

Association between interleukin-6-174G/C single nucleotide polymorphism with the COVID-19 severity

Bahman Rahimlou¹, Sara Ghaffarpour², Mohammad Saber Zamani³, Mohammad Mehdi Naghizadeh⁴, Tooba Ghazanfari^{2*}

1. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
3. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. Non-communicable Diseases Research Center, Fasa University of Medical Science, Fasa, Iran

* Corresponding author e-mail: tghazanfari@yahoo.com

Citation: Rahimlou B, Ghaffarpour S, Zamani MS, Naghizadeh MM, Ghazanfari T. Association between interleukin-6-174G/C single nucleotide polymorphism with the COVID-19 severity. Daneshvar Medicine 2022; 30(3):10-22.
doi: 10.22070/DANESHMED.2022.15783.1171

Abstract

Background and Objective: Interleukin-6 is one of the cytokines whose increase and role in the pathogenesis of Covid-19 has been reported in various studies. Interleukin-6 affects environmental factors and genes, including polymorphic sites in the IL-6 gene. In the present study, the rs1800795 polymorphism located in the IL6 gene region was investigated.

Materials and Methods: Participants in this study were divided into outpatient (n=245) and inpatient (n=245) groups due to COVID-19. Peripheral blood samples were taken from patients and their DNA was extracted, then rs1800795 polymorphism genotype was measured by Tetra Arms PCR. Data were analyzed using SPSS software and Chi-Square and t-test students.

Results: The mean age of patients in the outpatient group was 41.6±12.3 years but in the inpatient group was 61±17.1 years (P-value <0.001); There was also a significant difference in the frequency of smokers and patients with kidney problems (P-value <0.05) as well as patients with hypertension, diabetes mellitus and a history of heart disease (P-value <0.001) in outpatient and inpatient groups. The frequency of G alleles in the inpatient group was significantly lower than the outpatient group (P-value = 0.045).

Conclusion: The frequency of polymorphism variants of rs1800795 interleukin-6 varies in different groups of Covid-19 patients with varying degrees of clinical symptoms, and the G allele may possibly play a protective role against COVID-19.

Keywords: Covid-19, Polymorphism, Interleukin-6, rs1800795

Received: 17 May 2022
Last revised: 13 Aug 2022
Accepted: 17 Aug 2022

ارتباط بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی-۱۷۴ G/C اینترلوکین-۶ با شدت بیماری کووید-۱۹

نویسندگان: بهمن رحیم‌لو^۱، سارا غفارپور^۲، محمدصابر زمانی^۳، محمد مهدی نقی‌زاده^۴، طوبی غضنفری^{۲*}

مقاله پژوهشی

- ۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
- ۲- مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
- ۳- گروه تخصصی ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
- ۴- مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

Email: tghazanfari@yahoo.com

*نویسنده مسئول: طوبی غضنفری

چکیده

مقدمه و هدف: اینترلوکین-۶ یکی از سایتوکاین‌هایی است که افزایش و نقش آن در پاتوژنز کووید-۱۹ در مطالعات مختلف گزارش شده است. غلظت اینترلوکین-۶ تحت تأثیر چندین عامل محیطی و ژنتیکی، از جمله مکان‌های پلی‌مورفیک در ژن IL-6 قرار می‌گیرد. در مطالعه حاضر، پلی‌مورفیسم rs1800795 که در ناحیه ژنی IL6 قرار دارد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: افراد شرکت کننده در این مطالعه به دو گروه سرپایی (۲۴۵ نفر) و بستری (۲۴۵ نفر) به علت ابتلا به COVID-19 تقسیم شدند. نمونه خون محیطی از بیماران تهیه و DNA آن‌ها استخراج شد، سپس ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs1800795 به وسیله روش Tetra Arms PCR مورد سنجش قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری کای دو، تی تست و رگرسیون لجستیک صورت گرفت.

نتایج: میانگین سن بیماران در گروه سرپایی ۴۱/۶±۱۲/۳ سال ولی در گروه بیماران بستری، ۶۱/۰±۱۷/۱ سال بود ($P\text{-value}<0.001$)؛ همچنین فراوانی افراد سیگاری و بیماران دچار مشکلات کلیوی ($P\text{-value}<0.05$) و همینطور بیماران مبتلا به فشار خون، دیابت ملیتوس و دارای سابقه بیماری قلبی ($P\text{-value}<0.001$) در گروه‌های سرپایی و بستری اختلاف معنی‌داری داشت. از نظر فراوانی افراد دارای آلل G در گروه بستری به صورت معنی‌داری کمتر از گروه سرپایی بود. ($P\text{-value}=0.045$)

نتیجه‌گیری: فراوانی واریانت‌های پلی‌مورفیسم rs1800795 اینترلوکین-۶ در گروه‌های مختلف بیماران کووید-۱۹ با شدت علائم بالینی متفاوت، با یکدیگر تفاوت دارد و احتمالاً آلل G می‌تواند نقش حفاظت کننده‌ای در برابر بیماری COVID-19 داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: کووید-۱۹، پلی‌مورفیسم، اینترلوکین-۶، rs1800795

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۷

آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۰۵/۲۲

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۳۰

مقدمه

در بیماران بستری در بیمارستان، گزارش شده است. در حال حاضر، فرض بر این است که در بیماران آلوده به SARS-CoV-2، پاسخ پیش التهابی بیش از حد میزبان منجر به القاء وضعیت آسیب ایمنی و در نتیجه آسیب حاد ریه و سندرم دیسترس تنفسی حاد می شود (۹-۱۱). به عنوان مثال، آزادسازی بیش از حد سایتوکاین و کموکاین، به اصطلاح "طوفان سایتوکاین"، به وضوح منعکس کننده دفاع از تنظیم خارج شده میزبان است (۱۲).

سایتوکاین‌ها، پروتئین‌های کوچک ضروری در سیگنالینگ سلول و به عنوان عوامل تعدیل کننده سیستم ایمنی در بدن انسان وجود دارند. این سیگنال‌های سلولی واسطه بسیاری از فرآیندهای التهابی در ریه‌ها بوده و با پاتوژن انواع اختلالات تنفسی همراه هستند (۱۳). ایترلوکین-6 (IL-6) هم به عنوان سایتوکاین ضد التهابی و هم به عنوان سایتوکاین پیش‌التهابی عمل می‌کند. بسیاری از انواع سلول‌ها، از جمله بیگانه‌خوارهای تک هسته‌ای، سلول‌های اپیتلیال مجاری تنفسی، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیال، لنفوسیت‌های T، ماست‌سل‌ها و پلاسماسل‌های بدخیم ایترلوکین-6 را تولید و بدین ترتیب پاسخ‌های التهابی را میانجی‌گری می‌نمایند. ایترلوکین-6 باعث افزایش هماتوپوئز و ترومبوپوئز می‌شود و همینطور تولید مولکول‌های چسبان را تنظیم می‌کند و باعث القاء ترشح سایر سایتوکاین‌ها، مانند فاکتور نکروز تومور و ایترلوکین-1 می‌شود که متعاقباً آبشار التهابی را تقویت می‌کند (۱۴). این سایتوکاین بیشتر سیستم‌های اصلی بیولوژیکی بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به همین دلیل به عنوان یک شاخص تشخیصی، نشانگر زیستی بیماری و هدف درمانی شناخته شده است. مطالعات متعدد افزایش سطح ایترلوکین-6 در بیماران بستری مبتلا به کووید-19 و ارتباط آن با شدت بیماری و مرگومیر را نشان داده است (۸).

غلظت ایترلوکین-6 تحت تأثیر چندین عامل محیطی و ژنتیکی، از جمله مکان‌های پلی مورفیک در ژن IL-6 قرار می‌گیرد. پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی 174 G/C (rs1800795) در پروموتور IL-6 می‌تواند منجر به تنوع در بیان، غلظت و فعالیت عملکردی آن شوند و می‌تواند

بیماری کرونا ویروس 2019 (COVID-19) به وسیله سندروم حاد تنفسی کرونا ویروس 2 (SARS-CoV-2) به وجود آمد و توسط WHO در تاریخ ۱۱ مارس ۲۰۲۰ به عنوان یک همه‌گیری تشخیص داده شد (۲،۱). این ویروس اولین بار در دستگاه تنفسی بیماران با پنومونی در ووهان چین در دسامبر ۲۰۱۹ به عنوان یک بتاکرونا ویروس جدید تشخیص داده شد. تا ۵ ژانویه ۲۰۲۲، ۲۹۰ میلیون و ۸۷۲ هزار و ۹۸۶ مورد ابتلا به کووید ۱۹ گزارش شده است. شیوع بیماری در کشورهای توسعه یافته، کم‌درآمد و متوسط همچنان در حال گسترش است؛ در حالی که تا بدین تاریخ ۴,۸۵۹,۲۷۷ مرگ و میر در سراسر جهان ثبت شده است. این همه‌گیری بزرگترین شیوع ویروسی در ۱۰۰ سال گذشته از زمان شیوع آنفلوآنزای H1N1 در سال ۱۹۱۸ بوده است به طوری که تا به امروز باعث مرگ بیش از ۵۰ میلیون نفر شده است (۴،۳).

SARS-CoV-2 عمدتاً دستگاه تنفسی تحتانی را آلوده کرده و منجر به ذات‌الریه آتوپیک می‌شود. شایعترین تظاهرات بالینی عفونت COVID-19 تب، خستگی و سرفه خشک است. قابل ذکر است، در ۱۱-۵۳٪ بیماران با عوارض شدید، این پاتوژن باعث سندرم دیسترس تنفسی حاد (ARDS) می‌شود که نیاز به مدیریت خاصی در بخش‌های مراقبت ویژه (ICUs) دارد (۶،۵). همچنین گزارش شده است که علت مرگ عمدتاً نارسایی تنفسی، نارسایی گردش خون یا هر دوی آنها و همچنین تعدادی از دلایل ناشناخته است (۸،۷).

عفونت SARS-CoV-2 پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی را فعال می‌کند. در حالی که یک پاسخ ایمنی سریع و هماهنگ اولین خط دفاعی در برابر عفونت ویروسی را فراهم می‌آورد، پاسخ ذاتی و اکتسابی التهابی بیش از حد می‌تواند باعث آسیب بافتی در محل ورود ویروس و در سطح سیستمیک شود. پاتوفیزیولوژی COVID-19 به طور کامل شناخته نشده است. در سایر عفونت‌های تنفسی مانند آنفلوآنزا و سندرم تنفسی کرونا ویروس (MERS-CoV)، تولید بیش از حد سیتوکاین‌های پیش‌التهابی، از جمله ایترتروفون‌ها (IFNs)، فاکتورهای نکروز دهنده تومور (TNFs)، ایترلوکین‌ها (ILs) و کموکاین‌ها،

نقشی تعیین کننده در ایمونوپاتوژنز انواع بیماری های التهابی مزمن داشته باشد (۱۶،۱۵). یک مطالعه متاآنالیز اظهار کرده است که پلی مورفیسم در ناحیه پروموتور ایترولوکین-۶ با خطر پنومونی (ذات الریه) ناشی از عوامل عفونی در ارتباط است (۱۷). همچنین، مطالعات مختلف ارتباط بین پلی مورفیسم ایترولوکین-۶ با عفونت های شدید ویروسی خاصی مانند هیپاتیت B و C، ویروس آنفلوانزا و همچنین ویروس سنسیشیال تنفسی (RSV)^۱ را گزارش کرده اند (۱۹،۱۸). اخیراً نشان داده شده است که آلل rs1800795 G ایترولوکین-۶ می تواند به عنوان یک عامل محافظتی در برابر سپسیس ناشی از پنومونی در بیماران عمل کند. علاوه بر این، این پلی مورفیسم های ایترولوکین-۶ با مرحله بالینی سپسیس همراه بوده و تأثیر قابل توجهی بر ترشح ایترولوکین-۶ در بیماران دارند (۲۰).

از آنجائی که تاکنون هیچ مطالعه ای پلی مورفیسم ایترولوکین-۶ را در بیماران کووید-۱۹ بررسی نکرده است، بنابراین در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا ارتباط این پلی مورفیسم ژن ایترولوکین-۶ با علائم بیماری در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

جامعه مورد مطالعه

جامعه این پژوهش را بیماران مبتلا به کووید-۱۹ سرپایی (بیماران بدون علامت یا دارای علائم خفیف به نفع کووید-۱۹، علائم حیاتی ثابت، $SPO_2 \geq 93\%$) و بستری در بیمارستان (شامل بیماران متوسط و شدید با شرایط تنگی نفس، احساس درد و فشار در قفسه سینه با یا بدون تب 38 درجه و بیشتر، SPO_2 بین 90% تا 93% و همچنین بیماران خیلی شدید و بحرانی که افراد در ICU و تحت مراقبت های ویژه، با نارسایی تنفسی، $SPO_2 \leq 88\%$ ، شوک، نیازمند تهویه مکانیکی، نارسایی چند ارگانی می باشند) تشکیل داده اند. نتیجه تست PCR و یا سرولوژی بیماران برای SARS-CoV-2 مثبت بود. روش نمونه گیری در دسترس بوده و حجم نمونه شامل 490 بیمار (۲۴۵ نفر گروه سرپایی و 245 نفر گروه بستری) می باشد. در این پژوهش پس از تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه شاهد

تعیین ژنوتیپ

از هر بیمار ۳ سی سی نمونه خون محیطی در لوله های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع آوری شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت Exgene Blood SV (GeneAII، کره جنوبی) انجام شد. پس از استخراج DNA، کیفیت و کمیت آن به وسیله دستگاه نانودراپ، مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی وضعیت پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) مورد نظر، از روش Tetra Arms PCR استفاده شد. در این روش ابتدا پرایمرهای مناسب با توجه به موقعیت SNP طراحی شد و سپس ناحیه مورد نظر تکثیر شد. تکنیک tetra ARMS با نام کامل Tetra-primer Amplification (refractory mutation system) که اصطلاحاً سیستم مقاوم به جهش نیز نامیده می شود، یک روش مبتنی بر PCR برای تشخیص وجود پلی مورفیسم های تک نوکلئوتید (SNP) در ژنوم می باشد. این تکنیک قادر به تفکیک افراد هتروزیگوت و هموزیگوت از لحاظ یک لوکوس ژنی می باشد. یکی از مزیت های این روش این می باشد که نیازی به استفاده از آنزیم های محدود کننده ندارد. به منظور بهینه سازی تکنیک Tetra Arms PCR در مرحله اول برای اطمینان از تکثیر مناسب ناحیه حاوی SNP مورد نظر، PCR فقط با پرایمرهای outer در غلظت و گرادیانتهای دمایی مختلف انجام شد و محصول PCR روی ژل الکتروفورز ران شد. بعد مشخص کردن غلظت و دمای مناسب برای تکثیر پرایمرهای outer همین روند در حضور پرایمرهای inner انجام شد تا بهترین جواب بدست آمد. به صورت خلاصه اطلاعات دقیق در مورد شرایط PCR و پرایمرها و در جداول ۱ الی ۳ قرار گرفته است.

¹ Respiratory Syncytial Virus

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده به منظور انجام Tetra Arms PCR جهت بررسی پلی مورفیسم rs1800795

Primer	Sequences
Forward inner primer (C allele)	5'- CACTTTTCCCCTAGTTGTCTTCCC -3'
Reverse inner primer (G allele)	5'- ATTGAGCAATGTAACGTCCTTTAGCTTC-3'
Forward outer primer	5'- CAATACATGCCAATGTGCTGAGTCACTA -3'
Reverse outer primer	5'- AGAATGATCCTCAGTCATCTCCAGTCCT -3'

جدول ۲. غلظت و حجم مواد مورد استفاده به منظور واکنش Tetra Arms PCR

حجم مواد	غلظت	مواد واکنش
2 µL	-	Distillation Water
10 µL	2X	TEMPase Hot Start Master Mix (Amplicon, Danmark)
2 µL	10 pmol	Forward inner primer
2 µL	10 pmol	Reverse inner primer
1 µL	10 pmol	Forward outer primer
1 µL	10 pmol	Reverse outer primer
2 µL	10-100 ng/µL	Genomic DNA
20 µL	-	Total Volume

جدول ۳. شرایط دمایی مورد استفاده به منظور واکنش Tetra Arms PCR

تکرار	زمان	دما
یک بار تکرار	۱۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتیگراد
۳۸ بار تکرار	۳۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتیگراد
	۳۰ ثانیه	۵۸ درجه سانتیگراد
	۶۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتیگراد
یک بار تکرار	۵ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد
∞	نگهداری	۱۲ درجه سانتیگراد

میلی لیتر EDTA در حجم نهایی یک لیتر بدست آمد. سپس با ترکیب نسبت های یک واحد بافر TBE با غلظت X۰/۵ و ۹ واحد آب دیونیزه، بافر TBE با غلظت X۰/۵ ساخته شد. مواد و تجهیزات مورد استفاده به منظور انجام ژل الکتروفورز در جدول ۴ آورده شده است.

در مرحله بعد به منظور دست یافتن به نتیجه نهایی و ارزیابی وضعیت SNP، محصولات حاصل از آزمایش Tetra Arms PCR را روی ژل ۲ درصد آگارز run کردیم. به منظور تهیه ژل آگارز ۲ درصد ابتدا بافر TBE با غلظت X۵ تهیه شد. بافر TBE با غلظت X۵ از ترکیب ۵۴ گرم Tris Base و ۲۷/۵ گرم Boric Acid و ۴۰

جدول ۴. مواد و تجهیزات مورد استفاده به منظور انجام ژل الکتروفورز

شرکت سازنده	Catalog Number	مواد و تجهیزات مورد استفاده
Merck Millipore	648310	Tris Base
Merck Millipore	2710-1KG	Boric Acid
Merck Millipore	324506-100ML	EDTA
---	---	Distillation Water
Yekta Tajhiz Azma	YT0001	Safe stain / Green viewer
Takara	9156	6X Loading Buffer
Invitrogen	16500500	UltraPure Agarose

تجزیه و تحلیل آماری

استفاده شد. همچنین از رگرسیون لجستیک یک و چند متغیره برای بررسی رابطه بین پلی مورفیسم و شانس ابتلا به بیماری کرونا استفاده شد در تجلیل چند متغیره جنسیت، سیگار کشیدن، ابتلا به بیماری فشار خون، دیابت، بیماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۴) صورت گرفت. با توجه به وضعیت داده ها، جهت مقایسه فراوانی ژنوتیپ مورد نظر از آزمون کای دو و برای مقایسه سن افراد در دو گروه از آزمون تی مستقل

بیماران و به تفکیک گروه بندی (سرپایی و بستری) در جدول ۵ نشان داده شده است. فراوانی افراد سیگاری و بیماران دچار مشکلات کلیوی ($P\text{-value} < 0.05$) و همینطور بیماران مبتلا به فشار خون، دیابت ملیتوس و دارای سابقه بیماری قلبی ($P\text{-value} < 0.001$) در گروه‌های مختلف سرپایی و بستری اختلاف معنی داری وجود داشت.

قلبی-عرقی، بیماری کلیه و به عنوان متغیرهای مخدوشگر وارد مدل شد. مقادیر $P\text{-value}$ کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

خصوصیات دموگرافیک و بالینی افراد بیمار

میانگین سن بیماران در گروه سرپایی $۱۲/۳ \pm ۴/۱$ سال ولی در گروه بیماران بستری، $۱۷/۱ \pm ۶/۰$ سال بود ($P\text{-value} < 0.001$)، سایر اطلاعات دموگرافیک کل

جدول ۵. اطلاعات دموگرافیک بیماران مبتلا به COVID-19

	Groups	Outpatient (n=245)		Inpatient (n=245)		P-value
		N	%	N	%	
sex	Female	97	39.6%	100	40.8%	0.782
	Male	148	60.4%	145	59.2%	
smoking	No	234	95.5%	220	89.8%	0.015
	Yes	11	4.5%	25	10.2%	
HTN	No	219	89.5%	143	58.4%	<0.001
	Yes	26	10.6%	102	41.6%	
DM	No	226	92.2%	167	68.2%	<0.001
	Yes	19	7.8%	78	31.8%	
CVA	No	245	100%	232	94.7%	<0.001
	Yes	0	0.0%	13	5.3%	
RD	No	237	96.7%	226	92.2%	0.029
	Yes	8	3.3%	19	7.8%	

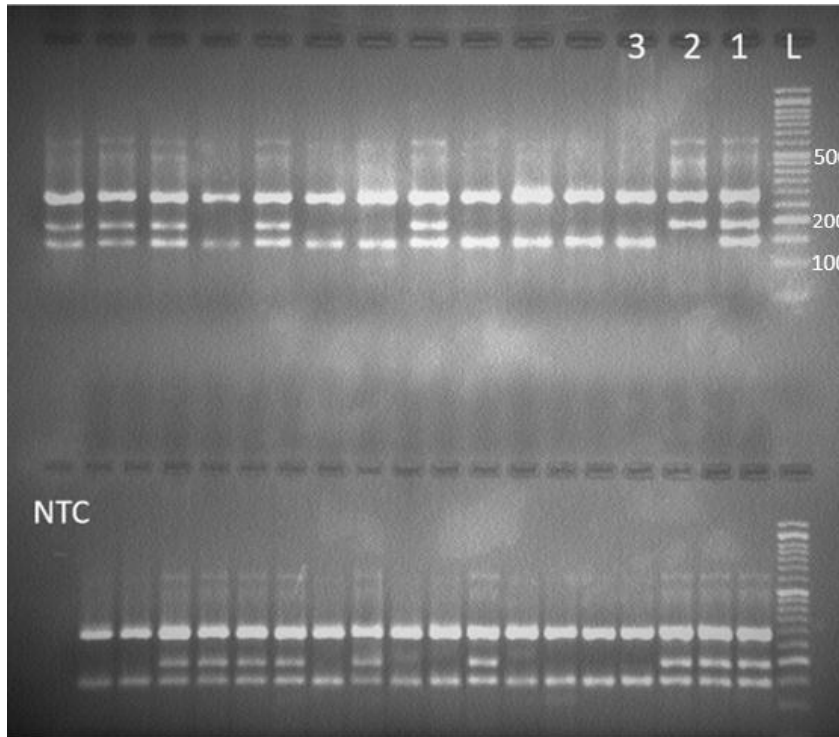
Outpatient: سرپایی، Inpatient: بستری، HTN: بیماری فشار خون، DM: دیابت ملیتوس، CVA: سابقه بیماری قلبی، RD: بیماری کلیوی. آنالیز آماری با استفاده از آزمون کای دو انجام شد و مقادیر $P\text{-value}$ کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

صورت وجود آلل C محصولی به طول ۲۰۶bp و در صورت بروز حالت هتروزیگوت بر روی ژل دیده می‌شود. همچنین طول قطعه تکثیر شده برای پرایمر های outer، 306bp بود که به عنوان قطعه کنترل تست عمل می‌کند. حدود ۱۰ درصد از نمونه‌ها به منظور اطمینان از صحت انجام Tetra Arms PCR مورد تعیین توالی قرار گرفتند. نتایج حاصل از تعیین توالی بعد از هم ردیف سازی در شکل ۲ آورده شده است.

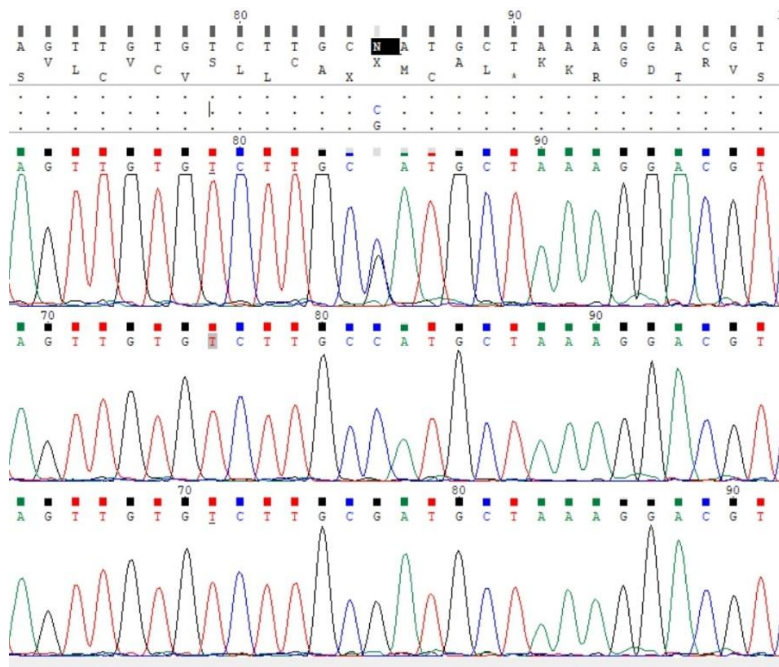
همانطور که در جدول ۵ ارائه شده است، بیماران در گروه‌های مختلف شدت بیماری، از نظر سن تفاوت معنی دار دارند ($P\text{-value} < 0.001$) و میانگین سن بیماران در گروه سرپایی $۴/۱ \pm ۱۲/۳$ سال ولی در گروه بیماران بستری، ۶۰ سال است.

فراوانی ژنوتیپ

نمونه‌ای از الکتروفورز ۲۹ محصول PCR، بعد از انجام Tetra Arms PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. در صورت وجود آلل G محصولی با طول قطعه ۱۵۵bp و در



شکل ۱. الکتروفورز محصولات Tetra Arms PCR به منظور بررسی وضعیت آللی SNP نمونه‌های ۱ تا ۳ کنترل می‌باشند. در صورت وجود آلل G طول قطعه 155bp و در صورت وجود آلل C طول قطعه 206bp می‌باشد. همچنین طول قطعه تکثیر شده برای پرایمرهای outer 306bp خواهد بود که به عنوان قطعه کنترل تست عمل می‌کند. ۱: C allele 2: G allele 3: C/G allele. چاهک NTC کنترل منفی می‌باشند. همچنین چاهک L نیز نشان دهنده ladder50 می‌باشد.



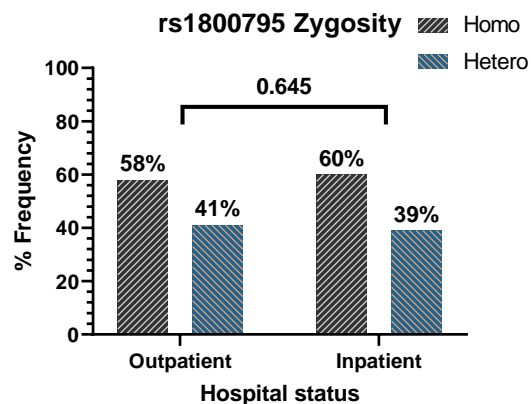
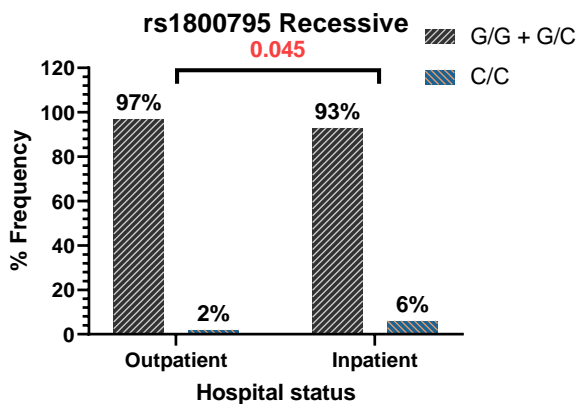
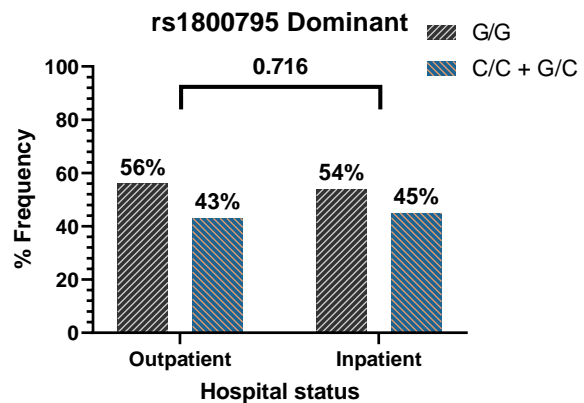
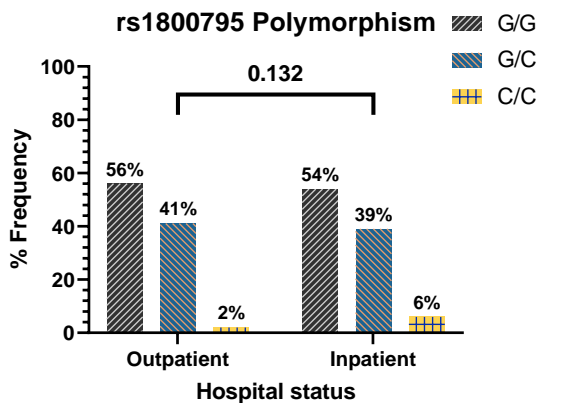
شکل ۲. نتایج حاصل از توالی‌یابی محصولات PCR ناحیه حاوی rs1800795 جهت تایید نتایج تست tetra-ARMS PCR. نوکلئوتید چند شکلی با رنگ مشکی مشخص شده است.

در مطالعه حاضر، همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، فراوانی ژنوتیپ‌ها بین گروه‌های سرپایی و بستری در مدل IL-6 Recessive که بیماران بر اساس فنوتیپ می‌گیرند تفاوت معنی‌دار دیده می‌شود (P-value=0.045). در گروه بیماران سرپایی ۹۷/۶٪

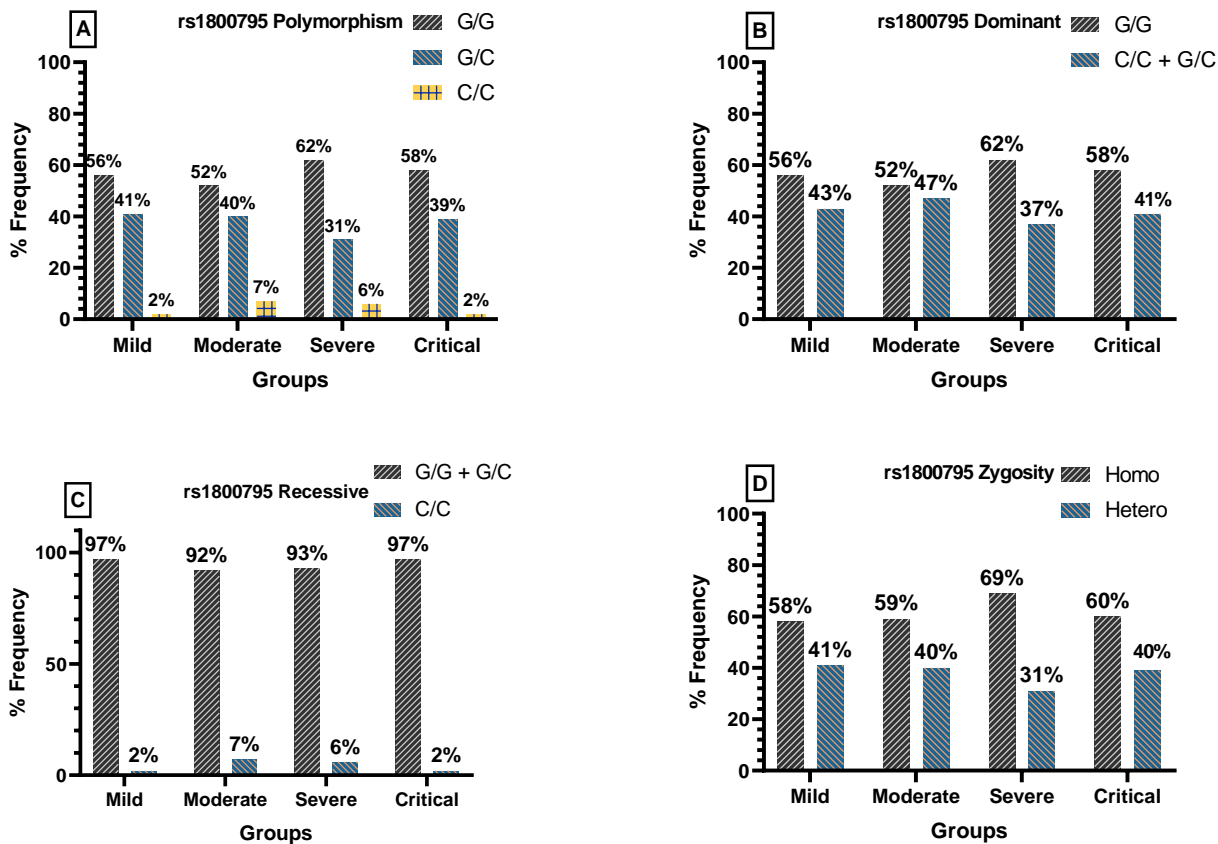
در مطالعه حاضر، همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، فراوانی ژنوتیپ‌ها بین گروه‌های سرپایی و بستری در مدل IL-6 Recessive که بیماران بر اساس فنوتیپ

تاثیر دارد و بیماران با این ژنوتیپ کمتر بستری می‌شوند. همچنین نتایجی که در نمودار ۲ ارائه شده است، نشان می‌دهد فراوانی ژنوتیپ‌ها بین گروه‌های سرپایی، بستری، بستری در ICU و بستری در ICU و انتوبه شده دارای تفاوت معنی‌داری نمی‌باشد.

افراد دارای ژنوتیپ (G/G یا G/C) و ۲/۴٪ افراد دارای ژنوتیپ (C/C) می‌باشند ولی در گروه بیماران بستری ۹۳/۹٪ افراد دارای ژنوتیپ (G/G یا G/C) و ۶/۱٪ افراد دارای ژنوتیپ (C/C) می‌باشند. این تفاوت نشان دهنده این موضوع است که آلل G در کاهش شدت علائم بالینی



نمودار ۱. مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs1800795 بیماران مبتلا به COVID-19 بین گروه‌های سرپایی و بستری: A. مقایسه بین فراوانی ژنوتیپ‌های rs1800795. B. مقایسه فراوانی فنوتیپ‌های rs1800795 در صورت غالب بودن آلل C (dominant). C. مقایسه فراوانی فنوتیپ‌های rs1800795 در صورت مغلوب بودن آلل C (Recessive). D. مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها در مدل IL-6 Zygosity. آنالیز آماری با استفاده از آزمون کای دو انجام شد و مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.



نمودار ۲. مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs1800795 در بیماران مبتلا به COVID-19 بر اساس شدت بیماری

بیماران مبتلا به کوید-۱۹ سرپایی در گروه با علائم خفیف (Mild)، بستری در بخش به عنوان گروه بیماران با علائم متوسط (Moderate)، بستری در بخش ICU که انتوبه نشده اند در گروه بیماران با علائم شدید (Severe) و بستری در ICU و انتوبه شده در گروه بحرانی (Critical) قرار گرفتند. A: مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها بر اساس شدت بیماری. B: مقایسه فراوانی فنوتیپ‌های rs1800795 در صورت غالب بودن آلل C (dominant). C: مقایسه فراوانی فنوتیپ‌های rs1800795 در صورت مغلوب بودن آلل C (Recessive). D: مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها در مدل IL-6 Zygosity. آنالیز آماری با استفاده از آزمون کای دو انجام شد و مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

ژنوتیپ GG و CG دارند اما این اختلاف معنی دار نمی‌باشد (OR: 3.08, P-value: 0.077). با افزایش تعداد نمونه می‌توان شاهد معنی‌داری در شانس ابتلا بود و از آن برای پیش‌بینی استفاده کرد.

در ادامه از مدل رگرسیون لجستیک برای تجزیه و تحلیل ارتباط بین ژنوتیپ‌های rs1800795 و شانس ابتلاء به بیماری کوید-۱۹ استفاده شد (جدول ۶). با توجه به نتایج، در مدل IL-6 Recessive(C/C)، افراد با ژنوتیپ C/C شانس ابتلاء به بیماری بالاتری نسبت به افراد با

جدول ۶. تجزیه و تحلیل رگرسیون لجستیک تک و چند متغیره عوامل خطر پلی مورفیسم rs1800795 برای بیماران مبتلا به COVID-19

	Univariate Logistic regression				Multiple Logistic regression			
	P-value	OR	95% CI		P-value	OR	95% CI	
			Lower	Upper			Lower	Upper
IL-6 Polymorphism(G/C)	0.909	0.979	0.678	1.413	0.335	0.797	0.503	1.263
IL-6 Polymorphism(C/C)	0.058	2.575	0.97	6.834	0.11	2.806	0.791	9.956
IL-6 Dominant (G/C + C/C)	0.716	1.068	0.748	1.526	0.567	0.877	0.561	1.373
IL-6 Recessive(C/C)	0.052	2.598	0.991	6.811	0.077	3.085	0.885	10.756
IL-6 Zygosity(Hetero)	0.645	0.919	0.64	1.318	0.217	0.751	0.477	1.183

رگرسیون لجستیک چند متغیره با جنس، سیگار کشیدن، ابتلا به بیماری فشار خون بالا، دیابت، بیماری قلبی-عروقی، بیماری کلیه و سن تنظیم شده. OR = شانس ابتلا، CI =فاصله اطمینان

بحث

SARS-CoV-2 عمدتاً دستگاه تنفسی تحتانی را آلوده کرده و منجر به ذات‌الریه آتوپیک می‌شود. شایعترین تظاهرات بالینی عفونت COVID-19 تب، خستگی و سرفه خشک است. قابل ذکر است، در ۱۱-۵۳٪ بیماران با عوارض شدید، این پاتوژن باعث سندرم دیسترس تنفسی حاد (ARDS) می‌شود که نیاز به مدیریت خاصی در بخش‌های مراقبت ویژه (ICUs) است. همچنین گزارش شده است که علت مرگ عمدتاً نارسایی تنفسی، نارسایی گردش خون یا هر دوی آن‌ها و همچنین تعدادی از دلایل ناشناخته است. پاتوفیزیولوژی COVID-19 به طور کامل شناخته نشده است. در سایر عفونت‌های تنفسی مانند آنفلوآنزا و سندرم تنفسی کرونا ویروس (MERS-CoV)، تولید بیش از حد سیتوکین‌های پیش‌التهابی، از جمله اینترفرون‌ها (IFNs)، فاکتورهای نکروز دهنده تومور (TNFs)، اینترلوکین‌ها (ILs) و کموکاین‌ها، در بیماران بستری در بیمارستان، گزارش شده است. در حال حاضر، فرض بر این است که در بیماران آلوده به SARS-CoV-2، پاسخ پیش‌التهابی بیش از حد میزبان منجر به القاء وضعیت آسیب ایمنی و در نتیجه آسیب حاد ریه و سندرم دیسترس تنفسی حاد می‌شود. اینترلوکین-6 هم به عنوان سایتوکاین ضد التهابی و هم به عنوان سایتوکاین پیش‌التهابی عمل می‌کند. غلظت اینترلوکین-6 تحت تأثیر چندین عامل محیطی و ژنتیکی، از جمله مکان‌های پلی‌مورفیک در ژن IL-6 قرار می‌گیرد. پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (rs1800795) G/C-174 در پروموتور IL-6 می‌تواند منجر به تغییر بیان و غلظت آن شود، و می‌تواند نقشی تعیین‌کننده در ایمونوپاتوژنز انواع بیماری‌های التهابی مزمن داشته باشد. از آنجائی که تاکنون هیچ مطالعه‌ای پلی‌مورفیسم اینترلوکین-6 را در بیماران کووید-19 در ایران بررسی نکرده است، بنابراین در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا این پلی‌مورفیسم ژن اینترلوکین-6 و ارتباط آن با علائم بیماری در بیماران مبتلا به کووید-19 را مورد بررسی قرار دهیم. نتایج این مطالعه نشان داد که میانگین سن بیماران در گروه سرپایی کمتر از بیماران بستری بود. همچنین فراوانی افراد سیگاری و بیماران مبتلا به مشکلات کلیوی، فشار خون، دیابت ملیتوس و دارای

سابقه بیماری قلبی در گروه‌های سرپایی و بستری اختلاف معنی‌داری وجود داشت. از نظر فراوانی واریانت‌های rs1800795 در گروه‌ها، درصد بالاتری از بیماران سرپایی به نسبت بیماران بستری دارای آلل G بودند. اینترلوکین-6، یک سایتوکاین پیش‌التهابی، به عنوان اولین پاسخ دهنده به پاسخ ایمنی سلولی ذاتی به عفونت عمل می‌کند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که چندین SNP در ناحیه پروموتور IL-6 وجود دارد. پلی‌مورفیسم rs1800795، که شامل تبدیل نوکلئوتید G به C است، در موقعیت 174- در این منطقه خاص به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات قبلی این SNP را برای افزایش سطح IL-6 در پلاسما گزارش کرده‌اند. رونویسی و سطوح پلاسمایی IL-6 در ناحیه پروموتور آن از طریق یک پلی‌مورفیسم دو آللی در یک مطالعه آزمایشگاهی نشان داده شده است (۲۱).

نتایج مطالعه حاضر در ابعاد مختلف قابل مقایسه با سایر مطالعات در مورد کووید-19 و همچنین مطالعات پیشین مربوط به دیگر بیماری‌ها می‌باشد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که پلی‌مورفیسم rs1800795 اینترلوکین-6 با شدت بیماری ارتباط دارد و بیماران دارای آلل G در گروه بیماران سرپایی قرار می‌گیرند. مطابق با یافته این مطالعه، در یک مطالعه که توسط Zheng-Rong Mao و همکاران انجام شد، مشاهده شده است که آلل G این پلی‌مورفیسم می‌تواند به عنوان یک عامل محافظتی عمل کند. علاوه بر این، نشان داده شده است که این پلی‌مورفیسم با مرحله بالینی سپسیس مرتبط است و بر سطوح رونویسی IL-6 در بیماران تأثیر می‌گذارد. پاسخ التهابی به عفونت نقش اساسی در سپسیس دارد. به طور معمول، پاسخ التهابی با انعقاد عروقی در پاتوژنز سپسیس فعال می‌شود. تولید سایتوکاین‌های التهابی روند انعقاد در سیستم گردش خون را تسریع می‌کند و در نهایت منجر به سندرم اختلال عملکرد چندگانه می‌شود. تجزیه و تحلیل اطلاعات و مطالعات قبلی نشان دهنده این موضوع است که گروه‌های پلی‌مورفیک IL-6 با ژنوتیپ CC سطح بالاتری از mRNA را در مونوسیت‌های خود بیان می‌کنند. نتایج آن‌ها نشان داده است که آلل G در rs1800795 با کاهش بیان محصولات رونویسی برای IL-6 همراه

ریسک فاکتور برای بیماران در نظر گرفت (۲۴). در حالیکه در مطالعه ما مشاهده شد که ژنوتیپ **G/G** با بقاء بالاتر بیماران همراه است و این تفاوت ممکن است به دلیل تعداد پایین افراد شرکت کننده در مطالعه و همینطور طبقه‌بندی بیماران بر اساس ابتلاء به **MAS** باشد. به دلیل بدحالی بیماران در **ICU** و اینتوبه شده امکان نمونه‌گیری از این بیماران به آسانی وجود نداشت و بدین علت تعداد بیماران گروه **severe** و **critical** در این مطالعه کم است و پیشنهاد می‌شود این مطالعه روی تعداد بیشتری از بیماران انجام شود تا نتایج را بتوان با دقت و اطمینان بیشتری گزارش کرد. از طرف دیگر، به علت تنوع درمان‌ها در اوایل پاندمیک و عدم دسترسی کامل به پرونده‌های درمانی بیماران، در این مطالعه امکان بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم با پاسخ به درمان وجود نداشت و پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده این ارتباط مورد مطالعه قرار بگیرد.

نتیجه گیری

در این مطالعه نشان داده شد که فراوانی واریانت‌ها در پلی‌مورفیسم **rs1800795** اینترلوکین-۶ در گروه‌های مختلف بیماران کووید-۱۹ با شدت علائم بالینی مختلف (سرپایی و بستری)، با یکدیگر تفاوت دارند و درصد بستری شدن در گروه‌های با ژنوتیپ‌های **GG** و **CG** کمتر از گروه با ژنوتیپ **CC** می‌باشد. از یافته فوق می‌توان نتیجه گرفت که افراد با ژنوتیپ **C/C** ریسک بالاتری نسبت به افراد با ژنوتیپ **GG** و **CG** در احتمال بستری شدن دارند و باید این گروه بیشتر مورد توجه قرار گیرند و در صورت ابتلا جزء گروه‌های پرخطر قرار گیرند.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش دارای تاییدیه کمیته اخلاق دانشگاه شاهد (**IR.Shahed.REC.1400.127**) و رضایت‌نامه کتبی از بیمار، با استفاده از پرسش‌نامه اطلاعات دموگرافیک و بالینی است.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

می‌باشد. بر اساس اثر مشاهده شده‌ی **IL-6** در فرآیندهای پاسخ ایمنی، محققان این **SNP** را به عنوان یک عامل خطر ارثی در بیماران شوک سپتیک در نظر گرفته‌اند (۲۰). همسو با نتایج ما، یک مطالعه‌ی متاآنالیز برای ارتباط پلی‌مورفیسم ژن **IL6** با استعداد و شدت بیماری پنومونی انجام شد که نشان داده است که وضعیت ناقل آلل **IL6 174C** با تولید بالای **IL-6** و شدت ذات‌الریه را مرتبط می‌باشد (۱۷). همچنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط **Maria Angeles Jiménez** و همکاران در سال ۲۰۱۷ به منظور تجزیه و تحلیل ارتباط بین پلی‌مورفیسم **rs1800795** اینترلوکین-۶ با مرگ ناشی از شوک سپتیک بر روی ۲۰۲ بیمار شوک سپتیک که تحت عمل جراحی قلب یا شکم قرار گرفته بودند انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که بیماران با ژنوتیپ **CC rs1800795** اینترلوکین-۶ میزان مرگ و میر بالاتری نسبت به ژنوتیپ **GG / CG rs1800795** داشتند. همچنین ژنوتیپ **CC rs1800795** اینترلوکین-۶ با خطر بالاتر مرگ ناشی از شوک سپتیک همراه بود (۲۲). این یافته نیز با مطالعه ما که نشان داد این پلی‌مورفیسم در شدت علائم بالینی موثر است، تطابق دارد. در مطالعه‌ای دیگر که نتایج آن هم سو با نتایج مطالعه ما بود، **Walaa Aboulkasem Shahin** و همکاران در سال ۲۰۱۶ ارتباط پلی‌مورفیسم ژنی **G/C IL6-174** با نتیجه سپسیس در ۶۰ کودک بستری در بخش‌های مراقبت ویژه کودکان را انجام دادند. آن‌ها مشاهده کردند که سطح اینترلوکین-۶ در بیماران مبتلا به سپسیس افزایش می‌یابد و از نقش آن در پاتوژنز سپسیس پشتیبانی می‌کند. همچنین پلی‌مورفیسم ژن **rs1800795 CC / CG** ممکن است در پیش آگهی و نتیجه سپسیس نقش داشته باشد (۲۳). از طرف دیگر در مطالعه‌ی **Ferhan Kerget** و همکاران در سال ۲۰۲۱ در ترکیه که فراوانی پلی‌مورفیسم **rs1800795** بر روی ۷۰ بیمار مبتلا به **COVID-19** بررسی شد، که از این تعداد ۴۰ بیمار دچار سندرم فعال‌شدن ماکروفاژ (**MAS**) بودند. آن‌ها مشاهده کردند تفاوت قابل ملاحظه‌ای در ژنوتیپ **G/G** در افراد **MAS** نسبت به افرادی که دچار **MAS** نیستند، وجود دارد. در نتیجه افرادی که ژنوتیپ **G/G** را دارند، سطح **IL-6** سرمی بالاتری دارند و می‌تواند به عنوان

1. Millán-Oñate J, Rodriguez-Morales AJ, Camacho-Moreno G, Mendoza-Ramírez H, Rodríguez-Sabogal IA, Álvarez-Moreno CJI. A new emerging zoonotic virus of concern: the 2019 novel Coronavirus (SARS CoV-2). *2020;24(3):187-92.*
2. Fan W, Su Z, Bin Y, Yan-Mei C, Wen W, Zhi-Gang S, et al. Holmes Edward C., Zhang Yong-Zhen. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature 2020;579(7798):265-9.*
3. Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920" Spanish" influenza pandemic. *Bulletin of the History of Medicine 2002;105-15.*
4. Short KR, Kedzierska K, van de Sandt CE. Back to the future: lessons learned from the 1918 influenza pandemic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2018;8:343.*
5. Wu Z, McGoogan JMJJ. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention *2020;323(13):1239-42.*
6. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Liu H, Wu Y, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study 2020.
7. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China *2020;46(5):846-8.*
8. Rostamian A, Ghazanfari T, Arabkheradmand J, Edalatifard M, Ghaffarpour S, Salehi MR, et al. Interleukin-6 as a Potential Predictor of COVID-19 disease severity in hospitalized patients and its association with clinical laboratory routine tests. *Immunoregulation 2020;3(1):29-36.*
9. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet 2020;395(10223):497-506.*
10. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respiratory Medicine 2020;8(4):420-2.*
11. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature 2020;579(7798):265-9.*
12. Catanzaro M, Fagiani F, Racchi M, Corsini E, Govoni S, Lanni CJST, et al. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2020;5(1):1-10.*
13. Kirtipal N, Bharadwaj SJJBS, Dynamics. Interleukin 6 polymorphisms as an indicator of COVID-19 severity in humans. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 2021;12:1-4.*
14. Terry CF, Loukaci V, Green FRJJB. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry 2000;275(24):18138-44.*
15. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry 2000;275(24):18138-44.*
16. Babusikova E, Jurecekova J, Jesenak M, Evinova A. Association of gene polymorphisms in interleukin 6 in infantile bronchial asthma. *Archivos de Bronconeumología (English Edition) 2017;53(7):381-6.*
17. Ulhaq ZS, Soraya GV. Anti-IL-6 receptor antibody treatment for severe COVID-19 and the potential implication of IL-6 gene polymorphisms in novel coronavirus pneumonia. *Medicina Clinica 2020;155(12):548.*
18. Doyle WJ, Casselbrant ML, Li-Korotky H-S, Cullen Doyle AP, Lo C-Y, Turner R, et al. The interleukin 6-174 C/C genotype predicts greater rhinovirus illness. *The Journal of Infectious Diseases 2010;201(2):199-206.*
19. Riazalhosseini B, Mohamed Z, Apalasy YD, Shafie NS, Mohamed R.

- Interleukin-6 gene variants are associated with reduced risk of chronicity in hepatitis B virus infection in a Malaysian population. *Biomedical Reports* 2018;9(3):213-20.
20. Mao Z-R, Zhang S-L, Feng B. Association of IL-10 (-819T/C,-592A/C and-1082A/G) and IL-6-174G/C gene polymorphism and the risk of pneumonia-induced sepsis. *Biomarkers* 2017;22(2):106-12.
 21. Palumbo AA, Forte G, Pileri D, Vaccarino L, Conte F, D'Amelio L, et al. Analysis of IL-6, IL-10 and IL-17 genetic polymorphisms as risk factors for sepsis development in burned patients. *Burns* 2012;38(2):208-13.
 22. Jiménez-Sousa MA, Medrano LM, Liu P, Fernandez-Rodriguez A, Almansa R, Gomez-Sanchez E, et al. IL-6 rs1800795 polymorphism is associated with septic shock-related death in patients who underwent major surgery: a preliminary retrospective study. *Annals of Intensive Care* 2017;7(1):1-9.
 23. Shahin W, Abdel Meguid I, Elhamamsy K, Shaker O. IL6-174 G/C Gene Polymorphism in Children with Septicemia: Single Center Study. *Journal of Pediatrics & Neonatal Care* 2016;4(5):00156.
 24. Kergel F, Kergel B. Frequency of interleukin-6 rs1800795 (-174G/C) and rs1800797 (-597G/A) polymorphisms in COVID-19 patients in Turkey who develop macrophage activation syndrome. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2021:JJID. 2021.046.