei S, Inoue I, Ishii C et al. Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism (IDDM12 locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population. Diabetes 1998; 47: 128–129.

14. Akane Idea, Eiji Kawasaki, Norio Abiru, Fuyan Sun, Masakazu Kobayashi, Tetsuya Fukushima, Ryoko Takahashi, Hironaga Kuwahara, Atsushi Kita, Katsuya Oshima, Shigeo Uotani, Hironori Yamasaki, Yoshihiko Yamaguchi, Katsumi Eguchi. Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Japanese patients with type 1 diabetes. J Autoimmun 2004; 22:73–78.

www.SID.ir