

پلی مورفیسم ژن IL₁₈ در بیماران دیابتی نوع I: یک مطالعه مورد-شاهدی

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

چکیده

زمینه و هدف: بیماری دیابت نوع I، یکی از بیماری‌های اتوایمیون به شمار می‌رود که بیشتر، جوانان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل متعدد ژنتیکی، محیطی و ایمونولوژیکی در بروز این بیماری مؤثر می‌باشند. ایترلوکین-18 یک سایتوکاین قوی التهابی است که از طریق القاء تولید ایترفرون 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 است. هدف مطالعه بررسی پلی مورفیسم ژن کد کننده IL₁₈ در نوکلئوتیدهای ۱۳۷-۶۰۷ و مقایسه آن در مبتلایان دیابت نوع I و افراد سالم است. روشن 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 پلی مورفیسم ژن کد کننده IL₁₈ در موقعیت ۱۳۷-۶۰۷ 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 قابل توجهی نسبت به افراد کنترل سالم داشت ($p=0.000$). در موقعیت ۶۰۷-ژنوتیپ‌های AA، AC و CC در افراد دیابتیک تغییر آماری قابل توجهی نسبت به افراد طبیعی نشان نمی‌دهند ($p=0.543$). نتیجه‌گیری: فراوانی ژنوتیپ GG در موقعیت ۱۳۷- و نیز ژنوتیپ CC در همین موقعیت در مبتلایان دیابت نوع I درای اختلاف معنی‌داری نسبت به افراد سالم بود ($p<0.001$) و دو آلل دارای نوکلئوتیدهای C و G با افزایش میزان بیان IL₁₈ همراه بوده و در پاتوژن بیماری نقش مهمی دارند.

کلمات کلیدی: پلی مورفیسم ژن IL₁₈، دیابت نوع I، سایتوکاین.

احمد مسعود^{۱*}، نوشین شیخ بهایی^۱
مهتاب مسعود^۲، عیسی صالحی^۱
امیرحسین مسعود^۳، محمد وجگانی^۱
اسدالله رجب^۴

۱- گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- پژوهش 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: ۰۶۴۹۵۹۹۱ email: massoud.ahmad@yahoo.com

مقدمه

فعال شدن لنفوسيت‌های اوتوراکتیو (autoreactive) شده و باعث تهاجم آنها به پانکراس و در نهایت تخریب سلول‌های β می‌گردد.^{۱-۵} جایه‌جایی نوکلئوتیدها در نواحی تنظیمی ژن‌های سایتوکاین‌ها که از آن به عنوان پلی مورفیسم یاد می‌شود تأثیر زیادی بر میزان ترشح سایتوکاین‌ها دارد و از طرفی حضور آلل‌های متفاوت ژن‌های سایتوکاین‌ها مختلف بر تعادل نهایی شبکه سایتوکاینی تأثیر دارد.^{۶-۸} بنابراین با توجه به نکات فوق تشخیص زودهنگام و استفاده از امکانات ایمونولوژیک و بررسی پلی مورفیسم سایتوکاین‌ها برای پیش‌گویی احتمال وقوع بیماری در افراد در معرض خطر اهمیت ویژه‌ای دارد. در این مطالعه نقش پلی مورفیسم ژن IL₁₈ در جایگاه نوکلئوتید ۶۰۷- و ۱۳۷- در پاتوژن بیماری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.^{۹,۱۰}

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.^۱ زمینه‌های ژنتیکی و عوامل محیطی در بروز این بیماری نقش مهمی داشته و بیماری غالباً در سنین پایین در هم خودگی تعادل شبکه سایتوکاینی را در پاتوژن بیماری دخیل می‌داند. غالب محققین بر این عقیده‌اند که در این بیماری لنفوسيت‌های Th1 که الگوی ترشح سایتوکاینی خاصی دارد، موجب

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 به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه حرارت داده شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ٪۲ حاوی Ethidium Bromide توسط ترانس ریلومیناتور بررسی شدند.

تجزیه و تحلیل داروها با نرم افزار 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٪ بوده است ($p < 0.0001$). شیوع ژنوتیپ CC (سیتوزین-سیتوزین) در بیماران دیابتیک نیز مانند ژنوتیپ قبلی دارای تفاوت معنی داری 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: مشخصات افراد مورد مطالعه در دو گروه بیماران (دیابتی) و شاهدان (سالم)

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

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 $p < 0.05$ معنی دار می‌باشند.

روش بررسی

این مطالعه مورد- شاهدی با مساعدت انجمن دیابت ایران 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 به عمل آمد. ۴۲٪ آنها زن و ۵۷٪ مرد با میانگین سنی ۲۰ سال بوده و هیچ گونه سابقه بیماری خود ایمنی نیز نداشته‌اند (جدول ۱). از افراد بیمار و سالم مقدار پنج میلی لیتر خون کامل گرفته شد و نمونه‌ها با EDTA مخلوط شده و تا زمان اتمام نمونه‌گیری و انجام آزمایشات در فریز $^{-70^{\circ}\text{C}}$ - نگهداری شدند. استخراج DNA به روش استاندارد $^{2\beta}$ از خون کامل انجام شد و کیفیت DNA استخراج شده براساس OD ۰/۲۸۰ بررسی و در تمامی نمونه‌ها این نسبت بین ۱/۷-۱/۹ بود. برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها در موقعیت ۱۳۷- و ۶۰۷- به روش PCR-SSP از پرایمرهایی با توالی AGGAGGGCAAAATGCACTGT برای موقعیت ۱۳۷- و TAACCTCATTCAAGGACTTCC برای موقعیت ۶۰۷- به عنوان Forward و Common reverse و دو پرایمر با توالی‌های CCCCAATTACGAAGAAAAT, CCCCACTTTACGAAGAAAAC برای موقعیت ۱۳۷- و GTTGCAGAAAGTGTAAAAATTATTAC برای موقعیت ۶۰۷- در لوله‌های مجزا استفاده شد. برای تکثیر قطعه ۱۱۶ جفت بازی توسط دستگاه Master cycler (Eppendorf Germany) میکروتیوب‌ها ابتدا به مدت دو دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند و

بحث

پروموتژن IL₁₈ از نظر آماری افزایش قابل توجهی نسبت به افراد کنترل طبیعی نشان می‌دهد ($p < 0.001$) در صورتی که ژنتیپ AA در بیماران مزبور در موقعیت ۶۰۷- تغییر چشمگیری نسبت به افراد کنترل نشان نمی‌دهد ($p = 0.543$). چنانچه ژنتیپ GG/CC در موقعیت ۱۳۷- را با ژنتیپ AA در موقعیت ۶۰۷- با هم محاسبه نمایم ملاحظه می‌کنیم که این مجموعه تأثیر مشتبی بر دخالت این سایتوکاین در پاتوژن 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 ژنتیپ ۱۳۷- یک آلل حساس به عنوان ژنتیپ مؤثر در ایجاد دیابت نوع I محسوب می‌شود.^{۱۸} مطالعات مشابهی در ژاپن انجام شد که نتیجه آن نشان‌دهنده تأثیر ژنتیپ CA در بیماران دیابتیک نسبت به افراد کنترل می‌باشد. در همین مطالعه ژنتیپ AA کاهش چشمگیری را در بیماران فوق نشان می‌دهد که نتایج حاصل مشابه تحقیقات ما است. در 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 متعدد و گوناگون می‌تواند تأثیر سایر شرایط ژنتیکی و یا عوامل محیطی را بر روی دخالت IL₁₈ در پاتوژن بیماری دیابت نوع I نشان دهد. بنابراین تعجب‌آور نخواهد بود که بگوییم امکان دارد پلی‌مورفیسم IL₁₈ در پاتوژن 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 IL₁₈ در پاتوژن بیماری دیابت نوع I صحبت نمود.

References

- Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 2001; 414: 792-8.
- Kantárová D, Buc M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. *Physiol Res* 2007; 56: 255-66.
- 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.
- Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995; 268: 1185-8.
- Cebeci AN, Nuhoglu Y, Arslanoglu I, Erguvan M, Agachan N. The role of IL-18 in Th1/Th2 balance in children. *Allergy Asthma Proc* 2006; 27: 365-70.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lewis EC, Dinarello CA. Responses of IL-18- and IL-18 receptor-deficient pancreatic islets with convergence of positive and

دیابت نوع I یک بیماری اوتوایمون می‌باشد که در پاتوژن آن عوامل ژنتیک و محیطی نقش مهمی دارند.^{۱۳-۱۵} IL₁₈ یک سایتوکاین التهابی است که توسط ماکروفازهای فعال و سلول‌های دندرتیک تولید شده و به کمک ایترفرون گاما (IFNγ) در تکامل و شکل‌گیری دیابت نوع I مؤثر است.^{۱۶} ژن این سایتوکاین در کروموزوم ۱۱Q22.2-Q22.3 قرار داشته و شامل شش اگزون و پنج ایترنون می‌باشد.^{۱۵} تجزیه و تحلیل به روش کلونینگ و ظهور ژن (Gene expression) پلی‌مورفیسم دو نوکلئوتید ساده (single) را در مناطق ۱۳۷- و ۶۰۷- پرموتژن IL₁₈ نشان می‌دهد که نقش مهمی در فعال شدن ژن سایتوکاین مزبور داشته و در نتیجه ایترفرون گاما را نیز فعال می‌کند.^{۱۶} اخیراً همچنین دریافت‌هایی که همزمان با ابتلاء فرد به بیماری دیابت نوع I مقدار IL₁₈ در مراحل اولیه بیماری در سرم افزایش می‌یابد^{۱۰,۱۷} و در نتیجه باعث افزایش رده فرعی لنفوسيت Th1 همراه با اثر تقویتی با IL-12 و متعاقباً افزایش قدرت سایتوکیتی سلول‌های فوق و نیز سلول‌های کشنده با up-regulation لیگاند Fas و همچنین تولید پروفورین (Perforin) می‌شود. نتیجه این مکانیسم ایجاد یک التهاب مزمن در فرد بیمار خواهد شد. چنین سازوکاری به تخریب سلول‌های β بانکراس نقش مستقیمی خواهد داشت.^۳ مطالعات متعدد در حیوانات آزمایشگاهی و انسان نشان داده است که کمبود IL₁₈ فعالیت Th1 را کاهش داده و مقدار IL₁₈ در مرحله Sub-clinical که در بیماران همراه افزایش آنتی‌بادی ضد جزائر بتا می‌باشد افزایش یافته و بدین‌وسیله نقش سایتوکاین فوق در بخشی از پاتوژن بیماران مزبور مشخص می‌شود.^{۱۸} در مطالعه ما که در ۷۵ بیمار مبتلا به دیابت نوع I انجام شد مشخص گردید که ژنتیپ CC و GG در موقعیت ۱۳۷- در منطقه

- 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. Eerlich 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.

IL₁₈ 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

Abstract

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

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. IL₁₈ 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 IL₁₈ 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: IL₁₈ is a key cytokine secreted by macrophages and monocytes and stimulate the Th₁ 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, IL₁₈, cytokine.

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