

Evaluating the association of CCR5-d32 mutation with type 2 diabetes in Rafsanjanese patients

Kazemi Arababadi M^{1*}, Naghavi N², Hassanshahi G¹, Sajadi M³

1- Molecular Medicine Research Center, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

2- Department of Microbiology, Immunology and Hematology, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

3- Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Received May 17, 2008; Accepted September 21, 2009

Abstract:

Background: Although type-2 mellitus diabetes is the most common type of diabetes, it's main cause yet to be identified. Chemokines and their receptors are probable effective systems on diabetes. CCR5 is a chemokine receptor playing an important role in immune responses. Studies showed that the known δ32 mutation in CCR5 gene leads to disorder in the expression and function of this receptor. Hence, this project aimed to analyze the known δ32 mutation in CCR5 chemokine receptor.

Materials and methods: Blood samples were collected from 200 type 2 diabetic patients and 300 healthy adult controls on EDTA pre-coated tubes. DNA was extracted using commercial kit. DNA samples were analyzed for δ32 mutation by Gap-PCR in diabetic patients in compared to controls. The demographic information were collected through questionnaire.

Results: Our results showed that none of the diabetic patients displayed CCR5 δ32 mutation. While 2 out of 300 healthy controls had heterozygotic form of this mutation. Statistical analysis didn't show any significant difference between the two groups.

Conclusion: Several different studies analyzed the relation of this mutation with different types of diseases including diabetes. All studies failed to find a relation between this mutation and type 2 diabetes. Since

these studies were performed in different geographical points and races, we studied this mutation in Rafsanjanese population. Based on the results of our study it could be probably concluded that this mutation does not play a key role in the establishment of type 2 diabetes.

Keywords: Diabetes Mellitus, Type2; Receptors, CCR5; mutation

* Corresponding Author.

Email: kazemim@modares.ac.ir

Tel: 0098 913 292 6113

Fax: 0098 391 522 5209

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Autumn 2009; Vol 13, No 3, Pages 208-213

بررسی همراهی جهش CCR5-d32 با دیابت نوع دو در افراد مبتلا به این بیماری در شهرستان رفسنجان

محمد کاظمی عرب آبادی^{۱*}، نیما نقوی^۲، غلامحسین حسن شاهی^۱، سید محمد علی سجادی^۳

خلاصه

سابقه و هدف: در حالی که دیابت شیرین نوع ۲ شایع‌ترین نوع دیابت‌هاست، اما علت اصلی ایجاد آن هنوز ناشناخته است. از جمله موارد احتمالی اثر گذار بر دیابت، برهم کنش سیستم کموکین‌ها و گیرنده‌های آنها می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که جهش ۸۳۲ در ژن گیرنده CCR5 منجر به اختلال در بیان و عملکرد این گیرنده می‌شود. در این مطالعه به بررسی جهش شناخته شده ۸۳۲ در ژن CCR5 در بیماران دیابتی نوع ۲ می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها: به منظور انجام این مطالعه به صورت مورد-شاهدی، نمونه خون محیطی از ۲۰۰ بیمار دیابتی نوع ۲ و ۳۰۰ فرد سالم در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع آوری شد. نمونه DNA بیماران از نظر وجود جهش ۸۳۲ با کمک تکنیک Gap-PCR بررسی شد و با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج: بررسی‌ها در این جمعیت نشان داد که هیچ کدام از بیماران دیابتی نوع ۲ مورد مطالعه دارای جهش ۸۳۲ CCR5 نبودند. این در حالی است که تنها ۲ نفر از افراد سالم گروه کنترل دارای این جهش در ژن CCR5 خود بودند. بررسی‌های آماری هیچ‌گونه ارتباطی بین این جهش و بیماری دیابت نوع ۲ را نشان نداد.

نتیجه گیری: با توجه به این مطلب در اکثر قریب به اتفاق مطالعات انجام شده رابطه آماری بین ایجاد این نوع جهش و وقوع دیابت نوع ۲ پیدا نشده است و در مطالعه حاضر نیز چنین رابطه‌ای یافت نشد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که به احتمال بسیار زیاد این جهش در ایجاد دیابت نوع ۲ نقشی ندارد.

وازگان کلیدی: دیابت شیرین نوع ۲، گیرنده CCR5، جهش

۱- استادیار مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۲- پزشک عمومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۳- استادیار گروه میکروبیولوژی ایمونولوژی و هماتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

* نویسنده مسؤول: محمد کاظمی عرب آبادی

آدرس: رفسنجان، میدان انقلاب، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی

پست الکترونیک: kazemim@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۳

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۸/۵/۳۱

تلفن: ۰۹۱۳ ۲۹۲ ۶۱۱۳

دورنويis: ۰۳۹۱ ۵۲۲ ۵۰۰۹

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره سیزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، صفحات ۲۱۳-۲۰۸

موجود در سیستم اینمی این افراد با افراد سالم از جمله اهداف محققین در این زمینه می‌باشد [۳]. یکی از عوامل سیستم اینمی که امروزه توجه خاصی به عملکرد آنها می‌شود، کموکین‌ها و گیرنده‌های آنها می‌باشد [۲]. از جمله کموکین‌های مهم که محققین زیادی به اثر مهم آنها در طی پاسخ‌های اینمی پی‌برده‌اند، کموکین‌های CCL5 (RANTES) و CCL4 (MIP-1 β)، CCL3 (MIP-1 α) می‌باشند [۲]. این کموکین‌ها اعمال خود را از طریق گیرنده CCR5

مقدمه

دیابت یکی از مشکلات حال حاضر دنیای امروز می‌باشد [۱]. در این بین دیابت شیرین نوع ۲ شایع‌ترین فرم محققین عوامل رئنیکی و محیطی زیادی را در ایجاد این بیماری دخیل می‌دانند که از مهمترین آنها می‌توان عوامل مربوط به سیستم اینمی را نام برد [۲]. برخی محققین بر این عقیده هستند که دیابت نوع ۲ شاید نوعی بیماری خود اینمی بوده [۴,۳]، لذا بررسی تفاوت‌های

و آلرژی بودند و سیگار نمی‌کشیدند.

استخراج DNA ژنومی

نمونه مورد بررسی در این بیماران و گروه کنترل، خون محیطی بود که با ماده ضد انقاد EDTA مخلوط شده بود. DNA ژنومی افراد مورد بررسی از نمونه‌های خون محیطی و توسط کیت‌های استخراج DNA از شرکت Pioneer ساخت کشور انگلستان، مطابق با دستور العمل موجود، استخراج و در ویال‌های جداگانه تقسیم بندی شد و در دمای -20°C تا زمان انجام آزمایشات PCR نگهداری شدند.

واکنش Gap-PCR

به منظور بررسی وجود CCR5 ۳۲ bp پرایمرها به گونه‌ای طراحی شدند که ناحیه حذف شده مورد نظر را به طور کامل دربر داشته باشند. بنابراین بر اساس اندازه قطعه مورد نظر می‌توان به وجود جهش در این ناحیه پی برد. پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه یک قطعه ۱۸۸ bp را در نوع وحشی (بدون جهش) تکثیر می‌کردند و وجود محصول PCR با اندازه ۱۵۶ bp نشان دهنده وجود ۳۲ bp در ژن مورد نظر خواهد بود. توالی پرایمرها به این صورت بود:

F: ۵'-CAAAAAGAAGGTCTTCATTACACC-۳'
R: ۵'-CCTGTGCCTCTTCTCATTTCG-۳'

PCR در حجم ۲۰ μl انجام شد که شامل این موارد بود: PCR در حجم ۱۰ میلی مولار، $1/5$ میلی مولار، ژلاتین ۱ درصد، ۲۰۰ میکرومول از هر $0.6 \mu\text{M}$, dNTP از هر پرایمر، ۵۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده به همراه آنزیم واحد آنزیم Taq polymerase نوترکیب برای انجام PCR ابتدا یک سیکل به ترتیب رویه رو انجام می‌شد: 94°C به مدت ۱ دقیقه، 58.5°C به مدت ۴۰ ثانیه، 72°C به مدت ۴۰ ثانیه و سپس ۳۵ سیکل با ترتیب مقابل انجام می‌شد: 94°C به مدت ۴۰ ثانیه، 58.5°C به مدت ۴۰ ثانیه، 72°C به مدت ۴۰ ثانیه. برای الکتروفورز ابتدا یک ژل آگارز ۲ درصد به همراه اتیدیوم بروماید درست شد. سپس محصول PCR به همراه ۵۰ bp ladder به همراه الکتروفورز قرار گرفت. تمام مواد فوق از شرکت سیناژن تهیه شدند.

آنالیز آماری: نتایج با آزمون‌های t و مجدور کای و با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

در طول این تحقیق تعداد ۲۰۰ نفر از بیماران دیابتی و نیز ۳۰۰ نفر از افراد سالم از نظر جهش ۸۳۲ مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سن افراد در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب 40 ± 9 و

انجام می‌دهند [۵]. این گیرنده مذکور جزء گیرنده‌های متصل شونده با G پروتئین‌ها (G protein coupled receptor: GPCR) می‌باشد که عمل خود یعنی انتقال سیگナル به داخل سلول را نیز به کمک همین مولکول‌ها انجام می‌دهد [۶]. این گیرنده بر سطح زیر گروه‌هایی از لنفوцит‌ها (لنفوцит‌های T CD8⁺ و NK Cells) در ایجاد کموتاكسی و رسیده مکروفاژ/مونوسیت‌ها و حتی بر سطح سلول‌های غیر ایمنی مثل فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتیال و در مناطق غیر التهابی نیز بیان می‌شود [۷]. به نظر می‌رسد که CCR5 در ایجاد کموتاكسی و رسیده سلول‌های صلاحیت‌دار ایمنی به محل‌های التهابی نقش عمده و وسیعی دارد؛ به گونه‌ای که مطالعات متعددی نیز این مطلب را تایید می‌کنند [۵]. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که یک جهش در تنها اگزون ژن CCR5 و متعاقباً حذف ۳۲ نوکلوتید (۳۲) از این ناحیه منجر به بیان کاهش یافته و غیر عملکردی این مولکول بر سطح سلول‌های این افراد می‌شود [۹۸]. در برخی جوامع این جهش به صورت پلی مورفیسم در آمده است [۱۱، ۱۰]. بنابراین به نظر می‌رسد که وجود این جهش به علت عمل تعديل کنندگی که در بیماری‌های خودایمنی دارد [۱۲]. می‌تواند در جلوگیری از ایجاد دیابت نقش داشته باشد. مطالعات مختلفی به بررسی این جهش با انواع بیماری‌ها از جمله دیابت پرداخته‌اند؛ اما از آنجایی که این مطالعات در مناطق جغرافیایی و نژادی متفاوت از کشور ما به انجام رسیده است، ما نیز تصمیم گرفیم تا به بررسی این جهش در بیماران دیابتی نوع ۲ شهرستان رفسنجان پردازیم.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

این مطالعه به صورت مورد شاهدی طراحی و انجام شد. در طی این مطالعه، نمونه خون محیطی از ۲۰۰ بیمار دیابتی نوع ۲ (قند خون ناشتاوی بالای 150 mg/ml در دو نوبت) و ۳۰۰ نفر از افراد غیر دیابتی (قند خون پایین تر از 100 mg/ml در دو نوبت) در لوله‌های حاوی ماده ضد انقاد EDTA جمع آوری شد. انتخاب بیماران به صورت تصادفی (خوشبایی چند مرحله‌ای) از بین مراجعه کنندگان به کلینیک دیابت علی ابن ابی طالب (ع) شهر رفسنجان صورت گرفت. بیماران به گونه‌ای انتخاب شدند که دیابت آنها کنترل شده بود (با اندازه گیری HbA1c توسط کلینیک دیابت) و فقط تحت درمان دارویی بودند (اتسولین دریافت نمی‌کردند). نمونه‌گیری با تفہیم کامل مبنی بر تحقیقاتی بودن نمونه گیری و با کسب رضایت کتبی از افراد انجام شد. دو گروه به گونه‌ای انتخاب شدند که عوامل مخدوش کننده به طور کامل حذف شوند؛ مثلاً دو گروه عاری از تمام علائم بیماری‌های عغونی

کای نشان می‌دهد که این اختلاف‌ها از نظر آماری معنی‌دار نیستند ($P=0.21$). به علاوه نسبت افراد دو گروه در طبقات اجتماعی بر اساس میزان درآمد ماهانه نیز اختلاف معنی‌دار آماری نداشته است ($P=0.14$) (جدول شماره ۱).

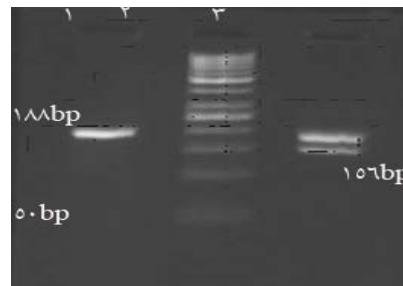
۴۰±۸ سال بوده است. آزمون آماری t هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را در بین دو گروه از نظر سن نشان نداد ($P=0.34$). تعداد ۱۸۰ (۶۰ درصد) نفر از گروه شاهد، زن و تعداد ۱۲۰ (۴۰ درصد) نفر، مرد بوده‌اند. این نسبت‌ها به ترتیب در گروه مورد برابر ۱۲۱ (۶۰/۵ درصد) نفر و ۷۹ (۳۹/۵ درصد) نفر بوده‌اند. آزمون آماری مجذور درصد) نفر و ۷۹ (۳۹/۵ درصد) نفر بوده‌اند. آزمون آماری مجذور

جدول شماره ۱- مقایسه افراد شرکت کننده در مطالعه از نظر سن، جنس و سطح درآمد ماهانه

متغیرها		گروه‌های مورد مطالعه	
		سالم	بیمار
	$P=0.34$	40 ± 8	40 ± 9
سن			
	$P=0.21$	(٪/۶۰/۵) ۱۲۱	(٪/۶۰) ۱۸۰
جنس		(٪/۳۹/۵) ۷۹	(٪/۴۰) ۱۲۰
		(٪/۲۲) ۴۴	(٪/۲۴) ۷۲
سطح درآمد	$P=0.14$	(٪/۴۹) ۹۸	(٪/۴۴) ۱۳۲
		(٪/۲۹) ۵۸	(٪/۳۲) ۹۶
		ضعیف (زیر ۲۰۰ هزار تومان)	متوسط (۲۰۰-۶۰۰ هزار تومان)
		بالا (بالاتر از ۶۰۰ هزار تومان)	

طریق گیرنده CCR5 جهت انجام اعمال خود استفاده می‌کنند [۱۴]. بنابراین، میزان بیان این گیرنده بر عملکرد سیستم ایمنی تاثیرگذار خواهد بود. از جمله مواردی که منجر به کاهش بیان این گیرنده می‌شود، جهش 832 است [۱۰, ۹]. در طی این جهش تعداد ۳۲ جفت باز از اگزون یک ژن CCR5 حذف شده و متعاقب آن میزان بیان این گیرنده به میزان زیادی کاهش می‌یابد [۱۰, ۹]. ما در این مطالعه به بررسی وجود جهش 832 در بیماران دیابتی نوع ۲ 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. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که بین دو گروه مورد و شاهد از نظر وجود جهش 832 اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد. با مطالعه تحقیقات گذشته می‌توان به این نکته دست یافت که اگر چه اکثر محققین به وجود این جهش در بین بیماران دیابتی پی برده بودند، اما در هیچ یک از مطالعات اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مورد و شاهد مشاهده نشد. با مطالعه‌ای که Kalev و همکاران روی ۳۸ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۱ و ۱۱۱ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ انجام دادند، دریافتند که هیچ‌گونه اختلافی بین بیماران و گروه کنترل از نظر وجود جهش 832 وجود ندارد [۱۵]. مطالعه اخیر ما بر روی بیماران دیابتی نوع ۲ مبتلا به نفوropاتی نیز نشان داد که هیچ یک از بیماران دارای جهش 832 در ژن CCR5 نبودند [۱۶]. بر اساس اطلاعات موجود، مطالعه دیگری که به بررسی این جهش در بیماران دیابتی نوع ۲ پرداخته باشد، وجود ندارد. Gamberlunghe و همکاران با مطالعه ۱۱۶ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۱ به همراه ۱۲۷ فرد سالم نیز نتوانستند اختلافی بین

نتایج حاصل از بررسی جهش 832 در دو گروه نشان داد که هیچ-کدام از بیماران مورد بررسی دارای جهش 832 در ژن CCR5 خود نبودند. این در حالی است که تنها ۲ نفر از افراد سالم گروه کنترل دارای فرم هتروزایگوت این جهش بودند. آزمون‌های آماری هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان نداد. نتایج حاصل از این مطالعه در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.



شکل شماره ۱- نمونه‌ای از نتایج تکثیر ژن CCR5. ستون ۱، تکثیر ژن CCR5 بدون ۸۳۲ را نشان می‌دهد (قطعه ۱۸۸ bp)، ستون ۲ و ستون ۳، محصول PCR که حاوی هر دو قطعه (هتروزایگوت) ۱۸۸ bp و ۱۵۶ bp (حاوی جهش ۸۳۲) را نشان می‌دهد.

بحث

به عقیده بسیاری از محققین عوامل مربوط به سیستم ایمنی سهم عظیمی در ایجاد دیابت نوع ۲ دارند [۱]. از جمله عواملی که موجب جهت گیری سیستم ایمنی و پاسخ‌های آن می‌شوند کموکین‌ها می‌باشند [۱۳]. کموکین‌های مهم که نقش موثری در بسیج سلول‌های ایمنی و فعال‌سازی آنها دارند RANTES، MIP- β و MIP- α را می‌توان نام برد [۱۴]. این سه کموکین از

دیگری مثل چند شکلی‌های ژنی موجود در ژن‌های سایتوکین‌های این دسته بیماران و دیگر ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی پردازند.

نتیجه گیری

به طور کلی با توجه به تمامی مطالعات انجام شده در این زمینه و همچنین نتایج حاصل از بررسی ما به نظر می‌رسد که این فرضیه که جهش ۵۳۲ با ایجاد دیابت در ارتباط می‌باشد، مورد تایید نمی‌باشد.

بیماران دیابتی و گروه سالم پیدا کنند [۱۷]. مطالعه Yang و همکاران که روی ۲۶۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۱ و ۱۰۴ فرد سالم انجام شده است نیز نتایج یکسانی با مطالعات ذکر شده داشت؛ به گونه‌ای که آنها نیز به هیچ‌گونه اختلافی دست پیدا نکردند [۱۸]. نتایج مطالعات دیگر محققین که به بررسی افزایش ییان CCR5 موجود سطح سلول‌های تک هسته‌ای خون پرداخته‌اند نیز بر این ادعا صحه می‌گذارند که ارتباطی بین وجود جهش ۵۳۲ و وقوع بیماری دیابت وجود ندارد [۱۹، ۱۳]. نویسنده‌گان این مقاله پیشنهاد می‌کنند دیگر محققین بهتر است به بررسی تفاوت‌های ژنتیکی

References:

- [1] Nathanson D, Nystrom T. Hypoglycemic pharmacological treatment of type 2 diabetes: Targeting the endothelium. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 297(1-2): 112-26.
- [2] Karam JG, McFarlane SI. Prevention of type 2 DM: implications for adolescents and young adults. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008; 5 Suppl 4: 980-8.
- [3] Arababadi MK, Pourfathollah AA, Daneshmandi S, Hassanshahi G, Zarandi ER, Shamsizadeh A, Rezaei MA, Eigder S. Evaluation of relation between IL-4 and IFN-g polymorphisms and type 2 diabetes. *IJBMS* 2009; 12(2): 100-4.
- [4] Arababadi MK, Nosratabadi R, Hassanshahi G, Yaghini N, Pooladvand V, Shamsizadeh A. Nephropatic complication of type-2 diabetes is following pattern of autoimmune diseases? *Diabetes Res Clin Pr* 2009; article in press.
- [5] Kasama T, Yajima N, Matsukura S, Adachi M. Macrophage inflammatory protein 1 and CCR5 as attractive therapeutic targets for HIV infection. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2006; 1(3): 275-80.
- [6] Gamo K, Kiryu-Seo S, Konishi H, Aoki S, Matsushima K, Wada K, et al. G-protein-coupled receptor screen reveals a role for chemokine receptor CCR5 in suppressing microglial neurotoxicity. *J Neurosci* 2008; 28(46): 11980-8.
- [7] Balistreri CR, Caruso C, Grimaldi MP, Listi F, Vasto S, Orlando V, et al. CCR5 receptor: biologic and genetic implications in age-related diseases. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1100: 162-72.
- [8] Ungvari I, Tolgyesi G, Semsei AF, Nagy A, Radosits K, Keszei M, et al. CCR5 Delta 32 mutation, Mycoplasma pneumoniae infection, and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(6): 1545-7.
- [9] Chalmet K, Van Wanzele F, Demecheler E, Dauwe K, Pelgrom J, Van Der Gucht B, et al. Impact of Delta 32-CCR5 heterozygosity on HIV-1 genetic evolution and variability--a study of 4 individuals infected with closely related HIV-1 strains. *Virology* 2008; 379(2): 213-22.
- [10] Ruiz-Ferrer M, Barroso N, Antinolo G, Aguilar-Reina J. Analysis of CCR5-Delta 32 and CCR2-V64I polymorphisms in a cohort of Spanish HCV patients using real-time polymerase chain reaction and fluorescence resonance energy transfer technologies. *J Viral Hepat* 2004; 11(4): 319-23.
- [11] Zheng B, Wiklund F, Gharizadeh B, Sadat M, Gambelunghe G, Hallmans G, et al. Genetic polymorphism of chemokine receptors CCR2 and CCR5 in Swedish cervical cancer patients. *Anticancer Res* 2006; 26(5B): 3669-74.
- [12] Favorova OO, Andreevski TV, Boiko AN, Sudomoina MA, Alekseenkov AD, Kulakova OG, et al. The chemokine receptor CCR5 deletion mutation is associated with MS in HLA-DR4-positive Russians. *Neurology* 2002; 59(10): 1652-5.
- [13] Bogdanski P, Pupek-Musialik D, Dytfeld J, Jagodzinski PP, Jablecka A, Kujawa A, et al. Influence of insulin therapy on expression of chemokine receptor CCR5 and selected inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2007; 45(10): 563-7.
- [14] Herder C, Illig T, Baumert J, Muller M, Klopp N, Khuseyinova N, et al. RANTES/CCL5 gene polymorphisms, serum concentrations, and incident type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Eur J Endocrinol* 2008; 158(5): R1-5.
- [15] Kalev I, Oselin K, Parlist P, Zilmer M, Rajasalu T, Podar T, et al. CC-chemokine receptor CCR5-del32 mutation as a modifying pathogenetic factor in type I diabetes. *J Diabetes Complications* 2003; 17(6): 387-91.
- [16] Arababadi MK, Naghavi N, Hassanshahi G, Mahmoodi M. Is CCR5-Delta32 mutation associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes? *Ann Saudi Med* 2009; 29(5): 413.

- [17] Gambelunghe G, Ghaderi M, Brozzetti A, Del Sindaco P, Gharizadeh B, Nyren P, et al. Lack of association of CCR2-64I and CCR5-Delta 32 with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. *Hum Immunol* 2003; 64(6): 629-32.
- [18] Yang B, Houlberg K, Millward A, Demaine A. Polymorphisms of chemokine and chemokine receptor genes in Type 1 diabetes mellitus and its complications. *Cytokine* 2004; 26(3): 114-21.
- [19] Dytfeld J, Bogdański P, Pupek-Musialik D, Jagodziński PP, Bryl W, Kujawa A. [Expression of chemokine receptor CCR5 in patients with type 2 diabetes]. *Pol Merkur Lekarski* 2006; 20(116): 195-8.