

## The Association of Functional Polymorphisms of IL-6 Gene Promoter with Stroke: Analysis in a Persian Population

Mohammad Reza Ghasemi<sup>1</sup>, Peyman Zargari<sup>2</sup>, Hamdam Hourfar<sup>3</sup>, Maryam Pirhoushiaran<sup>1</sup>, Payam Sasan Nezhad<sup>4</sup>, Mahmoud Reza Azarpazhooh<sup>4</sup>, Ariane Sadr-Nabavi<sup>5, 1, 6\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Genetics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>2</sup>Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

<sup>4</sup>Department of Neurology, Ghaem Hospital, Mashhad, Iran

<sup>5</sup>Medical Genetic Research Center (MGRC), School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>6</sup>Academic Center for Education, Culture, and Research (ACECR)-Khorasan Razavi, Mashhad, Iran

### Article Info:

Received: 6 Jun 2016

Revised: 15 Jun 2017

Accepted: 29 Jun 2017

## ABSTRACT

**Introduction:** Sequence variations in genes involved in inflammation system contribute to the risk of several cardiovascular diseases, such as stroke. Interleukin-6, a pleiotropic cytokine, is associated with cardiovascular disease, especially stroke. In other words, cerebral ischemia and inflammation are strongly linked. In the present study, we performed a genetic association study on two single nucleotide polymorphisms (IL6 -572 and -174 G>C) in an Iranian population in Khorasan province. **Materials and Methods:** Our hypothesis was tested in this case-control study on stroke patients as well as healthy controls that matched for age, sex, and some traditional risk factors. These polymorphisms were detected by Real time Taq man probe and PCR-RFLP. **Results:** After adjustment for the confounding risk factors, there was an association between the female patients who suffer from stroke and the IL-6 -572 G>C polymorphism and also Hemorrhagic subtype of stroke. Furthermore, there was no association between IL-6 -174 G>C and stroke, except one allele in male group. **Conclusion:** In conclusion, genotype of IL-6 -572 G>C May be a genetics risk factor that enhances the risk for stroke in studied population. However, it is highly controversial whether IL-6 -174 G>C is a susceptible gene for stroke in this population. This is needed to be confirmed in a larger population.

### Key words:

1. Stroke
2. Inflammation
3. Polymerase Chain Reaction

\*Corresponding Author: Ariane Sadr-Nabavi

E-mail: sadrnabavia2009@gmail.com

## همبستگی بین پلیمورفیسم‌های عملکردی پرموتور ژن اینترلوکین-۶ و سکته مغزی: تجزیه و تحلیل در بین یک جمعیت ایرانی

محمد رضا قاسمی<sup>۱</sup>، پیمان زرگری<sup>۲</sup>، همدم هورفر<sup>۳</sup>، مریم پیرهوشیاران<sup>۴</sup>، پیام ساسان نژاد<sup>۵</sup>، محمود رضا آذرپژوه<sup>۶</sup>، آریانه صدرنبوی<sup>\*۷،۸</sup>

<sup>۱</sup>گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۲</sup>گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۳</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

<sup>۴</sup>گروه نورولوژی، بیمارستان قائم، مشهد، ایران

<sup>۵</sup>مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۶</sup>جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

### اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۸ تیر ۱۳۹۶

اصلاحیه: ۲۵ خرداد ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۷ خرداد ۱۳۹۶

## چکیده

**مقدمه:** واریانت‌های توالی در ژن‌هایی که درگیر در سیستم التهاب هستند به خطر ابتلا به برخی از بیماری‌های قلبی-عروقی مانند سکته مغزی کمک می‌کنند. اینترلوکین-۶-یک سایتوکین پلیوتrop با بیماری‌های قلبی-عروقی مخصوصاً سکته مغزی در ارتباط است. به عبارت دیگر، ایسکمیک مغزی و التهاب بهشت با هم ارتباط دارند. در مطالعه حاضر یک مطالعه همبستگی ژنتیکی روی دو پلیمورفیسم تک نوکلئوتیدی (IL6-174 G>C) در یک جمعیت ایرانی در استان خراسان انجام دادیم. مواد و روش‌ها: فرضیه‌ما در این مطالعه مورد شاهدی بر روی بیماران سکته مغزی و کنترل‌های سالم که برای سن، جنس و برخی عوامل خطر کلاسیک انطباق یافته بودند، آزمایش شد. این پلیمورفیسم‌ها توسط روش Real Time PCR-RFLP و Taq Man Probe تشخیص داده شدند. یافته‌ها: پس از تعدیل عوامل خطر مخدوش‌کننده، همبستگی بین زنان بیماری که از سکته مغزی رنج می‌برند و پلیمورفیسم IL-6-572 G>C و همچنین زیرگروه هموارژیک سکته مغزی وجود داشت. علاوه بر این بین IL-6-174 G>C و سکته مغزی، بجز یکی از آلل‌ها در گروه مردان همبستگی وجود نداشت. نتیجه‌گیری: در نتیجه ژنتیپ IL-6-572 G>C ممکن است یک عامل خطر ژنتیکی باشد که خطر ابتلا به سکته مغزی در جمعیت مورد مطالعه را افزایش می‌دهد. با این وجود این خیلی بحث‌برانگیز است که آیا IL-6-174 G>C یک ژن حساس برای سکته مغزی در این جمعیت است. این مورد نیاز به تأیید در یک جمعیت بزرگ‌تر است.

### کلید واژه‌ها:

- ۱. سکته مغزی
- ۲. التهاب
- ۳. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

\* نویسنده مسئول: آریانه صدرنبوی

آدرس الکترونیکی: sadrnabavia2009@gmail.com

## مقدمه

اینترلوکین ۶ (IL-6) یکی از سایتوکین‌های التهابی پلیوتروپیک است که با تصلب شریان و بیماری‌های قلبی-عروقی همبستگی نشان داده است. همچنین ممکن است یک میانجی کلیدی در پاسخ التهابی به ایسکمی مغزی باشد. سطح IL-6 هم در سرم و هم در مایع مغزی نخاعی پس از سکته مغزی ایسکمیک افزایش می‌یابد، بنابراین با شدت سکته مغزی، با بدتر شدن اولیه اعصاب، حجم بزرگ‌تر نهایی سکته مغزی و نتایج بالینی بدتر در ۳، ۶ و ۱۲ ماه ارتباط مستقیم دارد (۸، ۹).

ژن IL-6 از ۵ اگزون، ۴ اینتررون و یک منطقه پروگزیمال پرومومتر است که واقع در لوکوس کروموزومی 7p21 در انسان می‌باشد (۱۰). مناطق کدینگ پرومومتر ژن IL-6 دارای پلیمورفیسم عملکردی می‌باشد که با افزایش سطح پلاسمایی این سایتوکین در ارتباط است. اگر موقعیت ۱۷۴-از ژن IL-6 تحت تغییر G به C قرار بگیرد، یک سایت بالقوه اتصال برای عامل رونویسی NF-1 ایجاد می‌گردد که باعث مهار بیان ژن می‌شود. از سوی دیگر، آلل G با سطح بالاتر IL-6 گردشی در ارتباط است (۱۱). مکان پلیمورفیسمی دیگری در ۵۷۲-این ژن فعالیت پرومومتر را تحت تأثیر قرار می‌دهد که به نظر می‌آید به جهت کنترل اثر پلیمورفیسم در موقعیت ۱۷۴-است (۱۲).

به امید پیدا کردن اطلاعات جدید و دلایل منطقی از بروز زودتر و پایین‌تر سکته مغزی در شمال شرق ایران که در مطالعات قبل اثبات شده بود (۱۳-۱۵) مابر روی این دو پلیمورفیسم عملکردی این ژن حیاتی که میانجی گر التهاب است در این مطالعه تمرکز کردیم.

## مواد و روش‌ها

## جامعه مورد مطالعه

روش‌های انتخاب بیمار با توجه به مورد شاهدی بودن مطالعه گزیده شد. بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان قائم که مهم‌ترین مرکز مغز و اعصاب در شرق ایران می‌باشد، بین ماههای اسفند ۱۳۹۱ تا آذر ۱۳۹۲ انتخاب شدند. هر بیمار مشکوک به سکته مغزی توسط متخصصین مغز و اعصاب به جهت تأیید تشخیص بیماری مورد بررسی قرار می‌گرفت. به جهت طبقه‌بندی بیماران توسط سکته مغزی نخستین (FESS)<sup>۱</sup> که به زیر گروههای سکته مغزی ایسکمیک، گروههای خونریزی دهنده (ICH و SAH) و دیگر گروههای می‌شدند از تصویربرداری عصبی استفاده شد. علاوه بر این، طبقه‌بندی به زیر گروههای ایسکمیک و هموراژیک توسط توموگرافی کامپیوتربی (سی‌تی اسکن) و تصویربرداری رزونانس مغناطیسی

سکته مغزی یک اختلال چندعاملی پیچیده است که از علل مهم مرگ و ناتوانی در بزرگسالان در تمام جهان است (۱). در اطباق با پروزه سازمان جهانی بهداشت مونیکا<sup>۲</sup>، سکته مغزی به عنوان "توسعه سریع علایم بالینی متمرکز شده (یا عمومی) اختلال در عملکرد تعریف شده مغزی، به مدت بیش از ۲۴ ساعت (مگر اینکه با عمل جراحی یا مرگ قطع شود) و به غیر از یک منشأ عروقی هیچ علت ظاهری دیگری مشاهده نشود" (۳). همچنین، در یک تقسیم‌بندی بر اساس پاتولوژی، سکته مغزی در دو گروه ایسکمیک و هموراژیک تقسیم می‌شود (۴). در سکته مغزی ایسکمیک (IS)، جریان خون به بخشی از مغز که مسدود شده نمی‌رسد و در نتیجه در عملکرد بافت مغز اختلال ایجاد می‌شود. این واقعه وقتی که مثلاً یک آمویلی و یا موارد دیگر مانند انسداد و قطع جریان خون وریدی مغزی که احتمالاً منشأ چربی دارند اتفاق می‌افتد. سکته هموراژیک نیز ناشی از یک رگ خونی پاره شده در مغز است که یا به وسیله آنوریسم ایجاد می‌شود و یا تروما ثانویه که باعث به وجود آمدنش می‌شود. هنگامی که یک رگ پاره شده باشد، سلول‌های مغزی تأمین نخواهد شد، پس موجب انفارکتوس می‌شود (۵).

با این وجود پیشرفت‌های عالی در زمینه شناخت، پیشگیری و درمان سکته مغزی، بسیاری از عوامل ناشناخته در مورد دیگر مکانیسم‌های موجود که باعث ایجاد مشکلاتی در پیشگیری و درمان این بیماری می‌شوند وجود دارد. با وجود اینکه پروفایل ژنتیکی خود به تنها یک نقش مهمی در استعداد ابتلاء به سکته مغزی بازی می‌کند، عوامل خطر زیستمحیطی کلاسیک مانند فشار خون بالا، سن بالا، کلسیتروبل بالا، دیابت، سیگار کشیدن، چاقی و غیره نیز با عوامل ژنتیکی در سکته مغزی همراهی نشان می‌دهند (۶). اگرچه، مطالعات همبستگی یک ابزار قدرتمند برای شناسایی عوامل خطر ژنتیکی هستند، انتخاب روش مطالعه مناسب و تکرار نتایج، در گروههای کوهرت مستقل، موارد لازم برای اثبات رابطه علت و معلولی بین یک نشانگر ژنتیکی و سکته مغزی است (۷).

ایسکمی مغزی و التهاب به شدت با هم ارتباط دارند: محركی که به طور بالقوه برای التهاب مضر و عفونی است ایسکمی می‌باشد و التهاب همراه آن یک عامل خطر شناخته شده برای سکته مغزی ایسکمیک است. التهاب نیز به وقایع ایسکمیک از طریق ارتقاء آتروواسکلروز کمک می‌کند. پلیمورفیسم عملکردی ژن‌های التهابی ممکن است باعث احتمال بروز سکته مغزی ایسکمیک شود (۸).

<sup>1</sup> MONICA project<sup>2</sup> First-ever stroke

## تعیین ژنتیک

نمونه خون جهت استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی Prime Prep از گروه مورد و شاهد گرفته شد<sup>۴</sup>. با استفاده از DNA استخراج شده به عنوان الگو، انواع مختلف از واکنش‌های زنجیره‌ای PCR<sup>۵</sup> (PCR) انجام گرفت. برای پلی‌مورفیسم RFLP- IL-6-572 G>C<sup>۶</sup> به ترتیب از روش‌های SNP PCR, Real-Time PCR Taqman probe ها استفاده شد. اطلاعات دقیق در مورد شرایط PCR، پرایمرهای پروب توالی در جدول ۲ و ۳ خلاصه شده است.

(MRI)<sup>۳</sup> نیز انجام گرفت. تأیید موارد<sup>۴</sup> و اخلاق کار نیز بر طبق مطالعه آقای دکتر آذرپژوه و همکاران رعایت شد<sup>(۲)</sup>.

علاوه بر این، پایگاه داده‌های زنتیکی توسط گروه ما طراحی گردید که ۲۰۴ بیمار سکته مغزی ایزوله و ۲۲۲ فرد سالم غیر مرتبط با محدوده سنی ۲۰ تا ۷۰ که از همان منطقه جمعیتی بدون سابقه سکته مغزی بودند، انتخاب شدند. همچنین از نظر سن، جنسیت و برخی از عوامل خطر کلاسیک سکته مغزی با گروه بیماران منطبق<sup>۵</sup> شدند. جامعه مورد مطالعه (مورد شاهدی) و عوامل خطر در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱- اطلاعات جمعیت‌ساختی و پروفایل عوامل خطر در بیماران مبتلا به سکته مغزی و کنترل مربوطه برای پلی‌مورفیسم‌های IL-6 -572 G>C و IL-6 -174 G>C

IL-6 -572 G>C			IL-6 -174 G>C			فاکتورهای خطر مرسوم
بیمار ۲۰۱	کنترل ۲۰۱	ارزش P	بیمار ۲۰۳	کنترل ۲۱۲	ارزش P	
۵۱/۹±۱۳/۰	۵۰/۲±۱۱/۷	-/۱۸۹*	۵۱/۸۴±۱۳/۰	۵۰/۵±۱۲/۰	-/۲۷۲*	سن (mean ± SD)*
(۱۱۵/۸۶)	(۱۱۸/۸۳)	-/۷۶۲†	(۱۱۵/۸۸)	(۱۱۵/۹۷)	-/۶۲۲†	جنس (مرد / زن)
۵۷ (۲۸)	۴۵(۲۰)	-/۰۶۱†	۵۷ (۲۸/۱)	۴۵ (۲۱/۲)	-/۱۰۵†	دیابت شیرین (٪)
۱۲۷/۳±۳۴/۴	۱۲۱/۶±۳۲/۳	-/۱۱۵*	۱۲۷/۱±۳۴/۵	۱۲۱/۵±۳۲/۱	-/۱۱۸*	LDL
۴۱±۹/۵	۴۲/۴±۸/۸	-/۱۷۲*	۴۰/۹±۹/۵	۴۱/۷±۸/۵	-/۳۵۵*	HDL
۱۳۸/۵±۸۹/۷	۱۴۰/۴±۸۰/۹	-/۸۳۷*	۱۴۰/۲±۹۳/۱	۱۴۴/۷±۸۶/۷	-/۶۳۷*	Triglyceride
۱۸۵/۵±۴۵/۶	۱۹۰/۵±۴۱/۹	-/۲۸۷*	۱۸۵/۳±۴۵/۹	۱۹۰/۶±۴۲/۳	-/۲۵۹*	Total Cholesterol

مشترک

جدول ۲- پرایمها و توالی‌های پروب Taq Man (پرایم و پروب‌ها بهخصوص، توسط نرم‌افزار Allele ID طراحی شده‌اند).

ژن و پلی‌مورفیسم مربوطه	توالی پرایم و پروب‌ها	
IL-6 -174 (G>C)	Forward primer	5'-TTGTCAAGACATGCCAAGTGCT-3'
IL-6 -174 (G>C)	Reverse primer	5'-GCCTCAGACATCTCCAGTCC-3'
IL-6 -572 (G>C)	Forward primer	5'-GCACGAAATTGAGGATGGC-3'
IL-6 -572 (G>C)	Reverse primer	5'-TCTGAGTTCTCTGTGTTCTGG-3'
IL-6 -572 (G>C)	Probe C	5-FAM-AGTTCTACAACAGCCCCCTCACAPHOSPHATE3'
IL-6 -572 (G>C)	Probe G	5-HEX-AGTTCTACAACAGCCGCTCACAPHOSPHATE3'

مشترک

جدول ۳- شرایط PCR و تعیین ژنتیک.

PCR	دماهای مربوط به مراحل	زمان	تعداد سیکل	قطعات آمپلیکون به جفت باز (bp)
	۹۵°	۵ min	۱ سیکل	IL-6-174 Hin1II (NlaIII) بعد از هضم آنزیمی با آنزیم
	۹۵° (IL6-174) ۶۰/(IL6-572) ۵۷°	۶۰/۳۰ sec	۳۵ سیکل	GG: ۲۳۳ GC: ۲۳۳+۱۲۲ CC: ۱۲۲
	۷۲	۶۰/۳۰ sec		
	۷۲	۵ min	۱ سیکل	

<sup>3</sup> Magnetic resonance imaging

<sup>4</sup> Case ascertainment

<sup>5</sup> Matched

<sup>6</sup> Catalog No K-2000; genet bio

<sup>7</sup> Polymerase chain reaction

## تجزیه و تحلیل آماری

در جامعه مورد مطالعه داده‌های کیفی به صورت فراوانی در درصد و داده‌های کمی به صورت میانه با انحراف معیار استاندارد گزارش شده است. بهمنظور مقایسه این متغیرهای کیفی و کمی بین گروههای مورد و شاهد به ترتیب از آزمون‌های  $t$  test و Mann–Whitney U پس از نرمال کردن داده‌ها با one-sample Kolmogorov – Smirnov  $P < 0.05$  نیز به عنوان ارزش معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد. همچینین، تجزیه و تحلیل‌ها برای سن، جنسیت و همچنین برخی از عوامل خطر سکته مغزی که منطبق شده بودند انجام گرفت. سپس، نسبت‌های مورد انتظار برای هر ژنوتیپ و هر آلل در گروههای مورد و شاهد محاسبه شد. در نهایت این تجزیه و تحلیل‌ها همچنین به جهت محاسبه خطر سکته مغزی در زیرگروه‌ها و جنسیت مورد استفاده قرار گرفت. همه تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۱/۵ انجام شد.

## یافته‌ها

نتایج مطالعه فوق به دو قسمت اطلاعات مربوط به خود بیماران و افراد کنترل و فراوانی ژنوتیپ‌ها تقسیم می‌شود که در ذیل اشاره می‌شود.

## خصوصیات افراد بیمار و کنترل

جدول ۱ شامل مشخصات جمعیت‌شناختی و بالینی بیماران سکته مغزی و نمونه‌های کنترل مربوطه از جمعیت شرق ایران است. همچنین تعداد مردان و زنان برای پلی‌مورفیسم‌های  $\text{IL-6}$  در جدول ۱ نشان داده شده است. بهمنظور طبیق عوامل خطر غیر ژنتیکی، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در سن، جنسیت،

جدول ۴ - ژنوتیپ و فراوانی آلل  $\text{IL-6}$  در بیماران سکته مغزی و بر حسب جنسیت در مقابل گروه کنترل و ارزش  $P$ .

		کنترل زن		بیمار زن		کنترل مرد		بیمار مرد		کنترل		بیمار		توزع ژنوتیپی			
ارزش	$P$	تعداد	۱۱۷	تعداد	۱۱۵	ارزش	$P$	تعداد	۸۴	تعداد	۸۶	ارزش	$P$	تعداد	۲۰۱	تعداد	۲۰۱
۰/۰۰۷	(۹۱/۵) ۱۰۷		(۷۶/۵) ۸۸	۰/۱۱۸		(۸۱/۰) ۶۸		(۸۷/۲) ۷۵	۰/۰۹۳		(۸۷/۱) ۱۷۵		(۸۱/۱) ۱۶۳		(%) GG	(تعداد و %)	
	۰		(۰/۹) ۱			۰		(۲/۴) ۲			۰		(۱/۵) ۳		(CC)	(تعداد و %)	
	(۸/۵) ۷۳		(۲۲/۶) ۲۶			(۱۹/۰) ۱۶		(۱۰/۵) ۹			(۱۲/۹) ۲۶		(۱۷/۴) ۳۵		(GC)	(تعداد و %)	
ارزش	کنترل زن		بیمار زن	ارزش		کنترل مرد		بیمار مرد	ارزش		کنترل		بیمار		توزع آللی	-	
	P	۲۳۴	۲۳۰		۰/۱۶	۱۶۸	۱۶۸	۱۷۲		۰/۰۵۶	۴۰۲	۴۰۲	۴۰۲	۴۰۲	G (تعداد و %)		
	P	۲۲۴	۲۰۲			(۹۰/۵) ۸۳		(۹۲/۴) ۱۵۹			(۹۳/۵) ۳۷۶		(۸۹/۹) ۳۶۱		C (تعداد و %)		
۰/۰۰۲	(۹۵/۷) ۲۲۴		(۸۷/۸) ۲۰۲	۰/۵۱۶		(۹/۵) ۱۶		(۷/۶) ۱۳			(۶/۵) ۲۶		(۱۰/۲) ۲۱		مشترک		
	(۴/۳) ۱۰		(۱۲/۲) ۲۸														

# شماره هفتم

جدول ۵- زنوتیپ و فراوانی آلل IL-6 G>C در بیماران سکته مغزی و بر حسب زیرگروه در مقابل گروه کنترل و ارزش  $P$ 

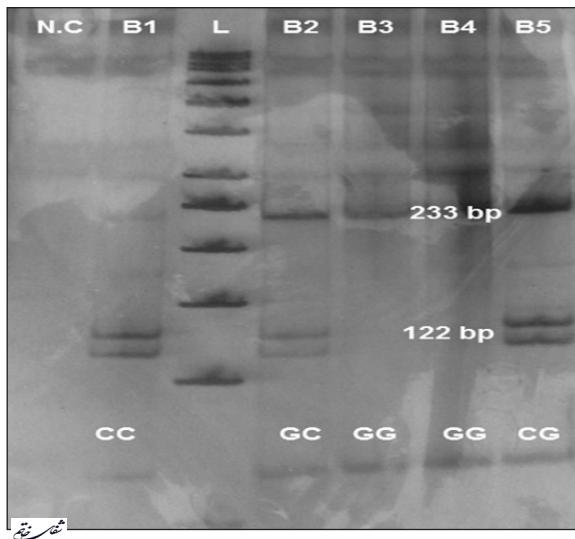
ارزش P	کنترل ۲۰۱ تعداد	دیگر بیماران ۲۴ تعداد	ارزش P	کنترل ۲۰۱ تعداد	بیمار هموراژیک ۶۶ تعداد	ارزش P	کنترل ۲۰۱ تعداد	بیمار ایسکمیک ۱۱۱ تعداد	توزیع زنوتیپی
+/ <sup>611</sup>	(۹۱/۵) ۱۰۷	(۸۲/۳) ۲۰	+/ <sup>۰۱۰</sup>	(۸۱/۰) ۶۸	(۷۵/۸) ۵۰	+/ <sup>۲۳۴</sup>	(۸۷/۱) ۱۷۵	(۸۳/۸) ۹۳	(تعداد و %) GG
	۰	۰		۰	(۳/۰) ۲		۰	(۱) ۱	(تعداد و %) CC
	(۸/۵) ۷۳	(۱۶/۷) ۴		(۱۹/۰) ۱۶	(۲۱/۲) ۱۴		(۱۲/۹) ۲۶	(۱۵/۲) ۱۷	(تعداد و %) GC
ارزش P	کنترل ۴۰۲ تعداد	دیگر بیماران ۴۸ تعداد	ارزش P	کنترل ۴۰۲ تعداد	بیمار هموراژیک ۱۳۲ تعداد	ارزش P	کنترل ۴۰۲ تعداد	بیمار ایسکمیک ۲۲۲ تعداد	توزیع آللی
+/ <sup>624</sup>	(۹۳/۵) ۳۷۶	(۹۱/۷) ۴۴	+/ <sup>۰۰۹</sup>	(۹۳/۵) ۳۷۶	(۸۶/۴) ۱۱۴	+/ <sup>۲۳۴</sup>	(۹۳/۵) ۳۷۶	(۹۱/۴) ۲۰۳	(تعداد و %) G
	(۶/۵) ۲۶	(۸/۳) ۴		(۶/۵) ۲۶	(۱۳/۶) ۱۸		(۶/۵) ۲۶	(۸/۶) ۱۹	(تعداد و %) C

جدول ۶- زنوتیپ و فراوانی آلل IL-6 G>C در بیماران سکته مغزی و بر حسب جنسیت در مقابل گروه کنترل و ارزش  $P$ 

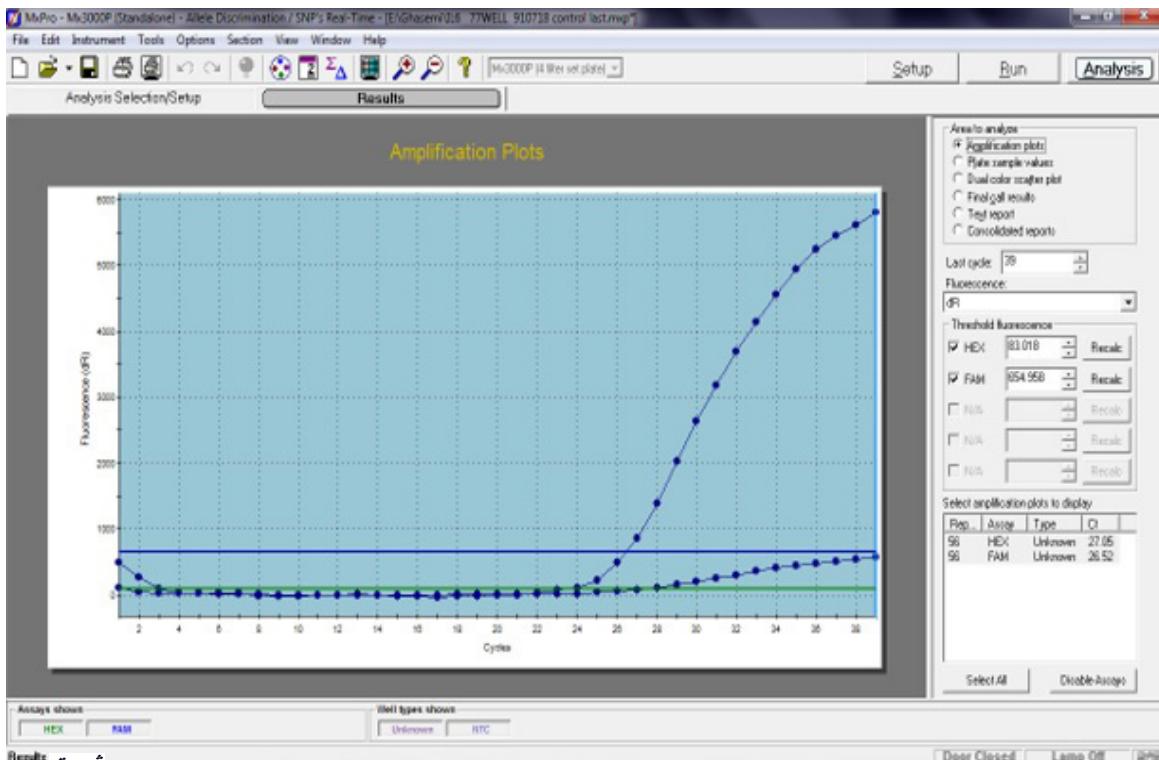
ارزش P	کنترل زن ۱۱۵ تعداد	بیمار زن ۱۱۵ تعداد	ارزش P	کنترل مرد ۹۷ تعداد	بیمار مرد ۸۹ تعداد	ارزش P	کنترل ۲۱۲ تعداد	بیمار ۲۰۳ تعداد	توزیع زنوتیپی
+/ <sup>۵۶۹</sup>	(۶۶/۱) ۲۲	(۶۵/۲) ۷۵	+/ <sup>۰۵۴</sup>	(۱۵/۵) ۱۵	(۲۹/۲) ۲۶	+/ <sup>۹۳۰</sup>	(۶۱/۸) ۱۳۱	(۶۱/۶) ۱۲۵	(تعداد و %) GG
	(۲/۶) ۳	(۰/۹) ۱		(۲۹/۹) ۲۹	(۲۰/۲) ۱۸		(۲/۴) ۵	(۳/۰) ۶	(تعداد و %) CC
	(۳۱/۳) ۳۶	(۳۳/۹) ۳۹		(۵۴/۶) ۵۳	(۵۰/۶) ۴۵		(۳۵/۸) ۷۶	(۳۵/۵) ۷۲	(تعداد و %) GC
ارزش P	کنترل زن ۲۳۰ تعداد	بیمار زن ۲۳۰ تعداد	ارزش P	کنترل مرد ۱۹۴ تعداد	بیمار مرد ۱۷۸ تعداد	ارزش P	کنترل ۴۲۴ تعداد	بیمار ۴۰۶ تعداد	توزیع آللی
+/ <sup>۹۰۳</sup>	(۸۱/۷) ۱۸۸	(۸۲/۲) ۱۸۹	+/ <sup>۰۲۴</sup>	(۴۲/۸) ۸۳	(۵۴/۵) ۹۷	+/ <sup>۸۸۵</sup>	(۷۹/۷) ۳۳۸	(۷۹/۳) ۳۲۲	(تعداد و %) G
	(۱۸/۳) ۴۲	(۱۷/۸) ۴۱		(۵۷/۲) ۱۱۱	(۴۵/۵) ۸۱		(۲۰/۳) ۸۶	(۲۰/۷) ۸۴	(تعداد و %) C

جدول ۷- زنوتیپ و فراوانی آلل IL-6 G>C در بیماران سکته مغزی و بر حسب زیرگروه در مقابل گروه کنترل و ارزش  $P$ 

ارزش P	کنترل ۲۱۲ تعداد	دیگر بیماران ۲۴ تعداد	ارزش P	کنترل ۲۱۲ تعداد	بیمار هموراژیک ۶۶ تعداد	ارزش P	کنترل ۲۱۲ تعداد	بیمار ایسکمیک ۱۱۳ تعداد	توزیع زنوتیپی
+/ <sup>۵۰۸</sup>	(۶۱/۸) ۱۳۱	(۵۴/۲) ۱۳	+/ <sup>۳۷۶</sup>	(۶۱/۸) ۱۳۱	(۷۱/۲) ۴۷	+/ <sup>۵۱۱</sup>	(۶۱/۸) ۱۳۱	(۵۷/۵) ۶۵	(تعداد و %) GG
	(۲/۴) ۵	۰		(۲/۴) ۵	(۱/۵) ۱		(۲/۴) ۵	(۴/۴) ۵	(تعداد و %) CC
	(۳۵/۸) ۷۶	(۴۵/۸) ۱۱		(۳۵/۸) ۷۶	(۲۷/۳) ۱۸		(۳۵/۸) ۷۶	(۳۸/۱) ۴۳	(تعداد و %) GC
ارزش P	کنترل ۴۲۴ تعداد	دیگر بیماران ۴۸ تعداد	ارزش P	کنترل ۴۲۴ تعداد	بیمار هموراژیک ۱۳۲ تعداد	ارزش P	کنترل ۴۲۴ تعداد	بیمار ایسکمیک ۲۲۶ تعداد	توزیع آللی
+/ <sup>۶۶۹</sup>	(۷۹/۷) ۳۳۸	(۷۷/۱) ۳۷	+/ <sup>۱۹۰</sup>	(۷۹/۷) ۳۳۸	(۸۴/۸) ۱۱۲	+/ <sup>۳۴۸</sup>	(۷۹/۷) ۳۳۸	(۵۲/۷) ۱۷۳	(تعداد و %) G
	(۲۰/۳) ۸۶	(۲۲/۹) ۱۱		(۲۰/۳) ۸۶	(۱۵/۲) ۲۰		(۲۰/۳) ۸۶	(۲۳/۵) ۵۳	(تعداد و %) C



تصویر ۱- یک نمونه از قطعات ران شده پلی مورفیسم IL-6 -174 G>C بر روی ژل پلی اکریل آمید، بعد از خضم محصول PCR با آنزیم NlaIII ۲۲۳ قطعه ۲۳۳/۱۲۲ جفت باز برای ژوتیپ (G/G)، قطعات ۱۲۲/۲۳۳ جفت باز برای ژوتیپ (G/C) و قطعه ۱۲۲ جفت باز برای ژوتیپ (C/C). L: 50bp ladder. B1) تا B5: برخی از نمونه‌ها هستند. N.C: کنترل منفی.



تصویر ۲- PCR - Taqman SNP discrimination Real-time PCR با پروب اختصاصی برای پلی مورفیسم IL-6 -572 G>C (در تصویر نمونه‌ای با ژوتیپ GC).

در سیستم التهابی ارتباط داشته باشد (۱۰، ۱۶). از این رو، پروفایل‌های جامع شانگرهای ژنتیکی التهاب در یک شیوه منحصر به جمعیت خاص با ویژگی<sup>۸</sup> بالاتر که به معنی حساسیت بالاتر فرد در یک جمعیت برای توسعه سکته مغزی است تعریف شده است. در جمعیت ایرانی، هیچ اطلاعاتی در مورد نقش ژن‌های التهابی در بیماری‌ای سکته مغزی وجود ندارد.

## بحث و نتیجه‌گیری

علی‌رغم نتایج نامطلوب در مورد سختی تعیین ارتباط منطقی و واقعی بین پلی مورفیسم‌های فاکتورهای التهابی با ابتلاء به سکته مغزی، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که افزایش یا کاهش حساسیت به سکته مغزی ممکن است با تفاوت در توزیع پلی مورفیسم‌های ژن‌های دخیل

<sup>8</sup> Specificity

# شناخت

تأثیید مجدد نتایج، ما قصد داریم بررسی دیگری را با حجم نمونه بزرگ‌تر و با جزئیات بیشتر در زیرگروه‌ها و مکانیسم‌های متفاوت به خصوص هموراژیک انجام دهیم.

به جهت مروری بر نکات قوت مطالعه، می‌توانیم برخی از مزایای مطالعه خودمان را در پنج مورد طبقه‌بندی کنیم؛ اول، حجم نمونه مطالعه‌ما یکی از بزرگ‌ترین‌ها در منطقه است و به صورت آزمایشی<sup>۱۱</sup> تمام زیرگروه‌های سکته مغزی را شامل می‌شود (فراگیر بودن). دوم، به جهت اطمینان، تأثید و اثبات صحت نتایج و جمع‌آوری نمونه و اطلاعات، افراد مشکوک به سکته مغزی توسط متخصص مغز و اعصاب به همراه CT اسکن و MRI (با توجه به مطالعه بروز سکته مغزی مشهد (MSIS)) تشخیص داده می‌شوند. علاوه بر این، برای جلوگیری از طبقه‌بندی نادرست نیز از گزارش‌های بیمارستانی به تنها یکی استفاده نکردیم. سوم، به دلیل توجه به همبستگی بین سن با سکته مغزی، یک محدوده سنی گسترده‌تر مورداستفاده قرار گرفت. چهارم، این دو پلی‌مورفیسم با روش‌های دقیق آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند (با درصد اطمینان بالا و بررسی چندباره نتایج) و پنجمین مزیت، بیماران و کنترل‌ها برای حذف اثرات غیر ژنتیکی (محیطی) عوامل خطر ایجاد کننده سکته مغزی معمول مانند دیابت، سن، جنسیت، عوامل چربی مورد تطبیق قرار گرفتند.

بنابراین، در ابتداء نتیجه می‌گیریم که فراوانی آل C در منطقه ۵۷۲-پرومومتر ژن IL-6 در یک جمعیت ایرانی (خراسان) برای تأثید مطالعات دیگر بسیار کم است. همچنین پلی‌مورفیسم ژن IL-6 در منطقه ۵۷۲-می‌تواند باعث ایجاد استعداد قابل توجهی به سکته مغزی در منطقه شرق ایران شود. با کمال تعجب، ما دریافتیم همبستگی قوی بین زیرگروه سکته هموراژیک و این پلی‌مورفیسم و همچنین در زیرگروه با جنسیت زن که هدف مطالعات بیشتر آینده گروه ماست وجود دارد. علاوه بر این، هیچ ارتباط معنی‌داری از لحاظ آماری بین IL-6-174 G>C و سکته مغزی به طور کل، بجز آل C در زیرگروه مردان، وجود نداشت که مؤید برخی از مطالعات دیگر بود (۲۷).

به عنوان نتیجه کلی، پلی‌مورفیسم IL-6-572 G>C که در مکانیسم التهاب نقش دارد، ممکن است یکی از عوامل خطر سکته مغزی برای جمعیت شرق ایران محسوب شود. با توجه به این مطلب، این همبستگی ممکن است یکی از دلایل شیوع باسن کمتر سکته مغزی در جمعیت شرق ایران استدلال شود و بنابراین این یافته‌ها می‌تواند تأثیر بسیاری برای تشخیص سریع‌تر و درمان بهتر سکته مغزی داشته باشد.

علاوه بر این، مطالعات انجام شده در حوزه سکته مغزی در سرتاسر دنیا اهمیت پاسخ التهابی که با آسیب نکروتیک مغز همراه می‌شود را نشان داده است (۱۷). با این حال، مکانیسم‌های بسیار متفاوتی که در بیماری‌زایی سکته مغزی دخیل هستند وجود دارد که به طور فراینده‌ای التهاب به عنوان یکی از مسیرهای مهم تلقی می‌شود (۱۸). این مکانیسم به نظر می‌رسد به طور حادی در آسیب‌شناسی ایسکمیک سهیم باشد. التهاب یک واژه در برگیرنده یک فرایند پیچیده که مستلزم تغییرات سلولی، هورمونی و بیوشیمیابی متعددی است که هر دو سیستمیک و ارگان محور هستند (۱۹). سایتوکین‌ها، واسطه‌های التهابی هستند که در مغز پس از سکته مغزی افزایش می‌یابند. اینترلوکین ۶ یکی از بیشترین سایتوکین مورد مطالعه مربوط به التهاب در سکته مغزی است که ممکن است باعث محافظت اعصاب شود (۲۰).

IL-6 را تا حد زیادی به عنوان مهم‌ترین واسطه واکنش‌های التهابی در داخل بدن و یکی از سایتوکین‌های پیش التهابی تصور می‌کردند. برخی مطالعات این واسطه التهابی را به عنوان فاکتور مفید (۲۱) و برخی به عنوان فاکتور مضرك (۲۲) پیشنهاد داده بودند. علاوه بر این، مطالعات بالینی در بیماران سکته مغزی این موضوع را پیشنهاد داده است که نه تنها غلظت سرمی IL-6 افزایش قابل توجهی در سکته مغزی ایسکمیک داشته است (۱۶)، بلکه همچنین آن را به عنوان قوی‌ترین معیار مستقل برای مرگ و میر در بیمارستان معرفی کرده است (۲۳). در یک کار آزمایی بالینی دوسوکور<sup>۹</sup> در بیماران مبتلا به سکته مغزی حاد، سطح IL-6 در کسانی که داروی rhIL-1Ra که یک داروی محافظت‌کننده نورونی است استفاده کرده بودند به طور قابل توجهی پایین بوده است. به عبارت دیگر، نتیجه بهتری نسبت به گروه درمان شده با دارونمای<sup>۱۰</sup> ارائه داده بودند (۲۴). علاوه بر این، شواهد در حال افزایش نشان می‌دهند که IL-6 یک تنظیم‌کننده کلیدی مکانیسم التهابی است که نقش محوری در توسعه و پاتوفیزیولوژی سکته مغزی بازی می‌کنند (۲۵).

برخی از SNP‌ها، به ویژه در پرومومتر غیر کد شونده در ژن IL-6، نشان داده شده است که تأثیر شگفت‌انگیزی در بیان این ژن دارند (۲۶). پیرو آن، مطالعه ما نشان می‌دهد که ارتباط معنی‌داری بین ژنتیپ‌های خاص پرومومتر و آل C-572 IL-6، سکته مغزی زیرگروه زنان وجود دارد ( $P<0.007$ ). علاوه بر این، این ژنتیپ و آل مرتبط با زیرگروه هموراژیک ( $P<0.010$ ) به جای زیرگروه ایسکمیک که ما انتظار داشتیم رابطه داشته باشد، همبستگی نشان داد. در این پلی‌مورفیسم نشان داده شده است که می‌تواند بر روی زیرگروه هموراژیک تأثیر داشته باشد. به جهت

<sup>9</sup> Double-blind

<sup>10</sup> Placebo

<sup>11</sup> Pilot

1. Hachiya T, Kamatani Y, Takahashi A, Hata J, Furukawa R, Shiwa Y, et al. Genetic predisposition to ischemic stroke. *Stroke*. 2017; 48(2): 253-8.
2. Azarpazhooh MR, Etemadi MM, Donnan GA, Mokhber N, Majdi MR, Ghayour-Mobarhan M, et al. Excessive incidence of stroke in Iran. *Stroke*. 2010; 41(1): e3-e10.
3. Investigators WMPP. The world health organization MONICA project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. *J Clin Epidemiol*. 1988; 41(2): 105-14.
4. Kumar A, Misra S, Kumar P, Sagar R, Gulati A, Prasad K. Relationship of phosphodiesterase 4D (PDE4D) gene polymorphisms with risk of ischemic stroke: a hospital based case-control study. *Neurol Res*. 2017; 31: 1-6.
5. Dierick F, Dehas M, Isambert JL, Injeyan S, Bouché AF, Bleyenheuft Y, et al. Hemorrhagic versus ischemic stroke: who can best benefit from blended conventional physiotherapy with robotic-assisted gait therapy? *PLoS one*. 2017; 12(6): e0178636.
6. Yuan H, Wang X, Xia Q, Ge P, Wang X, Cao X. Angiotensin converting enzyme (I/D) gene polymorphism contributes to ischemic stroke risk in Caucasian individuals: a meta-analysis based on 22 case-control studies. *Int J Neurosci*. 2016; 126(6): 488-98.
7. Terni E, Giannini N, Brondi M, Montano V, Bonuccelli U, Mancuso M. Genetics of ischaemic stroke in young adults. *BBA Clinical*. 2015; 3: 96-106.
8. Sand PG. IL-6 variants in ischemic stroke. *Ann Neurosci*. 2016; 23(1): 60-1.
9. Tong Y, Wang Z, Geng Y, Liu J, Zhang R, Lin Q, et al. The association of functional polymorphisms of IL-6 gene promoter with ischemic stroke: analysis in two Chinese populations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 391(1): 481-5.
10. Ma Y, Tang R-K, Yang X, Peng G-G, Liu Y, Wang X-M, et al. Lack of an association between interleukin-6 gene promoter polymorphisms (-174G/C, -572G/C) and ischemic heart disease and/or ischemic stroke: a meta-analysis. *Human Immunology*. 2011; 72(8): 641-51.
11. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998; 102(7): 1369-76.
12. Chauhan G, Debette S. Genetic risk factors for ischemic and hemorrhagic stroke. *Curr Cardiol Rep*. 2016; 18(12): 124. Doi: 10.1007/s11886-016-0804-z.
13. Pirhoushian M, Ghasemi MR, Hami J, Zargari P, Nezhad PS, Azarpazhooh MR, et al. The association of coagulation factor V (Leiden) and factor II (Prothrombin) mutations with stroke. *Iran Red Crescent Med J*. 2014; 16(11). e11548. Doi: 10.5812/ircmj.
14. Ghasemi MR, Zargari P, Pirhoushian M, Azarpazhooh MR, Sadr-Nabavi A. Is apolipoprotein genotype a reason for the excessive incidence of stroke in persian population? *J Biomed*. 2016; 1(1): 1-6.
15. Zargari P, Ghasemi MR, Pirhoushian M, Vakili V, Hami J, Farzadfar MT, et al. Renin-angiotensin a1166c polymorphism and the rrisk of stroke. *Journal of Cell and Molecular Research*. 2015; 7(1): 32-7.
16. Kumar P, Yadav AK, Kumar A, Sagar R, Pandit AK, Prasad K. Association between Interleukin-6 (G174C and G572C) promoter gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Ann Neurosci*. 2015; 22(2): 61-9.
17. Becker KJ, Buckwalter M. Stroke, inflammation and the immune response: dawn of a new era. *Neurotherapeutics*. 2016; 13(4): 659-60.
18. Libby P, Hansson GK. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree. *Circ Res*. 2015; 116(2): 307-11.
19. Anrather J, Iadecola C. Inflammation and stroke: an overview. *Neurotherapeutics*. 2016; 13(4): 661-70.
20. Lee JH, Yoon EJ, Seo J, Kavoussi A, Chung YE, Chung SP, et al. Hypothermia inhibits the propagation of acute ischemic injury by inhibiting HMGB1. *Molecular Brain*. 2016; 9(1): 81. Doi.org/10.1186/s13041-016-0260-0.
21. Han D, Liu Z, Wang G, Zhang Y, Wu Z. Electroacupuncture improves cognitive deficits through increasing regional cerebral blood flow and alleviating inflammation in CCI rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017. Doi. org/10.1155/2017/5173168.
22. Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, et al. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurology*. 2004; 4(1): 2. Doi.org/10.1186/1471-2377-4-2.

23. Rallidis LS, Vikelis M, Panagiotakos DB, Rizos I, Zolindaki MG, Kaliva K, et al. Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke. *Atherosclerosis*. 2006; 189(1): 193-7.
24. Emsley H, Smith C, Georgiou R, Vail A, Hopkins S, Rothwell N, et al. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2005; 76(10): 1366-72.
25. Licata G, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Corrao S, Di Sciacca R, Pinto A. Immuno-inflammatory activation in acute cardio-embolic strokes in comparison with other subtypes of ischaemic stroke. *Thromb Haemost*. 2009;101(5): 929-37.
26. Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, et al. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density. *Journal of Human Genetics*. 2001; 46(5): 267-72.
27. Yan J, Greer J, McCombe P. Interleukin 6 promoter 174 G/C polymorphisms in acute ischemic stroke: G allele is protective but not associated with IL-6 levels or stroke outcome. *Journal of Neuroimmunology*. 2016; 293: 22-7.