

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

Mohammad Reza Ghasemi¹, Peyman Zargari², Hamdam Hourfar³, Maryam Pirhoushiaran¹, Payam Sasan Nezhad⁴, Mahmoud Reza Azarpazhooh⁴, Ariane Sadr-Nabavi^{5, 1, 6*}

¹Department of Medical Genetics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

²Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

⁴Department of Neurology, Ghaem Hospital, Mashhad, Iran

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

⁶Academic 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 for 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 پلی مورفیسم های عملکردی پروموتور ژن اینترلوکین -۶ و سکنه مغزی: تجزیه و تحلیل در بین یک جمعیت ایرانی

محمدرضا قاسمی^۱، پیمان زرگری^۲، همدم هورفر^۳، مریم پیرھوشیاران^۱، پیام ساسان نژاد^۴، محمود رضا آذرپژوه^۴، آریانه صدرنبوی^{۵،۱،۶*}

^۱گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۲گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

^۴گروه نورولوژی، بیمارستان قائم، مشهد، ایران

^۵مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۶جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۸ تیر ۱۳۹۶

اصلاحیه: ۲۵ خرداد ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۷ خرداد ۱۳۹۶

چکیده

مقدمه: واریانت های توالی در ژن هایی که درگیر در سیستم التهاب هستند به خطر ابتلا به برخی از بیماری های قلبی -عروقی مانند سکنه مغزی کمک می کنند. اینترلوکین -۶ یک سایتوکین پلیوتروپ با بیماری های قلبی -عروقی مخصوصاً سکنه مغزی در ارتباط است. به عبارت دیگر، ایسکمیک مغزی و التهاب به شدت با هم ارتباط دارند. در مطالعه حاضر یک مطالعه همبستگی ژنتیکی روی دو پلی مورفیسیم تک نوکلئوتیدی (IL6 -572 G>C , -174 G>C) در یک جمعیت ایرانی در استان خراسان انجام دادیم. مواد و روش ها: فرضیه ما در این مطالعه مورد -شاهدی بر روی بیماران سکنه مغزی و کنترل های سالم که برای سن، جنس و برخی عوامل خطر کلاسیک انطباق یافته بودند، آزمایش شد. این پلی مورفیسیم ها توسط روش Real Time Taq Man Probe و PCR-RFLP تشخیص داده شدند. یافته ها: پس از تعدیل عوامل خطر مخدوش کننده، همبستگی بین زنان بیماری که از سکنه مغزی رنج می برند و پلی مورفیسیم IL-6 -572 G>C و همچنین زیرگروه هموراژیک سکنه مغزی وجود داشت. علاوه بر این بین IL-6 -174 G>C و سکنه مغزی، بجز یکی از آلل ها در گروه مردان همبستگی وجود نداشت. نتیجه گیری: در نتیجه ژنوتیپ IL-6 -572 G>C ممکن است یک عامل خطر ژنتیکی باشد که خطر ابتلا به سکنه مغزی در جمعیت مورد مطالعه را افزایش می دهد. با این وجود این خیلی بحث برانگیز است که آیا IL-6 -174 G>C یک ژن حساس برای سکنه مغزی در این جمعیت است. این مورد نیاز به تأیید در یک جمعیت بزرگ تر است.

کلید واژه ها:

۱. سکنه مغزی

۲. التهاب

۳. واکنش زنجیره ای پلیمرز

* نویسنده مسئول: آریانه صدرنبوی

آدرس الکترونیکی: sadrnabavia2009@gmail.com

مقدمه

اینترلوکین ۶ (IL-6) یکی از سایتوکین‌های التهابی پلی‌تروپیک 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 اینترون و یک منطقه پروگزیمال پروموتور است که واقع در لوکوس کروموزومی 7p21 در انسان می‌باشد (۱۰). مناطق کدینگ پروموتور 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 پروموتور 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 (۱۵-۱۳) ما بر روی این دو پلی‌مورفیسم عملکردی این ژن حیاتی که میانجی‌گر 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)^۱ که به زیر گروه‌های سکته مغزی ایسکمیک، گروه‌های خونریزی‌دهنده (ICH و SAH) و دیگر گروه‌بندی می‌شدند از تصویربرداری عصبی استفاده شد. علاوه بر این، طبقه‌بندی به زیرگروه‌های ایسکمیک و هموراژیک توسط توموگرافی کامپیوتری (سی‌تی‌اسکن) 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 انطباق با پروژه سازمان جهانی بهداشت مونیکا^۱، سکته مغزی به‌عنوان "توسعه سریع علائم 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) (۲)، 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 آمبولی 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 نخواهند 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 تنهایی نقش مهمی در استعداد ابتلاء به سکته مغزی بازی می‌کند، عوامل خطر زیست‌محیطی کلاسیک مانند فشار خون بالا، سن بالا، کلسترول 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 کوهورت مستقل، موارد لازم برای اثبات رابطه علت و معلولی بین یک نشانگر ژنتیکی و سکته مغزی است (۷).

ایسکمی مغزی و التهاب به‌شدت با هم ارتباط دارند: محرکی 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 آترواسکلروز کمک می‌کند. پلی‌مورفیسم عملکردی ژن‌های التهابی ممکن است باعث احتمال بروز سکته مغزی ایسکمیک شود (۸، ۹).

^۱ MONICA project^۲ First-ever stroke

تعیین ژنوتیپ

نمونه خون جهت استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی Prime Prep از گروه مورد و شاهد گرفته شد. با استفاده از DNA استخراج شده به عنوان الگو، انواع مختلف از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام گرفت. برای پلی مورفیسم G>C IL-6-174 و IL-6-572 G>C به ترتیب از روش‌های RFLP-PCR، Real-Time PCR Taqman probe برای تعیین SNP ها استفاده شد. اطلاعات دقیق در مورد شرایط PCR، پرایمرها و پروب توالی در جدول ۲ و ۳ خلاصه شده است.

(MRI) نیز انجام گرفت. تأیید موارد^۴ و اخلاق کار نیز بر طبق مطالعه آقای دکتر آذرپژوه و همکاران رعایت شد (۲).

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

جدول ۱- اطلاعات جمعیت‌شناختی و پروفایل عوامل خطر در بیماران مبتلا به سکنه مغزی و کنترل مربوطه برای پلی مورفیسم‌های 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	کنترل	P ارزش	بیمار	کنترل	P ارزش	
تعداد ۲۰۱	تعداد ۲۰۱		تعداد ۲۰۳	تعداد ۲۱۲		
۵۱/۹±۱۳/۰	۵۰/۲±۱۱/۷	-/۱۸۹*	۵۱/۸±۱۳/۰	۵۰/۵±۱۳/۰	-/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

شفاخته

جدول ۲- پرایمرها و توالی‌های پروب Taq Man (پرایمر و پروب‌ها به خصوص، توسط نرم‌افزار Allele ID طراحی شده‌اند).

ژن و پلی مورفیسم مربوطه	توالی پرایمر و پروب‌ها	
IL-6-174 (G>C)	Forward primer	5'-TTGTCAAGACATGCCAAAGTGCT-3'
IL-6-174 (G>C)	Reverse primer	5'-GCCTCAGACATCTCCAGTCC-3'
IL-6-572 (G>C)	Forward primer	5'-GCACGAAATTTGAGGATGGC-3'
IL-6-572 (G>C)	Reverse primer	5'-TCTGAGTTCTTCTGTGTTCTGG-3'
IL-6-572 (G>C)	Probe C	5-FAM-AGTTCTACAACAGCCCCTCACA-PHOSPHATE3'
IL-6-572 (G>C)	Probe G	5-HEX-AGTTCTACAACAGCCGCTCACA PHOSPHATE3'

شفاخته

جدول ۳- شرایط PCR و تعیین ژنوتیپ.

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

شفاخته

³ Magnetic resonance imaging

⁴ Case ascertainment

⁵ Matched

⁶ Catalog No K-2000; genet bio

⁷ Polymerase chain reaction

تجزیه و تحلیل آماری

دیابت شیرین، LDL، HDL، تری گلیسیرید و کلسترول کل بین گروه‌های مورد و شاهد در جمعیت این دو پلی‌مورفیسم وجود ندارد.

فراوانی ژنوتیپ

ما ۲ جامعه آماری مختلف را منوط به آزمون‌های آماری مرتبط با جمعیت‌های مختلف و بر اساس فراوانی‌های این پلی‌مورفیسم‌ها محاسبه کردیم که شامل؛ IL-6-572 : ۲۰۱ بیمار سکتۀ مغزی و ۲۰۱ فرد سالم و IL-6-174 : ۲۰۳ بیمار سکتۀ مغزی و ۲۱۲ فرد سالم است. جدول‌های ۴ و ۵ نشان‌دهندۀ توزیع ژنوتیپ‌ها و فراوانی‌های آلی پلی‌مورفیسم IL-6-572G/ C و جدول‌های ۶ و ۷ نشان‌دهندۀ توزیع ژنوتیپ‌ها و فراوانی‌های آلی پلی‌مورفیسم IL-6-174G/ C می‌باشد. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در توزیع پلی‌مورفیسم IL-6-572 G>C بین زیرگروه زنان که از سکتۀ مغزی رنج می‌بردند و کنترل مربوطه و همچنین در زیرگروه همورائیک سکتۀ مغزی (به ترتیب ارزش $P=0.007$ و $P=0.10$) وجود دارد. بنابراین، ژنوتیپ GC و آلل C این پلی‌مورفیسم ممکن است عامل خطر برای بیماران سکتۀ مغزی زنان و همچنین زیرگروه سکتۀ مغزی همورائیک باشند (جدول‌های ۴ و ۵).

همان‌طور که در جدول‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است، هیچ اختلاف آماری معنی‌داری در پلی‌مورفیسم IL-6-174 G>C (بجز فراوانی آلی بین زیرگروه مردان) وجود ندارد. به عبارت دیگر، آلل C از این پلی‌مورفیسم ممکن است یک عامل خطر نه چندان قابل اطمینان برای زیرگروه مردان در بیماری سکتۀ مغزی باشد.

همچنین، تصاویر ۱ و ۲ نمونه‌هایی از تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی این پلی‌مورفیسم‌ها را توسط روش‌های متفاوت مبتنی بر PCR نشان می‌دهد.

در جامعه مورد مطالعه داده‌های کیفی به صورت فراوانی و درصد و داده‌های کمی به صورت میانۀ با انحراف معیار استاندارد گزارش شده است. به‌منظور مقایسۀ این متغیرهای کیفی و کمی بین گروه‌های مورد و شاهد به ترتیب از آزمون‌های χ^2 و Student t test یا Mann-Whitney U پس از نرمال کردن داده‌ها با one-sample Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. مقدار $P<0.05$ نیز به‌عنوان ارزش معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد. همچنین، تجزیه و تحلیل‌ها برای سن، جنسیت و همچنین برخی از عوامل خطر سکتۀ 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 محاسبۀ خطر سکتۀ 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 مطالعۀ 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 سکتۀ مغزی و نمونه‌های کنترل مربوطه از جمعیت شرق ایران است. همچنین تعداد مردان و زنان برای پلی‌مورفیسم‌های ژن IL-6 در جدول ۱ نشان داده شده است. به‌منظور تطبیق عوامل خطر غیر ژنتیکی، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در سن، جنسیت،

جدول ۴- ژنوتیپ و فراوانی آلل IL-6-572 G>C در بیماران سکتۀ مغزی و برحسب جنسیت در مقابل گروه کنترل و ارزش P.

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

مشخصه

جدول ۵- ژنوتیپ و فراوانی آلل IL-6-572 G>C در بیماران سکتۀ مغزی و برحسب زیرگروه در مقابل گروه کنترل و ارزش P

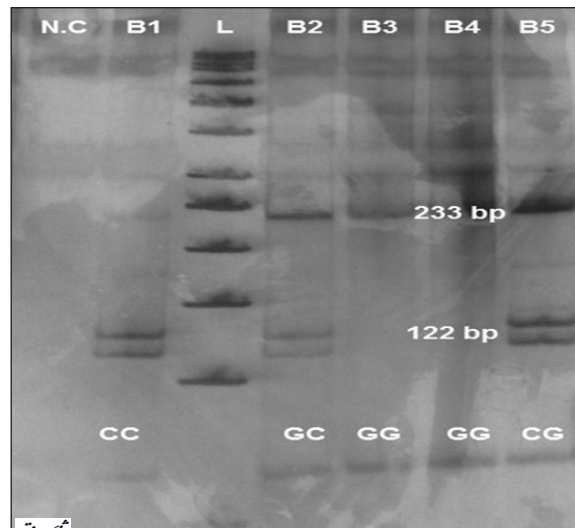
توزیع ژنوتیپی	بیمار ایسکمیک تعداد ۱۱۱	کنترل تعداد ۲۰۱	ارزش P	بیمار همورائیک تعداد ۶۶	کنترل تعداد ۲۰۱	ارزش P	دیگر بیماران تعداد ۲۴	کنترل تعداد ۲۰۱	ارزش P
GG (تعداد و %)	۹۳ (۸۳/۸)	۱۷۵ (۸۷/۱)	۰/۳۳۴	۵۰ (۷۵/۸)	۶۸ (۸۱/۰)	۰/۰۱۰	۲۰ (۸۳/۳)	۱۰۷ (۹۱/۵)	۰/۶۱۱
CC (تعداد و %)	۱ (۱)	۰		۲ (۳/۰)	۰		۰	۰	
GC (تعداد و %)	۱۷ (۱۵/۲)	۲۶ (۱۲/۹)		۱۴ (۲۱/۲)	۱۶ (۱۹/۰)		۴ (۱۶/۷)	۷۳ (۸/۵)	
توزیع آللی	بیمار ایسکمیک تعداد ۲۲۲	کنترل تعداد ۴۰۲	ارزش P	بیمار همورائیک تعداد ۱۳۲	کنترل تعداد ۴۰۲	ارزش P	دیگر بیماران تعداد ۴۸	کنترل تعداد ۴۰۲	ارزش P
G (تعداد و %)	۲۰۳ (۹۱/۴)	۳۷۶ (۹۳/۵)	۰/۳۳۴	۱۱۴ (۸۶/۴)	۳۷۶ (۹۳/۵)	۰/۰۰۹	۴۴ (۹۱/۷)	۳۷۶ (۹۳/۵)	۰/۶۲۴
C (تعداد و %)	۱۹ (۸/۶)	۲۶ (۶/۵)		۱۸ (۱۳/۶)	۲۶ (۶/۵)		۴ (۸/۳)	۲۶ (۶/۵)	

جدول ۶- ژنوتیپ و فراوانی آلل IL-6-174 G>C در بیماران سکتۀ مغزی و برحسب جنسیت در مقابل گروه کنترل و ارزش P

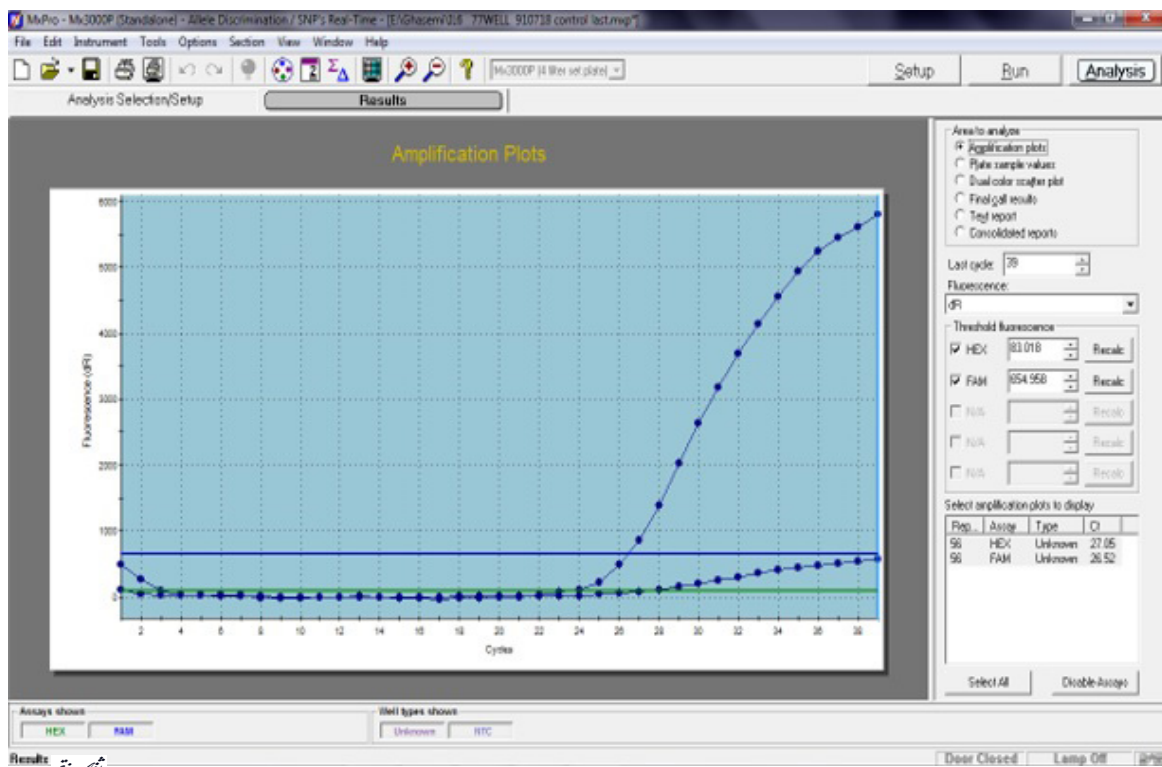
توزیع ژنوتیپی	بیمار تعداد ۲۰۳	کنترل تعداد ۲۱۲	ارزش P	بیمار مرد تعداد ۸۹	کنترل مرد تعداد ۹۷	ارزش P	بیمار زن تعداد ۱۱۵	کنترل زن تعداد ۱۱۵	ارزش P
GG (تعداد و %)	۱۲۵ (۶۱/۶)	۱۳۱ (۶۱/۸)	۰/۹۳۰	۲۶ (۲۹/۲)	۱۵ (۱۵/۵)	۰/۰۵۴	۷۵ (۶۵/۲)	۲۲ (۶۶/۱)	۰/۵۶۹
CC (تعداد و %)	۶ (۳/۰)	۵ (۲/۴)		۱۸ (۲۰/۲)	۲۹ (۲۹/۹)		۱ (۰/۹)	۳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

جدول ۷- ژنوتیپ و فراوانی آلل IL-6-174 G>C در بیماران سکتۀ مغزی و برحسب زیرگروه در مقابل گروه کنترل و ارزش P

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



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



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

بحث و نتیجه‌گیری

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

در سیستم التهابی ارتباط داشته باشد (۱۶، ۱۰-۸). از این رو، پروفایل‌های جامع نشانگرهای ژنتیکی التهاب در یک شیوة منحصر به جمعیت خاص با ویژگی^۸ بالاتر که به معنی حساسیت بالاتر فرد در یک جمعیت برای توسعه سکتة مغزی است تعریف شده است. در جمعیت ایرانی، هیچ اطلاعاتی در مورد نقش ژن‌های التهابی در بیماری‌زایی سکتة مغزی وجود ندارد.

^۸ Specificity

تأیید مجدد نتایج، ما قصد داریم بررسی دیگری را با حجم نمونه بزرگ‌تر و با جزئیات بیشتر در زیرگروه‌ها و مکانیسم‌های متفاوت به‌خصوص 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 مطالعه ما یکی از بزرگ‌ترین‌ها در منطقه است و به صورت آزمایشی^{۱۱} تمام زیرگروه‌های سکنه مغزی را شامل می‌شود (فراگیر بودن). دوم، به جهت اطمینان، تأیید و اثبات صحت نتایج و جمع‌آوری نمونه و اطلاعات، افراد مشکوک به سکنه مغزی توسط متخصص مغز و اعصاب به همراه CT اسکن و MRI (با توجه به مطالعه بروز سکنه مغزی مشهد (MSIS)) تشخیص داده می‌شدند. علاوه بر این، برای جلوگیری از طبقه‌بندی نادرست نیز از گزارش‌های بیمارستانی به تنهایی استفاده نکردیم. سوم، به دلیل توجه به همبستگی بین سن با سکنه مغزی، یک محدوده سنی گسترده‌تر مورد استفاده 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 ایجادکننده سکنه مغزی معمول مانند دیابت، سن، جنسیت، عوامل چربی مورد تطابق قرار گرفتند.

بنابراین، در ابتدا نتیجه می‌گیریم که فراوانی آلل C در منطقه ۵۷۲- پروموتور ژن IL-6 در یک جمعیت ایرانی (خراسان) برای تأیید مطالعات دیگر بسیار کم است. همچنین پلی‌مورفیسم ژن IL-6 در منطقه ۵۷۲- می‌تواند باعث ایجاد استعداد قابل توجهی به سکنه مغزی در منطقه شرق ایران شود. با کمال تعجب، ما دریافتیم همبستگی قوی بین زیرگروه سکنه 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 سکنه مغزی به طور کل، بجز آلل C در زیرگروه مردان، وجود نداشت که مؤید برخی از مطالعات دیگر بود (۲۷).

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

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

IL-6 را تا حد زیادی به‌عنوان مهم‌ترین واسطه واکنش‌های التهابی در داخل بدن و یکی از سایتوکین‌های پیش التهابی تصور می‌کردند. برخی مطالعات این واسطه التهابی را به‌عنوان فاکتور مفید (۲۱) و برخی به‌عنوان فاکتور مضر (۲۲) پیشنهاد داده بودند. علاوه بر این، مطالعات بالینی در بیماران سکنه مغزی این موضوع را پیشنهاد داده است که نه تنها غلظت سرمی IL-6 افزایش قابل توجهی در سکنه مغزی ایسکمیک داشته است (۱۶)، بلکه همچنین آن را به‌عنوان قوی‌ترین معیار مستقل برای مرگ و میر در بیمارستان معرفی کرده است (۲۳). در یک کار آزمایشی بالینی دو سو کور^۹ در بیماران مبتلا به سکنه 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 دارونما^{۱۰} 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 سکنه مغزی بازی می‌کنند (۲۵).

برخی از SNP ها، به‌ویژه در پروموتور 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 ژنوتیپ‌های خاص پروموتور و آلل IL-6-572 C، سکنه مغزی زیرگروه زنان وجود دارد ($P<0.007$ ، $P<0.002$). علاوه بر این، این ژنوتیپ و آلل مرتبط با زیرگروه هموراژیک ($P<0.010$)، به‌جای 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

⁹ Double-blind

¹⁰ Placebo

¹¹ Pilot

منابع

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sand PG. IL-6 variants in ischemic stroke. *Ann Neurosci*. 2016; 23(1): 60-1.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Pirhousharian 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.
- Ghasemi MR, Zargari P, Pirhousharian 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.
- Zargari P, Ghasemi MR, Pirhousharian M, Vakili V, Hami J, Farzadfard MT, et al. Renin-angiotensin a1166c polymorphism and the risk of stroke. *Journal of Cell and Molecular Research*. 2015; 7(1): 32-7.
- 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.
- Becker KJ, Buckwalter M. Stroke, inflammation and the immune response: dawn of a new era. *Neurotherapeutics*. 2016; 13(4): 659-60.
- Libby P, Hansson GK. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree. *Circ Res*. 2015; 116(2): 307-11.
- Anrather J, Iadecola C. Inflammation and stroke: an overview. *Neurotherapeutics*. 2016; 13(4): 661-70.
- 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.
- 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.
- 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.