

مطالعه ژن کاندیدا در دیابت نوع یک: $\text{IFN-}\gamma$

جواد توکلی بزاز^{۱*}، ورا پراویکا^۲، آندره بولتون^۳، یان هاجینسون^۴

چکیده

مقدمه: یکی از واسطه‌های التهابی مهم و ضروری در آغاز و بروز دیابت نوع ۱ سایتوکین $\text{IFN-}\gamma$ می‌باشد. این سایتوکین که از گروه سایتوکین‌های Th1 محسوب می‌شود، نقش بسیار مهمی را در برانگیختن سلول‌های ایمنی بیطرف (Th0) و تبدیل آنها به سلول‌های Th1 و به‌طور متقابل مهار تکثیر سلول‌های Th2 دارد که در نهایت سبب القا و پیشبرد پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌گردد. با توجه به آنکه الگوی پاسخ ایمنی در بیماری خودایمن دیابت نوع ۱ از نوع سلولی است، این سایتوکین جایگاه مهمی را از نظر هدایت واکنش‌های خودایمن و برهم زدن نظم عوامل سلولی و مولکولی درگیر داراست. از منظر مداخلات درمانی در بیماری دیابت نوع ۱ نیز این سایتوکین موضوع تحقیقات متنوعی در سطوح مختلف بوده است.

روش‌ها: در قالب یک Candidate Gene Association Study میزان تأثیر پلی‌مورفیسم ژن $\text{IFN-}\gamma$ در موقعیت $+874\text{T/A}$ بر ایجاد و پیشرفت بیماری دیابت نوع ۱ مطالعه شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۲۴۸ نفر بیمار بریتانیایی - قفقازی با دیابت نوع ۱ و ۱۱۹ نفر بدون بیماری مشخص (سالم) بوده است. روش ARMS-PCR جهت تعیین آلل و ژنوتیپ مربوط به پلی‌مورفیسم مذکور انتخاب گردید.

یافته‌ها: توزیع فراوانی آلل / ژنوتیپ حاصله از پلی‌مورفیسم ژن $\text{IFN-}\gamma$ تفاوت معنی‌داری را از نظر آماری در بین دو جمعیت مقایسه شده کنترل و بیمار نداشت ($P \geq 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به گزارش‌های قبلی که همراهی پلی‌مورفیسم مورد نظر با بیماری دیابت نوع ۱ را گزارش نموده‌اند، یافته‌های ما چنین نتیجه‌ای را تایید نمی‌کند که می‌تواند دلالت بر این نکته نماید که پلی‌مورفیسم (های) ژنی دخیل در ایجاد دیابت نوع ۱ در گزارش‌های قبلی، پلی‌مورفیسم (های) دیگری (یا در داخل ژن $\text{IFN-}\gamma$ یا در ساختمان ژن‌های مجاور) بوده‌اند که با پلی‌مورفیسم مورد مطالعه در Linkage Disequilibrium می‌باشند.

واژگان کلیدی: ژنتیک، پلی‌مورفیسم، دیابت، $\text{IFN-}\gamma$

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشکده علوم بیولوژی، دانشگاه منچستر، انگلستان

۳- مرکز دیابت و بیمارستان رویال منچستر، انگلستان

۴- انستیتو ملی پیوند، لوس آنجلس، آمریکا

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم؛ تلفن:

۲-۲۶۹۰۲؛ نامبر: ۸۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: tavakkolybazzaj@tums.ac.ir

مقدمه

دیابت نوع ۱ یکی از بیماری‌های خود ایمن محدود به عضو^۱ می‌باشد که دامنه آسیب نسجی در آن منحصر به سلول‌های بتای جزایر پانکراس است. شیوه پاسخ ایمنی در این بیماری از نوع سلولی^۲ بوده که در نتیجه غلبه الگوی Th1 و فعالیت بیش از حد آن و در مقابل، مهار فعالیت محور Th2 رخ می‌دهد [۱]. سیتوکین IFN- γ به عنوان مهم‌ترین سیتوکین از رده Th1، نقش بسیار مهمی را در جهت دهی مسیر تمایز سلول‌های ایمنی بیطرف (Th0) و تمایز آنها به سمت سلول‌های Th1 بر عهده دارد. این سیتوکین که از سلول‌های NK، سلول‌های T سیستمیک و خود سلول‌های Th1 ترشح می‌شود، بر سلول‌های مختلفی از جمله ماکروفاژها اثر می‌گذارد و سبب فعالیت و افزایش بیان مولکول‌های MHC کلاس II توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن (APC) می‌شود. این سلول‌ها سپس با عرضه آنتی ژن خودی به سلول‌های T خود واکنشگر^۳ - که حتی در گنجینه^۴ سلول‌های T مربوط به افراد عادی نیز وجود دارند- زمینه ایجاد پاسخ خودایمن را فراهم می‌آورند [۷-۲].

در فرآیند ایجاد بیماری دیابت نوع ۱ مراحل مختلفی مشاهده می‌گردد. در یکی از این مراحل که انسولیت نامیده می‌شود، جزایر لانگرهانس پانکراس توسط سلول‌های تک هسته‌ای^۵ ارتشاح می‌یابند. این وضعیت که در دوره قبل از بیان و بروز بالینی بیماری قابل تشخیص است، گاه تا پس از ظهور بالینی بیماری نیز حضورش ادامه می‌یابد [۸، ۹]. یکی از واسطه‌هایی که سبب ارتشاح و اسکان^۶ سلول‌های التهابی در این جریان می‌شود، IFN- γ می‌باشد [۱۰]. از میان سیتوکین‌های Th1 که تمامی آنها سبب هدایت انسولیت به طرف انهدام سلول‌های بتا یا ترشح کننده انسولین می‌گردند، تنها IFN- γ در سلول‌های جزایر بتای پانکراس قابل یافت بوده است. در آزمایش‌های حذفی ژن‌ها نیز IFN- γ تنها سیتوکین از میان

سیتوکین‌های رده Th1 بوده که حذف یا سرکوب آن، وقوع دیابت را تأخیر و یا کاهش داده است [۲]. گستره وسیع در کارکردهای بیولوژیک سیتوکین‌ها همراه با برخی دیگر از ویژگی‌ها که تقریباً برای کلیه آنها مطرح می‌باشد، موجب بروز مشکلات و یا ابهاماتی در ارزیابی و تفسیر نقش آنها در شرایط مختلف از جمله در بیماری‌ها می‌گردند. ترشح یک سیتوکین مشخص توسط سلول‌های مختلف و بالعکس قابلیت تأثیر یک سیتوکین بر سلول‌های مختلف^۷، ارایه عملکرد و اثری مشابه توسط سیتوکین‌های مختلف^۸، تولید آبشاری و زنجیروار آنها که یک سیتوکین سبب تحریک سلول‌ها و آزادسازی سیتوکین‌های دیگر و حتی خودش می‌گردد و در کنار این‌ها اثرات متقابل آنها بر یکدیگر در قالب‌هایی چون هم‌افزایی^۹ و یا مخالف^{۱۰} از جمله این موارد هستند. از سوی دیگر داشتن نیمه عمر کوتاه و غلظت‌های پلاسمایی پایین سیتوکین‌ها سبب دشواری استخراج^{۱۱} و مشخص نمودن^{۱۲} آنها می‌شود [۱۱]. از این روی یکی از رویکردهای مطالعاتی در آنالیز سیتوکین‌ها، آن است که سطح جستجو را به DNA و ساختمان ژنی این سیتوکین‌ها، یعنی قبل از موضوعیت یافتن موانع مذکور برگردانیم. در این رویکرد مثلاً وجود رابطه بین تغییرات ساختمانی ژن مربوط به سیتوکین و یک بیماری یا یک نشانه و علامتی که اهمیت بالینی و یا تحقیقاتی دارند، از یک نگاه کلی مورد کنکاش قرار می‌گیرد.

خوشبختانه در خصوص بسیاری از ژن‌ها از جمله ژن‌های چندین سیتوکین، طی مطالعات مختلف *In Vivo* و *In Vitro* وجود یک همراهی بین نوع تغییر ساختمانی ژن و به طور مشخص آلل خاصی از آن با سطح تولید فرآورده پروتینی آن ژن نشان داده شده است. لذا می‌توان ترجیحاً با گزینش این دسته خاص از تغییرات ژنی که اصطلاحاً کارکردی^{۱۳} نامیده می‌شوند، به ردیابی تأثیرات فنوتیپیک آنها در جهت افزایش یا کاهش بروز یک بیماری یا یک

⁷ Pleiotropy

⁸ Redundancy

⁹ Synergistic

¹⁰ Antagonistic

¹¹ Isolation

¹² Characterization

¹³ Functional

¹ Organ-specific

² Cell Mediated

³ Auto-reactive

⁴ Repertoire

⁵ Mononuclear Cells

⁶ Homing

تعیین نوع ژنوتیپ / آلل پلی مورفیک

با تهیه حدود ۵^{cc} خون محیطی از افراد مورد مطالعه، DNA موجود در سلول های گلبول سفید استخراج گردید. پس از طراحی پرایمرهای اختصاصی برای پلی مورفیسم مورد بررسی و همچنین طراحی پرایمر برای توالی قطعه کنترل (بخشی از ساختمان ژن هورمون رشد انسانی که در نوع انسانی غیر پلی مورفیک می باشد) (جدول ۱)، آماده سازی^۳ لازم جهت تایپ کردن هر یک از پلی مورفیسم های مورد اشاره با استفاده از روش - ARMS PCR صورت گرفت. در مرحله بعد محصول PCR بدست آمده که در واقع حاوی چندین میلیون کپی از توالی مورد نظر DNA یا قطعه هدف (در بردارنده موقعیت پلی مورفیک مورد مطالعه) بود بر روی ژل آگاروز قرار داده شد و پس از حرکت قطعات بر مبنای طول آنها (تعداد نوکلئوتید)، ضمن تابش اشعه ماوراء بنفش و مشاهده نوارهای DNA، نوع ژنوتیپ / آلل هر فرد از نظر پلی مورفیسم مورد بررسی تعیین گردید (شکل ۱).

بررسی های آماری

جهت بررسی نحوه توزیع آلل ها و ژنوتیپ های مختلف بین دو گروه شاهد و بیمار از نسبت های Odds Ratio (OR) و شاخص "درجه آزادی" (CI) ۹۵٪ استفاده گردید. آزمون های Chi-square و Fisher Exact جهت سنجش معنی دار بودن انتخاب گردیدند. عملیات آماری با برنامه Stata و نرم افزار SPSS (نسخه ۱۱/۵) انجام گرفت.

صفت^۱ که از حیث بیولوژیکی و پاتوفیزیولوژی دارای رابطه معنادار با فرآورده ژن مربوطه است، پرداخت. این رویکرد در مورد صفات یا بیماری هایی که دارای پس زمینه ژنتیکی هستند و بالقوه می توانند با تغییرات ساختمانی ژن مفروض رابطه ای هر چند نسبی داشته باشند، کاربرد وسیعی پیدا نموده است.

بنابراین توضیحات، مطالعه حاضر که به بررسی آثار فنوتیپیک یک پلی مورفیسم کارکردی از ژن IFN- γ در بروز بیماری دیابت نوع ۱ - که دارای زمینه های ژنتیکی شناخته شده است [۱۲]- پرداخته، موقعیت روشنی می یابد.

روش ها

گروه شاهد (Healthy controls)

این گروه به تعداد ۱۱۹ نفر را افرادی تشکیل می دادند که از نژاد بریتانیایی - قفقازی و دارای سلامت کامل بودند. همه افراد این جمعیت سابقه بیماری مشخص یا مزمنی (از جمله دیابت) را چه نزد خودشان و چه در بین بستگان درجه اول^۲ خود نمی دادند. انتخاب این افراد بطور تصادفی بود و نسبت فامیلی نیز با یکدیگر نداشتند.

بیماران

از بین بیماران مبتلا به دیابت که در «مرکز دیابت منچستر» در انگلستان دارای پرونده و سابقه مشخص از بیماری دیابت بودند، تعداد ۲۴۸ نفر آنها که به بیماری دیابت نوع یک مبتلا بوده و در طی سال های ۲۰۰۲ - ۱۹۹۸ به این کلینیک سرپایی مراجعه داشته و در هنگام مراجعه حداقل ۵ سال از زمان آغاز / تشخیص بیماری دیابت آنها گذشته بود، بصورت تصادفی انتخاب شدند. تمامی افراد بیمار از نژاد بریتانیایی - قفقازی بودند و فاقد رابطه خویشاوندی با یکدیگر بودند.

پس از تهیه و تأیید طرح تحقیقاتی حاضر توسط کمیته اخلاق پزشکی بیمارستان رویال منچستر (Royal Infirmary) و سپس اخذ رضایت از همه افراد شرکت کننده در این مطالعه، طرح وارد مرحله اجرایی گردید.

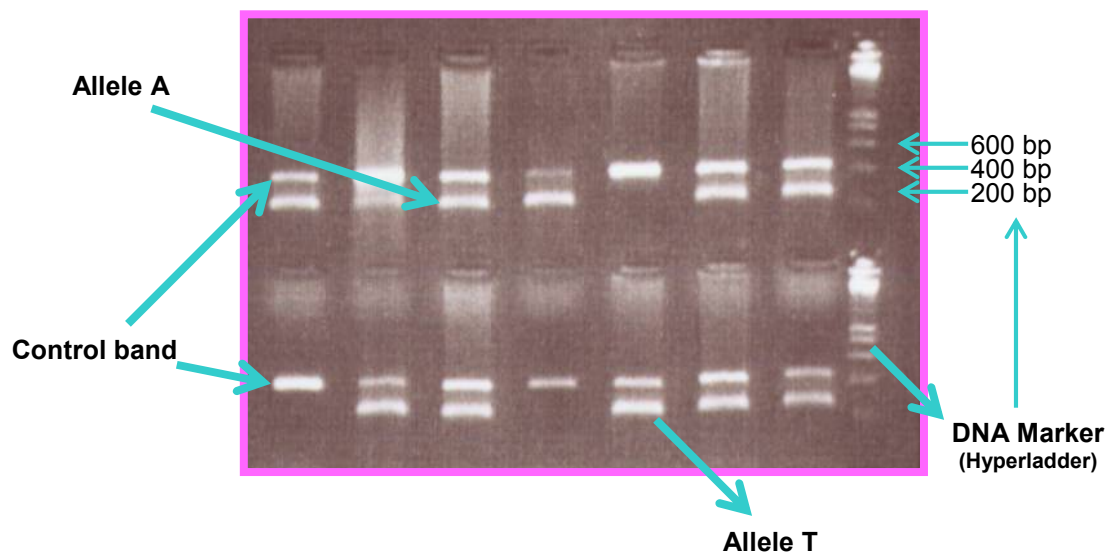
¹ Trait

² First degree relatives

³ Setup

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده برای پلی مورفیسم ژن $IFN-\gamma +874^*T/A$ و پرایمر کنترل

اندازه قطعه PCR	توالی	نام پرایمر	نام
۲۶۲ bp	5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3' 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3' 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3'	Generic primer Primer T (sense) Primer A (sense)	$IFN-\gamma +874^*T/A$
۴۲۹ bp	5'-GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3' 5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'	Sense: Antisense:	Internal control primers (HGH)

شکل ۱- تصویر محصول ARMS-PCR مربوط به پلی مورفیسم $IFN-\gamma +874^*T/A$ بر روی ژل آگاروز (ژنوتیپ افراد مختلف نیز مشخص شده است)جدول ۲- توزیع فراوانی ژنوتیپ/الل پلی مورفیسم $IFN-\gamma +874^*T/A$ در گروه کنترل (C) و بیماران دیابت نوع ۱ (P)

گروه بیمار	گروه شاهد	$IFN-\gamma +874^*T/A$
		ژنوتیپ
۵۴(۲۱/۸) †	۲۶(۲۲)	TT
۱۲۸(۵۱/۶)	۶۲(۵۲)	TA
۶۶(۲۶/۶)	۳۱(۲۶)	AA
		الل
۲۳۶(۴۷/۶)	۱۱۴(۴۸)	T
۲۶۰(۵۲/۴)	۱۲۴(۵۲)	A

* مقادیر P در هیچ یک از مقایسه‌ها معنی‌دار نبود ($P \geq 0.05$)
 † اعداد خارج پرانتز نشانگر تعداد و داخل پرانتز درصد فراوانی است.
 تعداد گروه بیمار: ۲۴۸ بیمار دیابتی
 تعداد گروه شاهد: ۱۱۹ فرد سالم

یافته‌ها

میزان فراوانی دو آلل مربوط به پلی مورفیسم مورد مطالعه در جمعیت شاهد بسیار نزدیک به هم بود که ضمن افزایش قدرت مطالعه، نیاز به حجم نمونه کمتری را در دو گروه شاهد و بیمار به همراه داشت. توزیع فراوانی ال/ل/ژنوتیپ حاصله از پلی مورفیسم ژن IFN- γ تفاوت معنی داری را از نظر آماری در بین دو جمعیت مورد مقایسه (بیمار: ۲۴۸ نفر، سالم: ۱۱۹ نفر) نداشت ($P \geq 0.05$) (جدول ۲).

بحث

با توجه به گزارش‌های قبلی که همراهی پلی مورفیسم مورد نظر با بیماری دیابت نوع ۱ را گزارش نموده‌اند [۱۳، ۱۴]، یافته‌های ما به چنین نتیجه‌ای نرسیده است که خود احتمالاً نشان می‌دهد پلی مورفیسم (های) ژنی اصلی و مؤثر در ایجاد دیابت نوع ۱ در گزارش‌های قبلی پلی مورفیسم (های) دیگری (یا در داخل ژن IFN- γ یا در ساختمان ژن‌های مجاور) که با پلی مورفیسم مورد مطالعه در پیوستگی ترجیحی^۱ (LD) هستند، باشد.

در مطالعه حاضر همراهی مشخصی بین پلی مورفیسم ژن IFN- γ و بیماری دیابت نوع یک مشاهده نگردید. کارکردی بودن پلی مورفیسم انتخاب شده [۱۵]، برخورداری الل کمتر شایع^۲ این پلی مورفیسم از فراوانی قابل ملاحظه و تقریباً برابر با الل شایع و بالاخره استفاده از تعداد بالای نمونه در دو جمعیت شاهد و بیمار در مجموع سبب گردیده اند که این مطالعه از قدرت^۳ بالایی برخوردار باشد. این موقعیت به نوبه خود سبب می‌گردد که دقت و صحت تفسیر نتایج بدست آمده تا حد قابل قبولی افزایش و متقابلاً زمینه مخدوش بودن یافته‌ها مثلاً در قالب مواردی همچون منفی کاذب کاهش یابد. به هر حال، مشاهده حاضر اگر چه نشان دهنده عدم همراهی بین پلی مورفیسم IFN- γ +874*T/A و وقوع یا بروز دیابت نوع یک در نزد یک جمعیت بریتانیایی است، ولی امکان اثرگذاری این

پلی مورفیسم در تظاهرات بالینی بیماری و احیاناً تفاوت در تابلوی بالینی^۴ را منتفی نمی‌داند. در چنین حالتی این پلی مورفیسم بیش از آن‌که با خود بیماری مرتبط باشد، می‌تواند با الگو یا الگوهای خاصی از بروز بیماری به عنوان مثال تفاوت بیماران از نظر سن آنها در مقطع آغاز بیماری^۵ و یا وجود آنتی‌بادی‌های همراه با بیماری ارتباط نشان دهد.

از آنجا که تاثیر نهایی IFN- γ در ارتباط با بیماری دیابت و نیز سایر اختلالات خودایمنی متفاوت و گاه متضاد می‌باشد - که این اثر خود به عوامل متعددی همچون میزان و سطح کمی این سایتوکین التهابی، مکان و زمان حضور یا اثر آن و توالی مواجهه آن با بافت سلول پاسخ دهنده وابسته است [۲]، شاید نقش این پلی مورفیسم را تا آن حد که به عنوان یک عامل خطر مستقل^۶ نقش آفرین باشد، نتوان در نظر گرفت.

در خصوص مطالعاتی که وجود همراهی بین پلی مورفیسم این ژن در موقعیت مشابه و دیابت نوع ۱ را گزارش نموده‌اند [۱۳، ۱۴]، چند نکته قابل توجه است. در مطالعه بیماری‌های کمپلکس که دیابت نوع ۱ نیز یکی از آنهاست، در بسیاری از موارد گزارش‌های اولیه ای که وجود یک همراهی را نشان داده اند، عملاً با گزارش عدم همراهی در مطالعات بعدی نقض می‌گردند. به عنوان مثال علاوه بر مطالعه حاضر، دو مطالعه مستقل دیگر نیز وجود این همراهی را نفی نموده‌اند [۱۶، ۱۷]. این تناقض در نتایج علاوه بر آنکه می‌تواند به ملاحظات متدولوژیک و عوامل مخدوش کننده^۷، از جمله انتخاب نمونه‌ها از افرادی غیر از نژاد اصلی جمعیت مورد نظر^۸ قابل انتساب باشد، می‌تواند ناشی از زیرساخت سیال و هتروژن بیماری‌های کمپلکس از نظر ژنتیکی نیز باشد. تکرار ناپذیری^۹ یافته‌های مربوط به این مطالعات یکی از مشکلات و موانع تحقیقات در این زمینه است. یکی از علل این تکرار ناپذیری و تفاوت در نتایج بدست آمده آن است که پلی مورفیسم (های) اصلی و مؤثر در ایجاد دیابت نوع ۱ در

⁴ Clinical Heterogeneity

⁵ Age at the onset

⁶ Independent Risk Factor

⁷ Confounder Issues

⁸ Population Admixture

⁹ Irreproducibility

¹ Linkage Disequilibrium

² Less Frequent allele

³ Power

یافته های ما نشان می دهد که بین پلی مورفیسم ژن IFN- γ در موقعیت +874*T/A و بیماری دیابت نوع یک رابطه معناداری از نظر آماری وجود ندارد. با وجود آنکه مطالعات مشابهی وجود همراهی بین پلی مورفیسم های این ژن چه در موقعیت مشابه و یا موقعیت های دیگر را با بیماری مذکور نشان داده اند، ولی نظر به عدم وجود یک رابطه مشخص و قابل پیش بینی بین ژنوتیپ و فنوتایپ در بیماری های کمپلکس این تفاوت قابل توجه می باشد. البته این شکنندگی و عدم ثبات در رابطه ژنوتیپ - فنوتایپ در بیماری های کمپلکس از اهمیت و ضرورت انجام چنین مطالعاتی با توجه به بار این بیماری ها و هزینه های مالی و انسانی آنها نمی کاهد.

سپاسگزاری

حمایت مالی این مطالعه توسط دانشگاه منچستر انگلستان و انجمن ایمونولوژی بریتانیا (BSI) صورت گرفته است.

گزارش های قبلی خود آن پلی مورفیسم های مورد بررسی نبوده اند و در اصل پلی مورفیسم (های) دیگری (یا در داخل ژن IFN- γ یا در ساختمان ژنهای مجاور) علت این همراهی بوده اند که با پلی مورفیسم مورد مطالعه در پیوستگی ترجیحی (LD) هستند. لذا اگر در یک جمعیت و یا نژادی بواسطه تغییرات ساختمانی ژنتیکی این الگوی LD بین نشانگر (پلی مورفیسم) مورد بررسی و آن پلی مورفیسم مؤثر برقرار نباشد، نمی توان انتظار داشت که آن همراهی گزارش شده قبلی مجدداً تکرار گردد.

در یک نگاه کلان و در رابطه با مطالعات مشابهی که به بررسی نقش یک پلی مورفیسم مشخص در یک بیماری مشخص می پردازند، این نکته را هم نباید از نظر دور داشت که اکثر این دسته از مطالعات منجر به یافته های منفی (عدم همراهی) می گردند ولی به علت آنکه شانس برابری را جهت انتشار در مجلات علمی ندارند، عملاً در مقالات منعکس نمی شوند (Under-representation of Negative Results).

مآخذ

- Naji A, Silvers WK, Barker CF. Cell-mediated immunity in type I (insulin-dependent) diabetes of man and the BB rat. *Concepts Immunopathol* 1985;2:32-46.
- Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998;14:129-51.
- Trucco M, Dorman JS. Immunogenetics of insulin-dependent diabetes mellitus in humans. *Crit Rev Immunol* 1989;9:201-45.
- del Guercio P. Susceptibility to diabetes and the major histocompatibility complex: the 57th residue affair. *Diabet Med* 1992;9:330-4.
- Von Herrath MG, Oldstone MBA. Interferone- γ is essential for destruction of β cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1997;185:531.
- Wang B, Andre I, Gonzalez A, Katz JD, Aguet M, Benoist C, Mathis D. Interferon- γ impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:13844-13849.
- Huang X, Yuan J, Goddard A, Foulis A, James RFL, Lernmark A, Pujol-Borrell R, Rabinovitch A, Somoza N, Stewart TA. Interferon expression in the pancreas of patient with type I diabetes. *Diabetes* 1995;44:658-664.
- Babaya N, Nakayama M, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:194-204.
- Kolb H. Benign versus destructive insulinitis. *Diabetes Metab Rev* 1997; 13:139-46.
- Savinov AY, Wong FS, Chervovsky AV. IFN-gamma affects homing of diabetogenic T cells. *J Immunol* 2001;167:6637-43.
- de Maeyer E, de Maeyer-Guignard J: Interferon-Gamma. In: *Cytokines*. 1st ed. Mire-Sluis A, Thorpe R, Eds. Academic Press, 1998, p. 391-400.
- Jahromi MM, Eisenbarth GS. Genetic determinants of type 1 diabetes across populations. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1079:289-99.
- Awata T, Matsumoto C, Urakami T, Hagura R, Amemiya S, Kanazawa Y. Association of polymorphism in the interferon gamma gene with IDDM. *Diabetologia* 1994;37:1159-62.
- Jahromi M, Millward A, Demaine A. A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20:187-90.
- Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high

- IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61:863-6.
16. Pociot F, Veijola R, Johannesen J, Hansen PM, Lorenzen T, Karlsen AE, Reijonen H, Knip M, Nerup J. Analysis of an interferon-gamma gene (IFNG) polymorphism in Danish and Finnish insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients and control subjects. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17:87-93.
17. Tegoshi H, Hasegawa G, Obayashi H, Nakano K, Kitagawa Y, Fukui M, Matsuo S, Deguchi M, Ohta M, Nishimura M, Nakamura N, Yoshikawa T. Polymorphisms of interferon-gamma gene CA-repeat and interleukin-10 promoter region (-592A/C) in Japanese type I diabetes. *Hum Immunol* 2002;63:121-8.