

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^{***}
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 سایتوکاینها در افراد و جوامع مختلف، متفاوت می باشد. 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 سایتوکین 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 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. 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.

یافته ها: نتایج نشان داد که ژنوتیپ TT IFN- γ 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 پلیمر فیس‌مهای 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، پلیمر فیس‌م، 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 سایتوکاینها (Cytokine)

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

E-Mail: daneshmandi2006@yahoo.com

^{**} دکترای ایمونولوژی، استاد دانشگاه تربیت مدرس

^{***} دکترای هماتولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

^{****} کارشناس ارشد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

تاریخ تصویب: ۸۷/۶/۲۰

^{*} کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

^{***} کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

^{*****} دکترای اپیدمیولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۳/۱

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۲۰

بیان متوسط و AA کمترین بیان را دارد (۹). در این مطالعه به بررسی این پلیمر فیسما در ژن سایتو کین IL-4 به عنوان سایتو کین سرکوب کننده سیستم 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 ۱۲۶ mg/ml در دو نوبت) و ۵۰ نفر از افراد غیر دیابتی (قند خون پایین تر از ۱۰۰ mg/ml 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 مثلاً دو گروه عاری از تمام بیماریهای عفونی و آلرژی بودند، سیگار نمی کشیدند و همانگونه که ذکر شد از نظر سن، جنس و طبقه

و بر هم خوردن تعادل سایتو کینی 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 سایتو کینی 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 تمایل بیشتری به تولید سایتو کینهای التهابی دارند (۴). مطالعات زیادی نیز به افزایش سطح سرمی سایتو کینهای التهابی همچون IL-12 (۵)، IL-18 (۶)، IL-6 (۷) و TNF- α (۸) در این دسته بیماران اشاره دارند. عوامل مختلفی در میزان تولید این سایتو کینها توسط سیستم ایمنی اثر دارند از جمله این عوامل پلی مرفیسمهای موجود در ژنهای سایتو کینها در افراد مختلف می باشد (۹). جابجایی نوکلئوتیدها و ایجاد برخی پلیمر فیسما در ژن سایتو کینها اثر مهمی در تولید و ترشح سایتو کینها 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 سایتو کین 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 سایتو کینی 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 سایتو کینی 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 سایتو کین 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 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 38 ± 8 و 38 ± 9
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
آماري 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

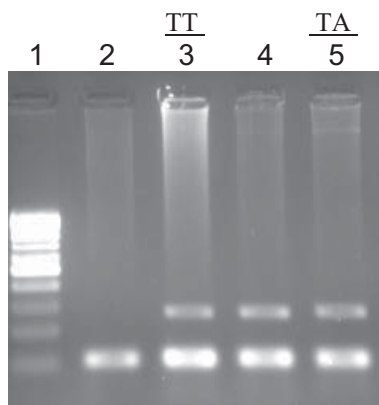
اجتماعی که بر بیماری دیابت اثر می گذارد نیز همسان
سازی شدند. پلیمرفیسم ژن IL-4 با استفاده از متد
PCR-RFLP (polymerase chain reaction-
restricted fragment length polymorphism) و با
استفاده از پرایمرهای زیر انجام شد:

F: 5'-TAA ACT TGG GAG AAC ATG GT-3'
R: 5'- TGG GGA AAG ATA GAG TAA TA-3'
PCR در حجم ۲۵ μ l انجام شد که شامل این موارد
بودند: 50 mM tris-HCL, 10 mM KCl, 1.5 mM
MgCl₂ ۱٪، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده
۰/۶ از هر پرایمر، ۵ units recombinant Taq DNA polymerase
به همراه آنزیم 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
اتیديوم بروماید درست شد سپس ۱۰ μ l از محصول
PCR تحت هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودالایتر
AvaII قرار گرفت. شرایط هضم آنزیمی به این قرار
بود: ۱۰ μ l از محصول PCR با ۲ یونیت از آنزیم
AvaII (FERMENTAS, Vilnius, Lithuania) به مدت
۸ ساعت انکوبه شد و محصول نهایی به همراه ۴ μ 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 ۱۹۵ bp بود که تحت اثر
آنزیم محدودالایتر 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:

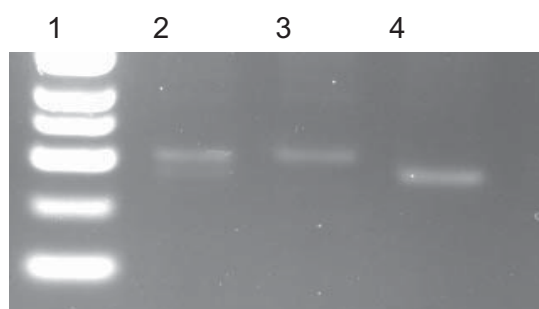
جدول شماره ۳: فراوانی و درصدهای مربوط به هر یک از حالات پلیمریسم موجود در ناحیه ۵۹۰- ژن IL-4 را در دو گروه مورد و شاهد

وضعیت پلیمریسم	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



تصویر شماره ۱: نمونه ای از نتایج تکثیر ژن IFN- γ ستون ۱: 100bp ladder ستون ۲ و ۴: ویال حاوی پرایمر دارای نوکلئوتید T در انتهای 3' ستون ۳ و ۵: ویال حاوی پرایمر دارای نوکلئوتید T در انتهای 3' یک ستون ۴: آلل هموزیگوت CC که کاملاً "برش داده شده است."



تصویر شماره ۲: نمونه ای از نتایج هضم آنزیمی محصول PCR ژن IL-4 ستون ۱: 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 پلیمریسم ناحیه ۵۹۰- ژن 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 پلیمریسم موجود در ناحیه ۵۹۰- ژن 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 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 پلیمریسم موجود در ناحیه ۸۷۴+ ژن IFN- γ را در هر دو گروه مورد و شاهد

وضعیت پلیمریسم	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

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 پاسخ های آن می شوند سایتو کینها می باشند (۲). میزان بیان و ترشح سایتو کینها از سلولهای ایمنی به عوامل مختلفی از جمله برخورد با عوامل عفونی، وضعیت هورمونی، پلیمر فیسسمهای موجود در ژن سایتو کینها و ... بستگی دارد (۲، ۹، ۱۰). ما در این مطالعه به بررسی پلیمر فیسسمهای موجود در ژن IL-4 و IFN- γ به عنوان دو سایتو کین با عملکرد کاملاً متفاوت پرداختیم. به این منظور پلیمر فیسسمهایی را که بر بیان این دو سایتو کین اثر می گذارند را انتخاب کردیم، و به بررسی این پلیمر فیسسمها 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 می دهد 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 میانگین ها استفاده شد و این آزمون هیچگونه اختلاف معنی داری را در میانگین های فوق نشان نداد. مطالعه بر روی پلیمر فیسسمهای 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 پلیمر فیسسمهای موجود در ناحیه ۸۷۴+ژن IFN- γ و ارتباط آن با بیماری دیابت نوع ۲ در کشور یونان پرداخت اما نتایج وی

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 می رسد که نتایج این مطالعه اینگونه قابل تفسیر می باشد که با کاهش تولید IFN- γ اعمال سرکوبگری این سایتو کین 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 سایتو کین 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 پلیمر فیسسمهای موجود در ژن این دو سایتو کین 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 پردازیم 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 سایتو کین نقش مهمی بر IL-17 دارد. بنابراین سعی داریم تا در مطالعات آینده نه تنها به بررسی پلیمر فیسسمهای ذکر شده با تعداد نمونه به مراتب بالاتر پردازیم بلکه سعی داریم تا میزان بیان این سایتو کینها را چه در In Vitro و چه در سطح سرمی این بیماران مورد ارزیابی قرار دهیم. در زمینه ارتباط این دو پلیمر فیسسم با بیماری دیابت مطالعات بسیار کمی در سرتاسر دنیا صورت گرفته است اما محققین زیادی به بررسی ارتباط پلیمر فیسسمهای موجود در ژن دیگر سایتو کینهای التهابی (۱۲) و غیر التهابی (۱۳) با دیابت نوع ۱ پرداخته اند. در

موثر بر بیان سایتوکینها در ژنهای $\text{TNF-}\alpha$ ، $\text{IFN-}\gamma$ و IL-12 به عنوان سایتوکینهای اصلی سیستم ایمنی سلولی و همچنین IL-17 به عنوان سایتوکین مهم در بیماریهای اتوایمون پردازند زیرا به نظر می رسد که سایتوکینهای 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.

تمام این مطالعات به ارتباط معنی دار آماری بین این پلیمر فیسما 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 پلیمر فیسماهای

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 Giuliatti, 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.

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, Hatzigelaki. 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.