

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

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

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 می‌دانند. سایتوکاینها از جمله عوامل مربوط به سیستم ایمنی می‌باشند که اثر آنها بر ایجاد دیابت به اثبات رسیده است. میزان بیان سایتوکاینها در افراد و جوامع مختلف، متفاوت می‌باشد. طی مطالعات قبلی ثابت شده است که پلیمر فیسمهای موجود در ناحیه +۸۷۴ ژن اینترفرون-گاما و -۵۹۰ ژن اینترلوکین-۴ با میزان بیان این دو سایتوکاین در ارتباط است. با توجه به این شواهد در این مطالعه به بررسی پلیمر فیسمهای موجود در این نواحی با بیماری دیابت تیپ ۲ پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: 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. پلیمر فیسمهای موجود در ناحیه +۸۷۴ ژن اینترفرون-گاما با روش ARMS-PCR و پلیمر فیسمهای موجود در ناحیه -۵۹۰ ژن اینترلوکین-۴ با روش PCR-RFLP بررسی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ژنو تیپ 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 می‌رسد که پلیمر فیسمهای موجود در ناحیه -۵۹۰ ژن IL-4 و ناحیه +۸۷۴ ژن IFN-γ نمی‌تواند با این مطالعات در ارتباط باشند.

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

مقدمه

بیشتر در سنین بالا بروز می‌کند و عوارض ناشی از آن مشکلات عدیده‌ای را برای بیماران ایجاد می‌کند (۱). در مطالعات مختلف اختلال سایتوکاینها (Cytokine)

بیماری دیابت نوع ۲، بیماری با علت ناشناخته است، به گونه‌ای که محققین عوامل ژنتیکی و محیطی را در بروز این بیماری دخیل می‌دانند (۱). این بیماری

E-Mail: daneshmandi2006@yahoo.com

* دکرای ایمونولوژی، استاد دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

**** دکرای هماتولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

***** کارشناس ارشد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

تاریخ تصویب: ۸۷/۶/۲۰

+ مولف مسئول: سعید دانشمندی - تهران، گیشا، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

* کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

** کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

*** دکرای ایدمیولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

**** تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۱

***** تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۱۲/۲۰

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 (قد خون ناشتای بالای mg/ml در دو نوبت) و ۵۰ نفر از افراد غیر دیابتی (قد خون پایین تر از ۱۰۰ mg/ml در دو نوبت) به همراه ضد salting انعقاد EDTA جمع آوری شد و DNA به روش PCR نمونه ها (دیابتی و سالم) قبل از انجام آزمایشات 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 این ایطالیب 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 مثلاً دو گروه عاری از تمام بیماریهای عفونی و آرثری بودند، سیگار نمی کشیدند و همانگونه که ذکر شد از نظر سن، جنس و طبقه

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. مثلاً یک مطالعه نشان می دهد که سلولهای مونوسیت بیماران دیابتی نوع ۲ تمايل بیشتری به تولید سایتوکینهای التهابی دارند (۴). مطالعات زیادی نیز به افزایش سطح سرمی سایتوکینهای التهابی TNF-α IL-6 (۶)، IL-8 (۵) و IL-12 (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 به جای C باشد که در موقعیت ۴-IL سایتوکینی با خصوصیات Th2 می باشد که به سرکوب سیستم ایمنی سلولی و در نهایت جلوگیری از تخریب سلولهای جزایر لانگرهانس توسط سلولهای IFN-γ سیستم ایمنی می پردازد (۲). از طرف دیگر ۷-IFN 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 به جای T در موقعیت ۸۷۶+ به موجب کاهش بیان این سایتوکین می شود به گونه ای که حالت TT بیشترین بیان AT

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

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

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

طبق برتوکل قبلی انجام شد. وجود باند PCR در تیوب حاوی هر یک از پرایمرهای نشان دهنده نوع پلیمرفیسم می‌باشد.

یافته‌ها

در طی این تحقیق تعداد ۵۱ نفر از بیماران دیابتی و ۵ 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 38 ± 9 و 38 ± 8 سال بوده است. آزمون آماری t-test هیچگونه اختلاف معنی داری را در بین دو گروه نشان نمی‌دهد (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 می‌دهد که این اختلافها از نظر آماری معنی دار نبوده است (جدول شماره ۱). مضافاً 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 $+874$ ژن γ -IFN- γ نشان می‌دهد که $59/1$ ٪ از گروه مورد مطالعه دارای آآل TT بودند. این میزان اگر چه نسبت به گروه کنترل بالاتر می‌باشد اما آزمون‌های آماری هیچگونه اختلاف معنی داری را بین

اجتماعی که بر بیماری دیابت اثر می‌گذارد نیز همسان سازی شدند. پلیمرفیسم ژن IL-4 با استفاده از متان PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism)

استفاده از پرایمرهای زیر انجام شد:

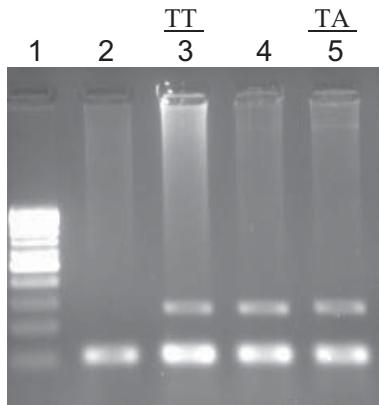
F: 5'-TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT-3'
R: 5'-TGG GGA AAG ATA GAG TAA TA-3'

در حجم $1\text{ }\mu\text{l}$ انجام شد که شامل این موارد بودند: $50\text{ }\mu\text{M KCl}$, $1.5\text{ }\mu\text{M tris-HCL}$, $10\text{ }\mu\text{M MgCl}_2$ ژلاتین ۱٪, $200\text{ }\mu\text{M میکرومول از هر dNTP}$, $50\text{ }\mu\text{M میکرومول از هر ۱/۶ از هر پرایم}$, $50\text{ }\mu\text{g میکرونگرم از DNA استخراج شده به همراه آنزیم ۵ units recombinant Taq DNA polymerase}$. طی این PCR مقدار 195 bp از ژن IL-4 تکثیر شد. سیکلهای PCR به این گونه بود: یک سیکل؛ 95°C به مدت ۵ دقیقه، 53°C به مدت ۵۰ ثانیه، 72°C به مدت ۳۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل به صورت: 95°C به مدت ۵۰ ثانیه، 53°C به مدت ۵۰ ثانیه، 72°C به مدت ۳۰ ثانیه. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۲٪ به همراه اتیدیوم بروماید درست شد سپس $10\text{ }\mu\text{l}$ از محصول PCR تحت هضم آنزیمی توسط آنزیم محدود الاثر AvaII قرار گرفت. شرایط هضم آنزیمی به این قرار بود: $1\text{ }\mu\text{l}$ از محصول PCR با ۲ یونیت از آنزیم AvaII (FERMENTAS, Vilnius, Lithuania) به مدت ۸ ساعت انکوبه شد و محصول نهایی به همراه $1\text{ }\mu\text{l}$ 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 195 bp بود که تحت اثر آنزیم محدود الاثر AvaII در صورت وجود نوکلئوتید C به دو قطعه 175 bp و 20 bp برشیده می‌شد. در ضمن برای نشان دادن اندازه باند از 50 bp ladder از شرکت سیناژن استفاده شد. پلیمرفیسم ژن IFN- γ با استفاده از ARMS PCR و با استفاده از پرایمرهای زیر انجام شد:

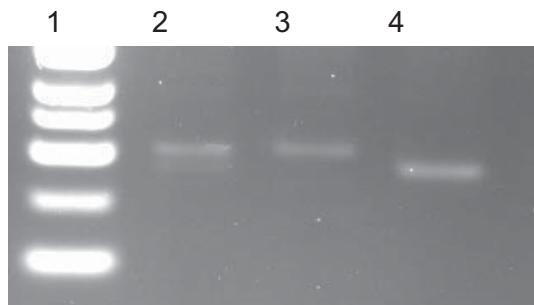
جدول شماره ۳: فراوانی و درصدهای مربوط به هر یک از حالات پلیمرفیسم موجود در ناحیه ۵۹۰-زن ۴-IL-4 را در دو گروه مورد و شاهد

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

Not valid



تصویر شماره ۱: نمونه ای از نتایج تکثیر زن IFN- γ ستون ۱: 100bp ladder ستون ۲ و ۴: ویال حاوی پرایمر دارای نوکلوتید T در انتهای ۳': ستون ۳ و ۵: ویال حاوی پرایمر دارای نوکلوتید T در انتهای ۳' یک ستون ۴: آلل هموزیگوت CC که "کاملاً" برش داده شده است.



تصویر شماره ۲: نمونه ای از نتایج هضم آنزیمی محصول PCR زن IL-4 ستون ۱: 100bp ladder ستون ۲: آلل CT که یک باند بدون برش و باند دیگر با برش می باشد ستون ۳: آلل هموزیگوت TT بدون برش است ستون ۴: آلل هموزیگوت CC که "کاملاً" برش داده شده است.

دو گروه نشان نمی دهد. نتایج حاصل از این مطالعه در جدول شماره ۲ و شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

نتایج مربوط به پلیمرفیسم ناحیه ۵۹۰-زن ۴-IL-4 نیز در جدول شماره ۳ و شکل شماره ۲ آورده شده است. این جدول فراوانی و درصدهای مربوط به هر یک از حالات پلیمرفیسم موجود در ناحیه ۵۹۰-زن ۴-IL-4 را در هر دو گروه مورد و شاهد نشان می دهد. با توجه به این که فراوانی منتظره در دو خانه جدول کمتر از ۵ بوده است، انجام آزمون آماری Chi-Square محدود 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	(%)۲۱	(%)۴۰(۲۰)
	(%)۳۱	(%)۶۰(۳۰)
طبقه اجتماعی	(%)۱۱	(%)۲۴(۱۲)
	(%)۲۵	(%)۴۴(۲۲)
	(%)۱۵	(%)۳۲(۱۶)

جدول شماره ۲: فراوانی و درصدهای مربوط به هر یک از حالات پلیمرفیسم موجود در ناحیه ۵۹۰-زن ۴-IFN- γ را در هر دو گروه مورد و شاهد

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

Chi-Square: 2.321 df: 2 p: 0.313

بحث

کاملاً متفاوت با نتایج این مطالعه بود، زیرا وی به یک ارتباط کاملاً 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 می‌رسد که نتایج این مطالعه اینگونه قابل تفسیر می‌باشد که با کاهش تولید IFN-γ اعمال سرکوبگری این سایتوکین بر روی سلول Th17 کم می‌شود و در نتیجه با افزایش تولید IL-17 مواجه خواهیم بود. از آنجا که IL-17 یک سایتوکین التهابی می‌باشد و نقش آن در بیماریهای خود اینمنی زیادی به اثبات رسیده است به نظر می‌رسد که نتایج این محقق نیز قابل توجه می‌باشد. البته باقیستی ذکر کرد که تیم تحقیقاتی ما در حال تحقیق بر روی میزان بیان IL-17 و IFN-γ و پلیمرفیسمهای موجود در ژن این دو سایتوکین در این دسته بیماران می‌باشد. نتایج این مطالعه ارتباط معنی دار آماری را بین این بیماری و هیچکدام از آللها نشان نداد. به نظر می‌رسد که اگر در آینده ما با تعداد نمونه بیشتری به بررسی این مسئله پردازیم به نتایج بهتری دست خواهیم یافت. به نظر می‌رسد وجود آلل TT که با افزایش بیان γ-IFN در ارتباط است توسط محققین دیگر مورد تایید نیست زیرا همانگونه که ذکر شد به نظر می‌رسد 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 مرتب بالاتر پردازیم 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

دیابت نوع ۲ بیماری است که به عقیده بسیاری از محققین عوامل مربوط به سیستم ایمنی در ایجاد آن سهم عظیمی را دارا می‌باشد (۲). از جمله عواملی که موجب جهت گیری سیستم ایمنی و پاسخهای آن می‌شوند سایتوکینها می‌باشد (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 γ-IFN به عنوان دو سایتوکین با عملکرد کاملاً متفاوت پرداختیم. به این منظور پلیمرفیسمهای را که بر بیان این دو سایتوکین اثر می‌گذارند 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 می‌دهد (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 γ-IFN نشان داد که آلل TT در بیماران ناحیه +۸۷۴-ژن γ-IFN 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 γ-IFN و ارتباط آن با بیماری دیابت نوع ۲ در کشور یونان پرداخت اما نتایج وی

موثر بر بیان سایتوکینها در ژنهای TNF- α , IFN- γ و IL-12 به عنوان سایتوکینهای اصلی سیستم ایمنی سلولی و همچنین IL-17 به عنوان سایتوکین مهم در بیماری‌های اتوایمیون پردازند زیرا به نظر می‌رسد که سایتوکینهایی مثل IL-4 که به سرکوب سیستم ایمنی سلولی می‌پردازند در این امر نقش مهمی را دارا نباشند. به گونه‌ای که مطالعه حاضر نیز بر این مطلب صحه گذاشت.

تمام این مطالعات به ارتباط معنی دار آماری بین این پلیمر فیسمها و بیماریهای مربوطه دست پیدا کرده‌اند. با توجه به مطالب ذکر شده و با توجه به این مطلب که در طی بیماری دیابت الگوی سایتوکینی به سمت Th1 می‌باشد، به نظر می‌رسد که مطالعات در این زمینه می‌توانند موارد جدیدی از علل ژنتیکی ایجاد کننده بیماری دیابت نوع ۲ را مطرح نمایند. در پایان ما پیشنهاد می‌کنیم که محققین دیگر به بررسی پلیمر فیسمها

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 Szaflak, Iwona Partyk, 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.
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 D₃ 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 Rogala, Barbara Duda-Kro'ld, Anna Lipin'skiae, Ewa Sommer, Joanna Chorostowska-Wynimkof, Jerzy Szaflaka, 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.

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. Tsavou. 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.