

Study on the association between interleukin-6 receptor Asp358Ala (rs2228145) single nucleotide polymorphism, with the severity of clinical symptoms in patients with COVID-19

Azadeh Rashidi¹, Sara Ghaffarpour², Mohammad Saber Zamani³,
Mohammad Mehdi Naghizadeh⁴, Tooba Ghazanfari²

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: Rashidi A, Ghaffarpour S, Zamani MS, Naghizadeh MM, Ghazanfari T. Study on the association between interleukin-6 receptor Asp358Ala (rs2228145) single nucleotide polymorphism, with the severity of clinical symptoms in patients with COVID-19. Daneshvar Medicine 2022; 30(1):1-11. doi: 10.22070/daneshmed.2022.15135.1121

Abstract

Background and Objective: Increasing of interleukin-6 (IL-6) in Covid-19 patients has been reported in various studies. Genetic variants of the IL-6 receptor are involved in the beginning and progression of severe infections, autoimmunity, and also inflammatory diseases. The aim of this study was to investigate the association between SNP (rs2228145) of IL-6 receptor with the severity of Covid-19 patients.

Materials and Methods: In the present cross-sectional and analytical study, 180 patients with Covid-19 entered voluntarily and were classified based on the severity of the disease in 4 groups: mild (90 patients, age 46.40 ± 15.8), moderate (45 patients, age 50.4 ± 16.4), severe (25 patients, age 59.70 ± 24) and critical (20 patients, age 15.30 ± 60.8). Peripheral blood samples were taken from patients and after DNA extraction, genotyping was performed by RFLP PCR and electrophoresis on 2% agarose gel. Data were analyzed using SPSS software and Chi-Square or ANOVA.

Results: The mean age of patients in the outpatient group and the intubated inpatients were 46.40 ± 15.8 and 60.30 ± 15.8 , respectively (P-value <0.001). Also, the frequency of diabetic patients in the outpatient group and intubated group were about 21% and 45%, respectively (P-value <0.05). A significant difference was observed in the CC genotype between outpatient and inpatient groups (P-value <0.01) as well as intubated patients (P-value <0.05).

Conclusion: The frequency of rs2228145 variants in Covid-19 patients with different severity is diverse and CC genotype can be a predictor of prognosis in admission to the ICU and intubation.

Keywords: Covid-19, Polymorphism, Interleukin-6 receptor, rs2228145

Received: 17 Jan 2022

Last revised: 10 Apr 2022

Accepted: 24 Apr 2022

بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی Asp358Ala (rs2228145) گیرنده اینترلوکین-۶، با شدت علائم بالینی در بیماران مبتلا به کووید-۱۹

نویسندگان: آزاده رشیدی^۱، سارا غفارپور^۲، محمدصابر زمانی^۳، محمد مهدی نقی زاده^۴، طوبی غضنفری^۲

مقاله پژوهشی

۱. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ های 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 بیماری های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

Email: tghazanfari@yahoo.com

*نویسنده مسئول: طوبی غضنفری

چکیده

مقدمه و هدف: افزایش و نقش اینترلوکین-۶ در پاتوژنز کووید-۱۹ در مطالعات مختلف گزارش شده است. واریانت های ژنتیکی اینترلوکین-۶ و گیرنده آن در شروع و پیشرفت عفونت های شدید مانند کووید-۱۹، بیماری های خودایمنی و التهابی نقش دارند. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (rs2228145) گیرنده اینترلوکین-۶، با شدت علائم بالینی در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ می باشد.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر ۱۸۰ بیمار مبتلا به کووید-۱۹ به صورت داوطلبانه وارد و بر اساس شدت بیماری در ۴ گروه خفیف (۹۰ نفر، سن ۶۷/۴۰±۱۵/۸)، متوسط (۴۵ نفر، سن ۵۹/۵۰±۱۶/۴)، شدید (۲۵ نفر، سن ۵۹/۷۰±۲۴) و بحرانی (۲۰ نفر، سن ۶۰/۳۰±۱۵/۸) قرار گرفتند. نمونه خون محیطی از بیماران تهیه و پس از استخراج DNA، به وسیله روش PCR RFLP (آنزیم محدود الاثر HindIII) و الکتروفورز روی ژل آگارز ۲٪، تعیین ژنوتیپ شدند. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری Chi-Square یا ANOVA انجام شد. مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج: میانگین سن بیماران در گروه سرپایی ۶۷/۴۰±۱۵/۸ ولی در گروه بیماران بستری در ICU و اینتوبه شده، ۶۰/۳۰±۱۵/۸ بود (P-value<0.001); همچنین فراوانی بیماران دیابتی در گروه سرپایی حدود ۲۱٪ ولی در گروه بستری در ICU و اینتوبه شده ۴۵٪ بود (P-value<0.05). از نظر فراوانی واریانت ها در گروه ها، تفاوت معنی داری در ژنوتیپ CC بین گروه های سرپایی و بستری (P-value<0.01) و همچنین بستری در ICU و اینتوبه شده (P-value<0.05) مشاهده شد.

نتیجه گیری: فراوانی واریانت ها در پلی مورفیسم rs2228145 گیرنده اینترلوکین-۶ در گروه های مختلف بیماران کووید-۱۹ با شدت علائم بالینی مختلف، با یکدیگر تفاوت دارد و ژنوتیپ CC می تواند پیش بینی کننده پیش آگهی این بیماران در عدم ورود به ICU و اینتوبه شدن گردد.

واژه های کلیدی: کووید-۱۹، پلی مورفیسم، گیرنده اینترلوکین-۶، rs2228145

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۷
آخرین اصلاح ها: ۱۴۰۱/۱۰/۲۱
پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۰۴

مقدمه

ترتیب پاسخ‌های التهابی را میانجی‌گری می‌نمایند. اینترلوکین-۶ تولید مولکول‌های چسبان را تنظیم می‌کند و باعث القاء ترشح سایر سایتوکاین‌ها، مانند فاکتور نکروز تومور و اینترلوکین-۱ می‌شود که متعاقباً آبشارالتهابی را تقویت می‌کند (۱۲). این سایتوکاین بیشتر سیستم‌های اصلی بیولوژیکی بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد و بدین ترتیب به عنوان یک شاخص تشخیصی، نشانگر زیستی بیماری و هدف درمانی شناخته شده است. مطالعات متعدد افزایش سطح اینترلوکین-۶ در بیماران بستری مبتلا به کووید-۱۹ و ارتباط آن با شدت بیماری و مرگ و میر را نشان داده است (۶).

سیگنالینگ اینترلوکین-۶ و گیرنده آن از دوسمیر اتفاق می‌افتد. مسیر کلاسیک در سلول‌هایی رخ می‌دهد که IL-6R و gp130 را بیان می‌کنند. IL-6R یک گیرنده غیر سیگنال است که به IL-6 متصل می‌شود؛ درحالی‌که زیر واحد gp130 کمک گیرنده انتقال دهنده سیگنال برای IL-6 است. یک فرم محلول از گیرنده اینترلوکین-۶ (sIL6R) با پروتئولیز و اسپلایسینگ mRNA IL6R از سطح سلول آزاد می‌شود و می‌تواند با اتصال به اینترلوکین-۶، یک مجموعه آگونیستی تشکیل دهد و از طریق gp130 سیگنال رسانی را انجام دهد (ترنس سیگنالینگ). این مکانیسم انتقال سیگنال به IL-6 اجازه می‌دهد تا بر روی سلول‌هایی که فاقد IL-6R هستند نیز، سیگنال رسانی را انجام دهد (۱۳).

نقش واریانت‌های ژنتیکی در گیرنده اینترلوکین-۶ در علت شناسی بیماری‌های انسانی با مطالعات ژنتیکی که ارتباط واریانت‌های ژن را با خطر ابتلا به چندین بیماری التهابی، از جمله بیماری کرونر قلب، آرتریت روماتوئید، فیبریلاسیون دهلیزی، آنوریسم آئورت شکمی و آسم را گزارش کرده‌اند، اثبات شده است (۱۴). یک واریانت (Asp358Ala(rs2228145) در IL6R، به دلیل همبستگی قوی آن با غلظت‌های sIL-6R در گردش، به عنوان واریانت مهمی در این لوکوس پیشنهاد شده است.

از این رو، پلی مورفیسم‌های ژن اینترلوکین-۶ و گیرنده آن به عنوان شاخصی برای تعیین شدت یا درک آسیب شناسی ناشی از عفونت‌های COVID-19 در انسان، از جمله

کرونا ویروس سندرم حاد تنفسی ۲ (SARS-CoV-2) در اواخر سال ۲۰۱۹ در ووهان چین ظاهر شد و به عنوان بیماری کووید-۱۹ نامگذاری شد (۲۰۱). شیوع مداوم این ویروس به حدی سریع است که سازمان بهداشت جهانی پس از سه ماه آن را همه‌گیری اعلام کرد. SARS-CoV-2 عمدتاً دستگاه تنفسی تحتانی را آلوده کرده و منجر به ذات‌الریه آتوپیک می‌شود. در برخی از بیماران با عوارض شدید، این پاتوژن باعث سندرم پریشانی تنفسی حاد (ARDS)^۱ می‌شود که نیاز به مدیریت خاصی در بخش‌های مراقبت ویژه (ICU) دارد (۴،۳). همچنین گزارش شده است که علت مرگ عمدتاً نارسایی تنفسی، نارسایی گردش خون یا هر دوی آن‌ها و همچنین تعدادی از دلایل ناشناخته می‌باشد (۶،۵). 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. در حال حاضر، فرض بر این است که در بیماران آلوده به SARS-CoV-2، پاسخ پیش التهابی بیش از حد میزان منجر به القاء وضعیت آسیب ایمنی و در نتیجه آسیب حاد ریه و سندروم پریشانی تنفسی حاد می‌شود (۷-۹). به عنوان مثال، آزادسازی بیش از حد سایتوکاین و کموکاین، به اصطلاح "طوفان سایتوکاین"، به وضوح منعکس کننده دفاع از تنظیم خارج شده‌ی میزان است (۱۰).

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 (۱۱). اینترلوکین-۶ هم به عنوان سایتوکاین ضد التهابی و هم به عنوان سایتوکاین پیش‌التهابی عمل می‌کند. بسیاری از انواع سلول‌ها، از جمله سلول‌های اپیتلیال مجاری تنفسی، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیال، لنفوسیت‌های T، ماست سل‌ها و بافت چربی اینترلوکین-۶ را تولید و بدین

¹Acute respiratory distress syndrome

(IR.SHAHED.REC.1400.041) از هر بیمار ۳ سی سی نمونه خون محیطی در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA، همراه با رضایت نامه و اطلاعات عمومی و بالینی، گرفته شده و پس از استخراج DNA، در فریزر با دمای ۲۰- نگهداری شد.

تعیین ژنوتیپ

نمونه خون محیطی بیماران جهت استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت شرکت Gene All از بیماران گرفته شد. پس از استخراج DNA، کیفیت و کمیت آن به وسیله دستگاه نانودراپ، مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از DNA استخراج شده به عنوان الگو، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد. از روش PCR-RFLP برای تعیین ژنوتیپ استفاده گردید. بدین ترتیب که محصولات PCR توسط آنزیم محدود الاثر Hind III (ThermoFisher) مورد تیمار قرار گرفتند. لازم به توضیح می‌باشد که آنزیم به نحوی انتخاب شده که در صورت وجود آلل C در ناحیه rs2228145 عمل شناسایی و برش DNA توسط آنزیم محدود الاثر صورت می‌گیرد و در صورت وجود آلل A، عمل شناسایی و برش DNA توسط آنزیم انجام نمی‌شود. سپس نمونه‌ها به صورت over night در دستگاه ترمال سایکلر در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و پس از غیر فعالسازی آنزیم به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه، نمونه‌های تکثیر شده و برش خورده روی ژل آگارز ۲٪ جهت مشاهده قطعات ران شدند. اطلاع دقیق در مورد شرایط PCR و پرایمرها در جداول الی ۴ خلاصه شده است.

حساسیت برخی از افراد و یابیماری بدون علامت پیشنهاد می‌شود. همچنین با ترکیبی از اطلاعات در مورد تأثیر ایمونوژنتیکی پلی مورفیسم اینترلوکین-6 و گیرنده آن، که قبلاً در بیماری‌های ریوی و بیماری‌های ویروسی گزارش شده، توصیه می‌شود که پلی مورفیسم اینترلوکین-6 و گیرنده آن به عنوان یک عامل اصلی برای درک پاسخ درمانی در برابر COVID-19 در جمعیت‌های انسانی آلوده در نظر گرفته شود (۱۴،۱۱). از آنجائی که تاکنون هیچ مطالعه‌ای پلی مورفیسم گیرنده اینترلوکین-6 را در بیماران کووید-۱۹ بررسی نکرده است، بنابراین در مطالعه حاضر بر آن شدید تا این پلی مورفیسم ژن گیرنده اینترلوکین-6 و ارتباط آن با شدت علائم بالینی را در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

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 ۳۸ درجه و بیشتر، SPO_2 بین ۹۰٪ تا ۹۳٪ و همچنین بیماران خیلی شدید و بحرانی که افراد در ICU و تحت مراقبت‌های ویژه، نارسایی تنفسی، $SPO_2 \leq 88\%$ ، شوک، نیازمند تهویه مکانیکی، نارسایی چند ارگانی می‌باشند) تشکیل داده‌اند. روش نمونه‌گیری تصادفی بوده و حجم نمونه شامل ۱۸۰ بیمار (۹۰ نفر گروه سرپایی و ۹۰ نفر گروه بستری) می‌باشد. در این پژوهش پس از تاییدیه کمیته اخلاق دانشگاه شاهد

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده به منظور انجام PCR-RFLP

Primer	Sequences
Forward	F-5'- TTTGACAGCACCAAGT-3'
Reverse	R-5'- TGGGCAAAGGAAAGCTAGATAA -3'

جدول ۲. غلظت و حجم مواد مورد استفاده به منظور واکنش PCR مرتبط با RFLP

حجم مواد	غلظت	مواد واکنش
3 μ L	-	Nuclease-Free Water
5 μ L	2X	TEMPase Hot Start Master Mix
0.5 μ L	10 pmol	Forward Primer
0.5 μ L	10 pmol	Reverse Primer
2 μ L	10-50 ng/ μ L	Genomic DNA
11 μ L	-	Total Volume

جدول ۳. شرایط دمایی مورد استفاده به منظور واکنش PCR مرتبط با RFLP

دما	زمان	تکرار
۹۵ درجه سانتیگراد	۱۵ دقیقه	یک بار تکرار
۹۵ درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه	۳۴ بار تکرار
۵۸ درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه	
۷۲ درجه سانتیگراد	۶۰ ثانیه	
۷۲ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه	یک بار تکرار
۱۲ درجه سانتیگراد	نگهداری	∞

جدول ۴. حجم مواد مورد استفاده به منظور واکنش RFLP

مواد واکنش	حجم مواد
PCR reaction mixture	10 μ L
Nuclease-Free Water	18 μ L
10X Buffer	2 μ L
Hind III	1 μ L
Total Volume	31 μ L

خصوصیات دموگرافیک و بالینی افراد بیمار

افراد شرکت کننده در مطالعه بر اساس شدت بیماری به چهار گروه تقسیم شدند. بیماران سرپایی با علائم خفیف (Mild) به عنوان گروه اول و بیماران بستری با علائم متوسط (Moderate) و شدید (Severe) و بحرانی (Critical) به عنوان گروه دوم طبقه بندی شد. خصوصیات دموگرافیک و بالینی افراد بیمار در جدول ۵ ارائه شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۴) صورت گرفت. با توجه به وضعیت داده‌ها، از آزمون‌های آماری مناسب Chi-Square یا ANOVA استفاده شد. مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

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

جدول ۵. اطلاعات دموگرافیک بیماران

		N		%		N		%		P-value
		N	%	N	%	N	%	N	%	
sex	Female	43	47.8%	26	57.8%	14	56.0%	9	45.0%	0.628
	Male	47	52.2%	19	42.2%	11	44.0%	11	55.0%	
	Missing data	0	0	0	0	0	0	0	0	
smoking	No	53	58.88%	36	80%	18	72%	13	65%	0.228
	Yes	3	3.33%	2	4.44%	3	12%	3	15%	
	Missing data	34	37.77%	7	15.55%	4	16%	4	20%	
HTN	No	52	57.77%	19	42.22%	14	56%	10	50.0%	>0.999
	Yes	15	16.66%	19	42.22%	9	36%	10	50.0%	
	Missing data	23	25.55%	7	15.55%	2	8%	0	0	
DM	No	53	58.88%	25	55.55%	16	64%	11	55.0%	0.015
	Yes	14	15.55%	13	28.88%	7	28%	9	45.0%	
	Missing data	23	25.55%	7	15.55%	2	8%	0	0	
CVA	No	67	74.45%	35	77.77%	21	82.6%	18	90.0%	0.102
	Yes	0	0.0%	3	6.66%	2	8.7%	2	10.0%	
	Missing data	23	25.55%	7	15.55%	2	8.7%	0	0	
renalD	No	62	92.5%	38	84.45%	21	82.6%	17	85.0%	0.165
	Yes	5	7.5%	0	0.0%	2	8.7%	3	15.0%	
	Missing data	23	25.55%	7	15.55%	2	8.7%	0	0	

Mild: سرپایی، Moderate: بستری، Severe: بستری در Critical ICU، بستری در ICU و ایتوبه شده، HTN: بیماری فشار خون، DM: دیابت ملیتوس، CVA: سابقه بیماری قلبی، renal disease: بیماری کلیوی

در گروه سرپایی ۴۶ سال است ولی در گروه بیماران بستری در ICU و ایتوبه شده، میانگین سنی ۶۰ سال قابل مشاهده است.

همانطور که در جدول ۶ ارائه شده است، بیماران در گروه‌های مختلف شدت بیماری، از نظر سن تفاوت معنی‌دار دارند ($P\text{-value} < 0.001$) و میانگین سن بیماران

جدول ۵. فراوانی سن بیماران به تفکیک گروه بندی

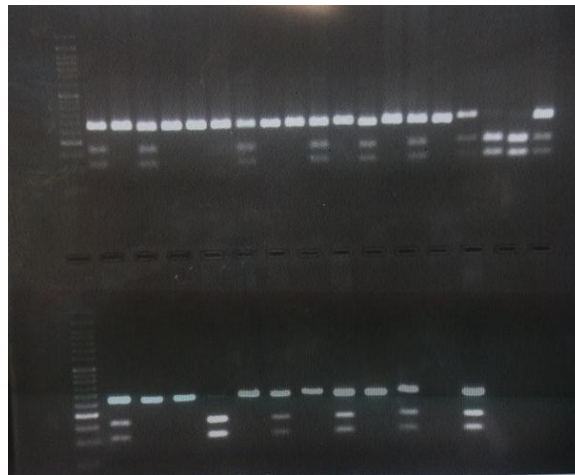
	Groups								P-value
	Mild (n=90)		Moderate (n=45)		Severe (n=25)		Critical (n=20)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
age	46.4	15.8	59.5	16.4	59.7	24.0	60.3	15.8	<0.001

Mean: میانگین، SD: انحراف معیار

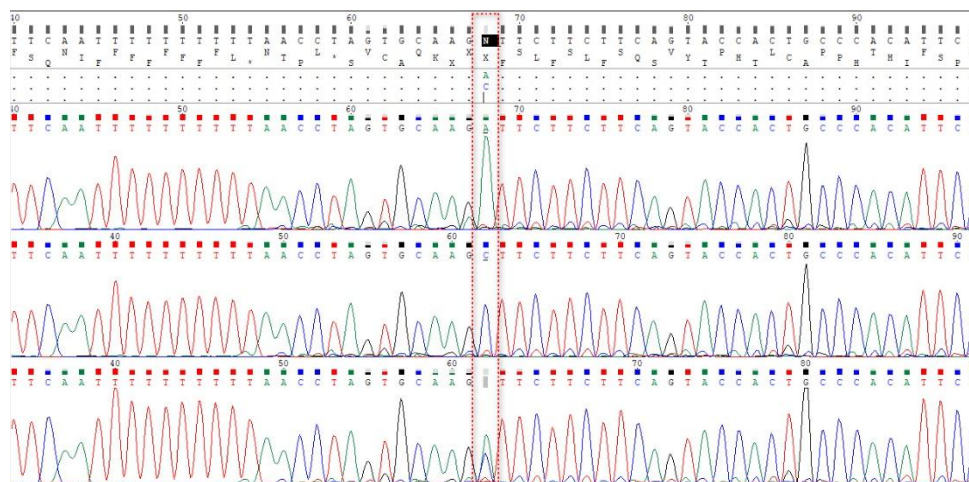
از تعیین توالی بعد از هم ردیف سازی در شکل ۲ آورده شده است.

فراوانی ژنوتیپ

نمونه ای از الکتروفورز ۳۰ محصول PCR، بعد از انجام RFLP در شکل ۱ نشان داده شده است. همچنین حدود ۱۰ درصد از نمونه ها به منظور اطمینان از صحت انجام PCR-RFLP مورد تعیین توالی قرار گرفتند. نتایج حاصل



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR-RFLP به منظور بررسی وضعیت آلی SNP



شکل ۲. نتایج حاصل از تعیین نوالی یابی محصولات PCR

گروه بیماران بستری در ICU و ایتوبه شده ۵۵٪ از نوع AA، ۴۵٪ از نوع A/C و بیمار با ال‌های C/C در این گروه موجود نمی‌باشد. در مدل IL-6R Recessive که مقایسه گروه C/C با سایر گروه‌ها (A/A و A/C) است تفاوت معنی دار مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده این است که ژنوتیپ CC در شدت علائم بالینی تاثیر مهمی دارد و بیماران با این ژنوتیپ وارد مرحله Critical نمی‌شوند (P-value=0.01)؛ به عبارت دیگر، وقتی بیماران با ال‌های CC را در یک گروه و بیماران A/C و A/A را در گروه دیگر قرار دهیم، در شدت علائم بالینی تفاوت معنی‌داری باهم دارند. در مدل IL-6R Dominant که مقایسه گروه A/A با سایر گروه‌ها (C/C و A/C) است تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.

تمامی داده‌ها پس از جمع‌آوری و دسته‌بندی به وسیله نرم‌افزار SPSS V.24 آنالیز شدند و نمودارهای مربوطه به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism رسم شدند. نتایج این مطالعه همانطور که در جدول ۸ و نمودار ۳ ارائه شده است، نشان می‌دهد فراوانی ژنوتیپ‌ها بین گروه‌های سرپایی، بستری در ICU و بستری در ICU و ایتوبه شده دارای تفاوت معنی‌داری است (P-value=0.03). به طوریکه، در گروه بیماران سرپایی، ۴۵/۶٪ از نوع AA، ۴۶/۷٪ از نوع A/C و ۷/۸٪ از بیماران این گروه ژنوتیپ C/C دارند. در گروه بیماران بستری، ۴۸/۹٪ از نوع AA، ۲۶/۷٪ از نوع A/C و ۲۴/۴٪ C/C می‌باشند. همچنین در گروه بیماران بستری در ICU، ۵۶٪ از نوع AA، ۳۲٪ از نوع A/C و ۱۲٪ C/C هستند و در

جدول ۵. مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌ها بین گروه‌های مختلف بیماران

		Group								
		Mild (n=90)		Moderate (n=45)		Severe (n=25)		Critical (n=20)		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
IL-6R Polymorphism	A/A	41	45.6%	22	48.9%	14	56.0%	11	55.0%	0.03
	A/C	42	46.7%	12	26.7%	8	32.0%	9	45.0%	
	C/C	7	7.8%	11	24.4%	3	12.0%	0	0.0%	
IL-6R Dominant	A/A	41	45.6%	22	48.9%	14	56.0%	11	55.0%	0.75
	A/C + C/C	49	54.4%	23	51.1%	11	44.0%	9	45.0%	
IL-6R Recessive	A/A + A/C	83	92.2%	34	75.6%	22	88.0%	20	100%	0.01
	C/C	7	7.8%	11	24.4%	3	12.0%	0	0.0%	
IL-6R Zygosity	Homo	48	53.3%	33	73.3%	17	68.0%	11	55.0%	0.11
	Hetero	42	46.7%	12	26.7%	8	32.0%	9	45.0%	

Mild: سرپایی، Moderate: بستری، Severe: بستری در ICU، Critical: بستری در ICU و ایتوبه شده

بحث

حدود ۲۱٪ ولی در گروه بستری در ICU و ایتوبه شده ۴۵٪ می‌باشد. از نظر فراوانی واریانت‌ها در گروه‌ها، در این مطالعه تفاوت معنی‌داری در ژنوتیپ CC بین گروه‌های سرپایی و بستری و همچنین بستری و بستری در ICU و ایتوبه شده مشاهده شد.

نتایج مطالعه حاضر در ابعاد مختلف قابل مقایسه با سایر مطالعات در مورد کووید-۱۹ و همچنین مطالعات پیشین مربوط به دیگر بیماری‌ها می‌باشد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که پلی مورفیسم rs2228145 گیرنده اینترلوکین-۶ با شدت بیماری ارتباط دارد و بیماران هموزیگوت CC در گروه‌های غیربحرانی قرار می‌گیرند و وارد فاز critical نمی‌شوند. در مطالعات متعدد اثبات شده است که آلل rs2228145 C به شدت با افزایش سطح IL6R محلول در خون، سرم و مایع مغزی نخاعی (CSF) همراه است (۱۶،۱۵). همچنین این واریانت با کاهش غلظت سرمی پروتئین واکنشی C و فیبرینوژن و افزایش غلظت سرمی IL-6 و IL-6R محلول (sIL-6R) همراه است (۱۷). مطابق با یافته این مطالعه، در یک مطالعه گسترده ژنومی توسط Bovijn J و همکاران، گزارش شد که جهش (IL6R(rs2228145))، که منجر به افزایش sIL-6R در گردش می‌شود، از بیماران در برابر عفونت SARS-CoV-2 محافظت می‌کند و نیاز به بستری شدن را کاهش می‌دهد. این نتایج می‌تواند غافلگیر کننده باشد، زیرا sIL-6R نیمه عمر IL-6 را حفظ می‌کند و سیگنال‌های التهابی را از طریق ترانس‌سیگنالینگ IL-6

SARS-CoV-2 عفونت SARS-CoV-2 پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی را فعال می‌کند. درحالی‌که یک پاسخ ایمنی سریع و هماهنگ اولین خط دفاعی در برابر عفونت ویروسی را فراهم می‌آورد، پاسخ التهابی بیش از حد که نمونه‌ای از آن طوفان سایتوکاینی است، می‌تواند باعث آسیب بافتی در محل ورود ویروس و در سطح سیستمیک شود. اینترلوکین-۶ یکی از سایتوکاین‌هایی است که افزایش و نقش آن در پاتوژنز کووید-۱۹ در مطالعات مختلف گزارش شده است. واریانت‌های ژنتیکی گیرنده اینترلوکین-۶ بر توانایی اتصال، سطوح بیان و عملکردهای بیولوژیکی کمپلکس IL6-IL6R تأثیر می‌گذارد و در نتیجه در شروع و پیشرفت عفونت شدید، خودایمنی و بیماری‌های التهابی از جمله COVID-19 نقش دارند. از آنجائی که در مطالعات متعدد گذشته، بر اهمیت پلی مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی rs2228145 (Asp358Ala) در بیماری‌های مختلف التهابی تأکید فراوان شده است و تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی این پلی مورفیسم به صورت آزمایشگاهی در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ انجام نشده است و مطالعات قبلی تنها براساس پایگاه‌های داده صورت گرفته‌اند، ما در این مطالعه ارتباط بین این پلی مورفیسم را با شدت علائم بالینی در این بیماران مورد بررسی قرار دادیم.

نتایج این مطالعه نشان داد که میانگین سن بیماران در گروه سرپایی ۴۶ سال است ولی در گروه بیماران بستری در ICU و ایتوبه شده، میانگین سنی ۶۰ سال قابل مشاهده است. همچنین فراوانی بیماران دیابتی در گروه سرپایی

مینور rs2228145 به طور قابل توجهی با افزایش سطح IL-6r و همچنین بقاء پایین تر همراه است و می تواند در شناسایی گروه مالتیپل میلوما با خطر متوسط کمک کننده باشد (۲۳). در حالیکه در مطالعه ما مشاهده شد که ال C با بقاء بالاتر بیماران همراه است و این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در ماهیت بیماری ها باشد.

مسدود کردن آبشارهای سیگنالینگ IL-6 را می توان با استفاده از یک مهارکننده اختصاصی IL-6R در قالب یک آنتی بادی مونوکلونال، توسیلیزوماب، که به طور گسترده در درمان RA استفاده می شود، به دست آورد. Enevoid و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی مطالعه ای گذشته نگر متشکل از ۷۹ بیمار RA، بررسی کردند که آیا ارتباطی بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2228145 گیرنده اینترلوکین-6 با اثرات عملکردی که قبلاً گزارش شده است، با پاسخ بالینی به تاسیلیزوماب وجود دارد. سه ماه پس از شروع درمان با تاسیلیزوماب، تغییرات بالینی بیماران و ارتباط با هاپلوتیپ IL6R یا ژنوتیپ آن ها مورد آزمایش قرار گرفت و مشاهده شد که هاپلوتیپ A با پاسخ ضعیف به درمان همراه بود. این داده ها نشان می دهد که تنوع ژنتیکی در IL6R ممکن است در پیش بینی نتیجه درمان تاسیلیزوماب در بیماران RA کمک کند (۲۴). به طور کلی، کارآزمایی های بالینی از استفاده گسترده آنتاگونیست های IL-6 در بیماران کووید-۱۹ بستری با بیماری خفیف تا متوسط پشتیبانی نمی کند، اما آنتاگونیست های IL-6 ممکن است در صورت استفاده سریع در بیماران مبتلا به COVID-19 شدید مفید باشد (۲۵). بنابراین به نظر می رسد که پلی مورفیسم گیرنده اینترلوکین-6 منجر به پاسخ های درمانی متفاوت در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ نیز گردد و شناسایی این پلی مورفیسم بتواند در پیش بینی پاسخ به درمان این بیماران حائز اهمیت باشد.

به دلیل بدحالی بیماران در ICU و اینتوبه شده امکان نمونه گیری از این بیماران به آسانی وجود نداشت و بدین علت تعداد بیماران گروه severe و critical در این مطالعه کم است و پیشنهاد می شود 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 درمان ها در اوایل پاندمی و عدم دسترسی کامل به

هدایت می کند (۱۸). برای توضیح این مطلب، در مطالعه ای اخیر نشان داده شده است که افزایش سطوح IL-6R ناشی از این واریانت را می توان با شدت دومیین خارجی IL-6R، مکانیزمی که در آن پروتئین های غشائی به سرعت به حالت محلول تبدیل می شوند که به موجب آن همزمان بیان سطح سلولی آن پروتئین کاهش می یابد، توضیح داد (۱۹). افزایش سطوح IL-6R ممکن است به عنوان یک توازن برای محدود کردن سیگنال دهی بیش از حد IL-6 عمل کند و ممکن است اثر محافظتی آلل A358 را بر بیماری های مختلف توضیح دهد (۲۰). همچنین در مطالعه ای دیگر توضیح داده شده است که احتمالاً افزایش IL-6R در ترکیب با gp130 محلول درون زا به عنوان یک بافر عمل می کند که IL-6 را خنثی می کند و این مکانیسم باعث کاهش خطرات بستری شدن برای بیماران COVID-19 و سایر بیماری های التهابی می گردد (۱۷).

Gregory A Hawkins و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطالعه ای برای ارزیابی rs2228145 IL6R SNP با توجه به فنوتیپ های شدت آسم انجام دادند. آن ها گزارش کردند که پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی Asp358Ala(rs2228145) گیرنده اینترلوکین-6 یک تغییردهنده بالقوه در عملکرد ریه در آسم است و ممکن است افراد در معرض آسم شدیدتر را شناسایی کند و بدین ترتیب ترنس سیگنالینگ IL6 ممکن است نقش بیماری زا در ریه داشته باشد (۲۱). این یافته نیز با مطالعه ما که نشان داد این پلی مورفیسم در شدت علائم بالینی موثر است، تطابق دارد.

از طرف دیگر در مطالعه HekimNJJoMV و همکاران با هدف بررسی همبستگی احتمالی بین پلی مورفیسم ها در ژن چندین سایتوکاین و گیرنده آن ها از جمله IL-6R rs2228145 و میزان شیوع و مرگ و میر ناشی از کووید-۱۹ در بین جمعیت ۲۳ کشور، ارتباط معنی داری نشان نداد، که احتمالاً به دلیل تنوع و تفاوت در زمینه ژنتیکی پروفایل ایمنی جمعیت ها است (۲۲). همچنین Stephens OW و همکاران در سال ۲۰۱۶ ژنوتیپ و سطح IL-6r بیش از ۶۰۰ بیمار مبتلا به مالتیپل میلوما را به روش های الایزا و تعیین ژنوتیپ مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. آن ها گزارش کردند که آلل C

پلی مورفسم rs2228145 گیرنده ایترلوکین-6 در گروه‌های مختلف بیماران کووید-19 با شدت علائم بالینی مختلف، با یکدیگر تفاوت دارد و ژنوتیپ CC می‌تواند پیش‌بینی‌کننده پیش‌آگهی بهتر این بیماران و عدم ورود به ICU و ایتوبه شدن گردد.

تعارض منافع

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

پرونده‌های درمانی بیماران، در این مطالعه امکان بررسی ارتباط این پلی مورفسم با پاسخ به درمان وجود نداشت و پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده این ارتباط مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سن و بیماری زمینه‌ای دیابت از عوامل بسیار مهم تعیین کننده شدت بیماری هستند و باید توجه بیشتری به این گروه‌های پرخطر در پاندمی کنونی متمرکز گردد. همچنین فراوانی واریانت‌ها در

منابع

1. Millán-Oñate J, Rodríguez-Morales AJ, Camacho-Moreno G, Mendoza-Ramírez H, Rodríguez-Sabogal IA, Álvarez-Moreno CJ. A new emerging zoonotic virus of concern: the 2019 novel Coronavirus (SARS CoV-2). *Infection* 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. Wu Z, McGoogan JM. 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. *Jama* 2020;323(13):1239-42.
4. 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. *The Lancet Respiratory Medicine* 2020.
5. 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. *Intensive Care Medicine* 2020;46(5):846-8.
6. Rostamian A, Ghazanfari T, Arabkheradmand J, Edalatfard 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.
7. 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. *The Lancet* 2020;395(10223):497-506.
8. 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. *The Lancet Respiratory Medicine* 2020;8(4):420-2.
9. 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.
10. Catanzaro M, Fagiani F, Racchi M, Corsini E, Govoni S, Lanni CJ, 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.
11. Kirtipal N, Bharadwaj S. Interleukin 6 polymorphisms as an indicator of COVID-19 severity in humans. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2020(just-accepted):1-4.
12. 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.

13. Hunter CA, Jones SAJNi. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology* 2015;16(5):448-57.
14. Ferreira RC, Freitag DF, Cutler AJ, Howson JM, Rainbow DB, Smyth DJ, et al. Functional IL6R 358Ala allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. *PLoS Genetics* 2013;9(4):e1003444.
15. Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John SJNRDD. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nature Reviews Drug Discovery* 2018;17(6):395-412.
16. Emilsson V, Ilkov M, Lamb JR, Finkel N, Gudmundsson EF, Pitts R, et al. Co-regulatory networks of human serum proteins link genetics to disease. *Science* 2018;361(6404):769-73.
17. Garbers C, Rose-John SJTLR. Genetic IL-6R variants and therapeutic inhibition of IL-6 receptor signalling in COVID-19. *The Lancet Rheumatology* 2021;3(2):e96-e7.
18. Bovijn J, Lindgren CM, Holmes MVJTLR. Genetic variants mimicking therapeutic inhibition of IL-6 receptor signaling and risk of COVID-19. *The Lancet Rheumatology* 2020;2(11):e658-e9.
19. Hayashida K, Bartlett AH, Chen Y, Park PWJTARAIiA, Biology E. Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 2010;293(6):925-37.
20. Ahluwalia TS, Prins BP, Abdollahi M, Armstrong NJ, Aslibekyan S, Bain L, et al. Genome-wide association study of circulating interleukin 6 levels identifies novel loci. *Human Molecular Genetics* 2021;30(5):393-409.
21. Hawkins GA, Robinson MB, Hastie AT, Li X, Li H, Moore WC, et al. The IL6R variation Asp358Ala is a potential modifier of lung function in subjects with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012;130(2):510-5. e1.
22. Hekim NJJoMV. Correlation between interleukin gene polymorphisms and current prevalence and mortality rates due to novel coronavirus disease 2019 (COVID-2019) in 23 countries. *Journal of Medical Virology* 2021.
23. Stephens OW, Zhang Q, Qu P, Zhou Y, Chavan S, Tian E, et al. An intermediate-risk multiple myeloma subgroup is defined by sIL-6r: levels synergistically increase with incidence of SNP rs2228145 and 1q21 amplification. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2012;119(2):503-12.
24. Enevold C, Baslund B, Linde L, Josephsen NL, Tarp U, Lindegaard H, et al. Interleukin-6-receptor polymorphisms rs12083537, rs2228145, and rs4329505 as predictors of response to tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics and Genomics* 2014;24(8):401-5.
25. Jones SA, Hunter CA. Is IL-6 a key cytokine target for therapy in COVID-19. *Nature Reviews Immunology* 2021;21(6):337-9.