

Detection of IL-10 gene polymorphisms in patients with ulcerative colitis in Northern Iran

Mahsa Naeimi¹, Rasoul Zahmatkesh Roudsari²

¹ Master Student, Department of Cell and Molecular Sciences, School of Biology Sciences, Islamic Azad University Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

² Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Sciences, School of Biology Sciences, Islamic Azad University Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Abstract

Background: Ulcerative colitis is a multifactorial disease in which the environmental and genetics factor are being involved together. Interleukins are a group of cytokine which are produced through T cells, monocytes, macrophages, and endothelial cells. Interleukin-10 is an important multitasking cytokine that has a key role in inflammatory responses. The promoter of interleukin-10 is highly polymorphic and many of its polymorphisms were identified. The purpose of this study was to investigate and detect the A1082G and T819C polymorphisms of interleukin-10 promoter in ulcerative colitis patients.

Materials and methods: In this case- control study, DNA from 150 individuals with ulcerative colitis and 150 controls were determined by PCR technique. Data were analyzed by Chi-square test using SPSS software. Also, odds ratios and 95% confidence interval were calculated.

Results: The results showed that distribution of GG and CC genotypes and frequency of G and C alleles (related to A1082C and T819C polymorphisms, respectively) was significantly different between patient and control groups.

Conclusion: According to the results, both polymorphisms of IL-10 gene promoter (A1082G and T819C), including G allele and C allele, respectively, are likely to be considered as risk factors for ulcerative colitis. Moreover, both genotype of GG and CC can increase the incidence of ulcerative colitis.

Keywords: *Ulcerative colitis, Polymorphism, IL-10 (A1082G), IL-10 (T819C).*

Cited as: Naeimi M, Zahmatkesh Roudsari R. Detection of IL-10 gene polymorphisms in patients with ulcerative colitis in Northern Iran. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(2): 141-149.

Correspondence to: Rasoul Zahmatkesh Roudsari

Tel: +98 9113932011

E-mail: rasoul130@yahoo.com

ORCID ID: 0000-0003-4073-487X

Received: 15 Sep 2018; **Accepted:** 23 Nov 2018

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۹، شماره ۲، تابستان ۹۸، صفحات ۱۴۱ تا ۱۴۹

بررسی پلی مورفیسم های پروموتور ژن اینترلوکین ۱۰ در بیماران مبتلا به کولیت اولسروز در شمال ایران

مهسا نعیمی^۱، رسول زحمتکش رودسری^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران
^۲ استادیار، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کولیت اولسروز یک بیماری چندعاملی است که در ایجاد آن هر دو عامل محیطی و ژنتیکی همزمان نقش دارند. اینترلوکین ها گروهی از سایتوکاین هستند که توسط سلول های T ، مونوسیت ها، ماکروفاژها و سلول های اندوتلیال تولید می شوند. اینترلوکین ۱۰، یک سایتوکاین چندعملکردی مهم است که نقش کلیدی در پاسخ التهابی بازی می نماید. پروموتور اینترلوکین ۱۰ بسیار پلی مورفیک است و بسیاری از پلی مورفیسم های آن شناسایی شده اند. هدف پژوهش حاضر تشخیص و بررسی پلی مورفیسم های $T819C$ و $A1082G$ پروموتور اینترلوکین ۱۰ در ارتباط با بیماری کولیت اولسروز بود.

روش بررسی: در این مطالعه مورد-شاهدی، DNA ژنومی ۱۵۰ فرد مبتلا به کولیت اولسروز و ۱۵۰ فرد سالم به وسیله تکنیک PCR تعیین ژنوتیپ شد. نسبت شانس و فاصله اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد و با آزمون کای دو توسط نرم افزار $SPSS$ تحلیل انجام شد. یافته ها: نتایج نشان داد که تفاوت توزیع ژنوتیپ GG و CC و فراوانی الل های جهش یافته G و C (به ترتیب مربوط به پلی مورفیسم های $A1082G$ و $T819C$)، در دو گروه بیمار و کنترل معنی دار است.

نتیجه گیری: باتوجه به نتایج به دست آمده در رابطه با هر دو نوع پلی مورفیسم های $A1082G$ و $T819C$ پروموتور ژن $IL-10$ ، به ترتیب احتمالاً الل G و الل C ، به عنوان فاکتورهای خطر برای ایجاد بیماری کولیت اولسروز، محسوب می شوند. همچنین هر دو ژنوتیپ GG و CC ، احتمال ابتلا به بیماری کولیت اولسروز را افزایش می بخشند. به علاوه، با بررسی نتایج پلی مورفیسم های مربوط به این دو ژن به نظر می رسد که ارتباط معنی داری بین هر دو پلی مورفیسم و افزایش ابتلا به بیماری کولیت اولسروز وجود دارد.

واژگان کلیدی: کولیت اولسروز، پلی مورفیسم، $IL-10$ ($A1082G$)، $IL-10$ ($T819C$)

مقدمه

بیماری های التهابی روده که به دلیل اختلال در پاسخ های ایمنی نسبت به عوامل محیطی، در افرادی که از نظر ژنتیکی مستعد هستند، ایجاد می شود، به دو نوع کرون و کولیت اولسراتیو تقسیم می شوند. این بیماری ها دارای دوره های

متناوب حمله و نهمتگی می باشند. بین علایم کرون و کولیت اولسراتیو تفاوت وجود دارد (۱، ۲). بیماری کولیت اولسروز ($Ulcerative Colitis$; UC) اغلب در سنین ۱۵ تا ۴۰ سال دیده می شود. کولیت اولسروز تنها در دیواره داخلی روده ی بزرگ و مقعد رخ می دهد. وقتی فقط مقعد را درگیر کند، پروکتیت ($Proctitis$) نامیده می شود. التهاب مقعد و روده بزرگ باعث جلوگیری از جذب آب و در نتیجه ایجاد اسهال می شود. کولیت اولسروز بیماری است که گاهی بهبود می یابد و گاهی دوباره عود می کند (۳).

آدرس نویسنده مسئول: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه علوم سلولی مولکولی، رسول زحمتکش رودسری (email: rasoul130@yahoo.com)

ORCID ID0000-0003-4073-487X

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۶/۲۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۹/۲

همچنین فراوانی ابتلا به کولیت اولسروز در زنان به میزان بیشتری دیده می‌شود و افزایش فراوانی ابتلای بیماران زن در کولیت اولسروز فامیلی با نسبت زن به مرد $1/3$ تا $1/5$ به ۱ در دو مطالعه جداگانه بدست آمده است. مکانیسم زمینه‌ای برای این یافته تاکنون به اثبات نرسیده است، ولی می‌تواند نشانگر تاثیرات عوامل اپی‌ژنتیک در پاتوژنز بیماری التهابی روده باشد (۹).

اینترلوکین‌ها، سایتوکاین‌های ساخته شده توسط انواع گویچه‌های سفید خون هستند که اغلب بر لنفوسیت‌های دیگر مؤثر هستند. این ترکیبات در سیستم ایمنی نقش مهمی دارند. تعداد آنها بسیار زیاد است و با شماره مشخص می‌شوند، مانند اینترلوکین ۱۷. این پروتئین‌ها به سبب دارا بودن تنوع زیاد، عملکردهایی خارج از سیستم ایمنی هم دارند. جهش‌های فقدان عملکرد در گیرنده‌ی اینترلوکین ۱۰ با کولیت اولسروز شدید، در ارتباط است و این ارتباط احتمالاً به خاطر نقص مسیر سیگنالینگ اینترلوکین ۱۰ است (۱۰).

ژن اینترلوکین ۱۰ یا IL10، عامل مهار تولید سایتوکاین انسانی (Cytokine Synthesis Inhibitory Factor; CSIF) یکی از اینترلوکین‌های مهم بدن است که از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود و در مهار پاسخ‌های التهابی و ایمنی نقش دارد. اینترلوکین ۱۰ از سلول‌های مونوسیت و نیز از لنفوسیت T کمک‌کننده (T helper lymphocytes; THL)، ماکروفاژ و لنفوسیت T تنظیم‌کننده و ماست سل ترشح می‌شود و بر سلول‌های لنفوسیت T کمک‌کننده، لنفوسیت‌های B، ماست سل و درشت‌خوار تاثیر می‌گذارد. IL-10، سایتوکاینی با چند عملکرد در تنظیم سیستم ایمنی و التهاب است. این اینترلوکین موجب کاهش بیان سایتوکاین‌های لنفوسیت T کمک‌کننده (Th1) و پادتن‌های مجموعه سازگاری بافتی اصلی کلاس دو می‌شود. اینترلوکین ۱۰ همچنین موجب افزایش تکثیر و بقای لنفوسیت‌های B و تولید آنتی‌بادی می‌شود. IL-10 می‌تواند فعالیت NF-kB را مسدود کند. جایگاه اینترلوکین ۱۰ بر روی کروموزوم ۱ ناحیه‌ی q31.2 واقع شده است و از ۵ اگزون تولید کننده‌ی یک پروتئین حاوی ۱۷۸ آمینواسید تشکیل شده که به عنوان هومودایمر فعالیت می‌کند (۱۱)، (۱۲).

این ژن دارای سه پلی‌مورفیسم 819C/t، 1082G/A و 592C/A است. این پلی‌مورفیسم‌ها دارای همبستگی نامتعادل بوده و عامل هاپلوتیپ‌های مختلفی هستند. ارتباط حداقل یکی از این پلی‌مورفیسم‌ها با بیماری‌های مختلف گزارش شده است. همچنین این پلی‌مورفیسم‌ها به عنوان مارکرهایی برای

دلیل ایجاد بیماری UC، نامشخص است. اگرچه شواهد کمتری نسبت به بیماری کرون روده برای UC وجود دارد، اما از بررسی دوقلوها بطور واضح مشخص است که زمینه ژنتیکی در ایجاد UC، دخالت دارد. در واقع، یک ارتباط قوی بین ژن‌های ناحیه‌ی آنتی‌ژن لکوسیت انسانی مداخله‌کننده در تنظیم پاسخ ایمنی و UC وجود دارد. برخلاف اثرات نامعلوم که به سبب تفاوت منشأ قومی و هتروژن بودن بیماری ایجاد می‌شوند، این ارتباط در بیماران مبتلا به UC، بسیار قوی است. گرچه، ژن‌های مرتبط با استعداد ابتلا به UC احتمالاً در داخل ناحیه‌ی آنتی‌ژن لکوسیت انسانی وجود ندارند و مطالعات غربالگری گسترده ژنوم حاکی از پیوستگی میان UC و نواحی کروموزوم ۳، ۷ و ۱۲ است. به علاوه، ژن‌هایی وجود دارند که نشان داده‌اند شدت و وجود بیماری، پاسخ استروئیدی، نیازهای استروئیدی و تظاهرات روده‌ای شدید را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در نهایت، پلی‌مورفیسم‌های آنتاگونیست گیرنده اینترلوکین-۱ که احتمالاً شدت و وجود بیماری را تحت تاثیر قرار می‌دهد، گزارش شده‌اند؛ خصوصاً در بیماران مثبت از لحاظ pANCA و همچنین MUC3، ژن‌کد کننده موسین‌های روده‌ای که می‌تواند همچنین با پاتوژنز UC در ارتباط باشد (۴). گرچه مرگ به علت این بیماری در حال حاضر شایع نیست، ولی این بیماری هم‌چنان باعث از کار افتادگی و ضعف به خصوص در جوانان بالغ می‌شود (۵).

بیماری کولیت اولسروز تمایل دارد تا در یک خانواده گسترش یابد، به این معنی که احتمال تولد فرزندی بیمار از یک یا دو والد مبتلا، نسبت به والدین سالم، بیشتر است. مطالعات نشان می‌دهند که این احتمال برابر با ۲٪ است، یعنی از هر ۱۰۰ زوج که فقط یک والد بیمار باشد، دو نفر از بچه‌ها بیمار خواهند بود (۶).

شیوع بیماری التهابی روده از جمله کولیت اولسروز بنا به شواهد موجود، در کشور ایران رو به فزونی است و از آنجایی که این بیماری سبب ایجاد عوارض متعدد و پایین آمدن کیفیت زندگی بیمار می‌شود، نیاز به توجه بیشتری دارد. از طرفی پاتوژنز این بیماری التهابی روده هنوز به طور دقیق مشخص نیست و اکثر محققین تقابل بین سه فاکتور ژنتیک، ایمونولوژیک و محیط را در پاتوژنز آن دخیل می‌دانند. مطالعات جمعیتی اخیر، شیوع این بیماری التهابی را در جمعیت‌های اروپای شمالی در حدود ۱ بیمار به ازای هر ۲۰۰ نفر گزارش کرده‌اند. در کشور ما هنوز شیوع دقیق این بیماری مشخص نشده و تنها مطالعات اندکی بر روی جمعیتی از بیماران صورت گرفته است (۷، ۸).

شده با استفاده از دستگاه الکتروفورز آگارز، مورد آنالیز کیفی قرار گرفتند.

پس از استخراج DNA جهت آنالیز کیفی، با توجه به تعداد نمونه‌های استخراج شده، نمونه‌های حاوی DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۲٪ برده شد. مقدار ۵ μl از نمونه حاوی DNA استخراج شده با ۲ μl ژل رد مخلوط شد و درون چاهک بارگذاری گردید و سپس عکسبرداری از ژل توسط دستگاه Gel Doc انجام گرفت. در اثر برخورد نور UV به مولکول DNA متصل شده به اتیدیوم بروماید، باندها به صورت نقاط روشن دیده می‌شوند. باندهای واضح و روشن نشان دهنده کیفیت مطلوب DNA استخراج شده است.

بعد از بررسی کیفیت DNA استخراج شده از افراد کنترل و بیمار، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) براساس پروتکل آمده در ادامه، صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط تکنیک PCR انجام شد.

تمامی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 طراحی شدند. اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ و ۲ آورده شده است. در نهایت، به منظور تفسیر نتایج به دست آمده از بررسی‌های آزمایشگاهی، پارامترهای آماری کمی مورد نیاز بود. بنابراین با بهره‌گیری از نرم‌افزار SPSS (Version 23.86.64)، آزمون‌های آماری کای دو (χ^2) و نسبت شانس (Odds Ratio: OR) انجام گرفت. $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی گروه کنترل نشان داد که تعداد افراد زن و مرد با یکدیگر برابر نیست (۴۲/۶۷٪ زن و ۵۷/۳۳٪ مرد)، اما از لحاظ آماری اختلاف میان زنان و مردان معنی‌دار نبود ($p=0.52$). همچنین میانگین سنی افراد مورد مطالعه در این

حساسیت و مقاومت نسبت به بیماری‌هایی مانند اریتروماتوس لوپوس سیستمیک، سرطان، عفونت‌های میکروباکتریایی و خوره، تعریف شده‌اند. پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی و میکروستلایت‌ها در ناحیه‌ی پروموتور ژن IL-10، هاپلوتایپ‌های متعددی را تشکیل می‌دهند که با سطوح متمایز تولید IL-10 مرتبط می‌باشند. هاپلوتایپ‌های پلی مورفیسم‌های دیستال و پروگزیمال پروموتور IL-10، ترشح IL-10 را به طور متمایز از طریق اثرگذاری بر سطوح رونویسی، تنظیم می‌کند (۱۳، ۱۴).

مواد و روشها

در این مطالعه مورد-شاهدی، دو گروه از افراد، یعنی افراد سالم از لحاظ بیماری کولیت اولسروز و افراد بیمار بررسی شدند. تمامی این افراد، ساکن مناطق شمال کشور ایران بودند. کلیه نمونه‌ها پس از تأیید پزشک فوق تخصص گوارش و انجام کولونوسکوپی انتخاب شدند. در کل ۳۰۰ نمونه بافت بیوپسی براساس جدول استاندارد نمونه‌گیری مورگان (۱۵۰ فرد مبتلا به کولیت اولسروز و ۱۵۰ فرد کنترل) تعیین شدند که از مراکز کولونوسکوپی و آندوسکوپی استان‌های گیلان و مازندران جمع‌آوری شدند. شرح حال بیماران شامل سن، جنس، محل سکونت و شدت بیماری توسط پزشک معالج تأیید شده و از تمامی بیماران رضایت‌نامه آگاهانه دریافت شد. نمونه‌ها در ویال‌های استریل به آزمایشگاه منتقل شدند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند.

استخراج DNA در این تحقیق، توسط کیت اختصاصی PREP DNA Kit از شرکت Analytik jena آلمان انجام گرفت. قبل از انجام عمل استخراج، میکروتیوب‌های حاوی نمونه از حالت فریز خارج شدند و طبق پروتکل موجود در کیت استخراج، DNA استخراج گردید. به دلیل اهمیت صحت استخراج DNA برای انجام پژوهش‌های مولکولی، تمامی DNA‌های استخراج

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای پلی مورفیسم A1082G پروموتور ژن IL10 (۱۳)

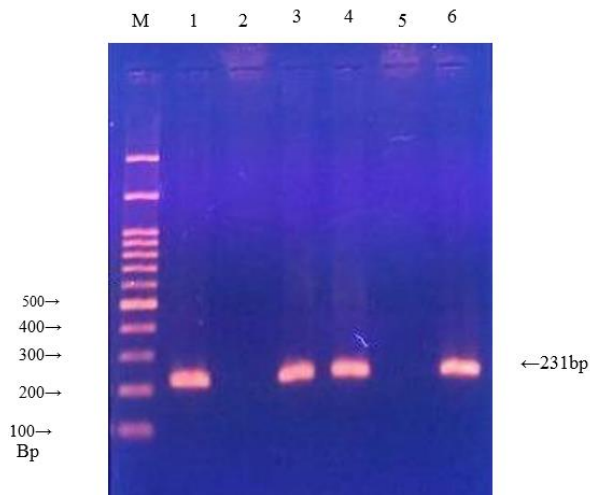
نام پرایمر	توالی پرایمر
F1 (W)	5'-AACACTACTAAGGCTTCTTTGGGT A-3'
F2 (M)	5'-AACACTACTAAGGCTTCTTTGGGT G-3'
R	5'-GTAAGCTTCTGTGGCTGGAGT C-3'

*W = Wild type; *M= Mutant

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده برای پلی مورفیسم T819C پروموتور ژن IL10 (۱۳)

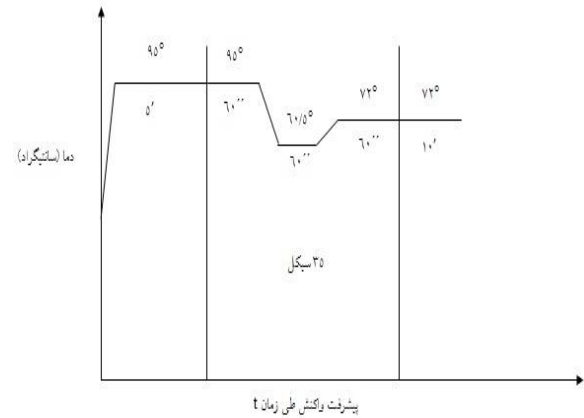
نام پرایمر	توالی پرایمر
F1 (W)	5'-AGGACGGCAATGCTGATGGGAAACT-3'
F2 (M)	5'-AGGACGGCAATGCTGATGGGAAACC-3'
R	5'-ATGGGAGGGAAGAGCCGCGTT-3'

*W = Wild type; *M= Mutant

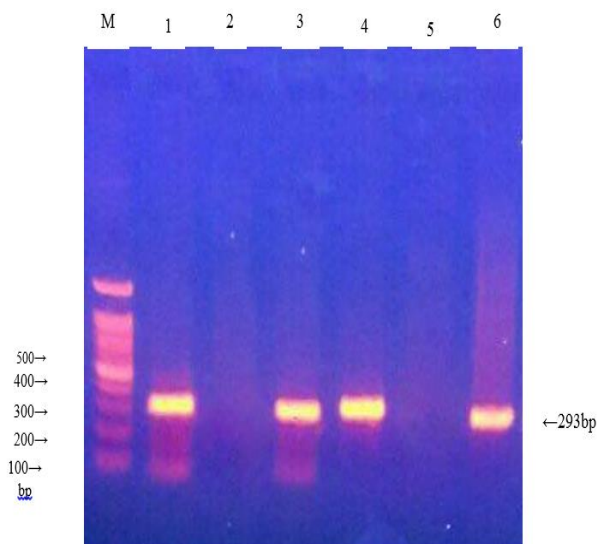


شکل ۲. محصولات PCR پلی مورفیسم A1082G زن IL-10 بر روی ژل آگارز ۲٪. ردیف‌های ۱ و ۲ مربوط به فرد با ژنوتیپ AA، ۳ و ۴ فرد AG و ۵ و ۶ فرد GG هستند. ردیف M مربوط به مارکر 100bp (Bioron ساخت کشور ایتالیا) جهت تشخیص قطعه تکثیر شده است.

پژوهش، ۳۵ سال بود. در میان گروه کنترل، ۷۴ نفر (۴۹/۳۳٪) سن بالاتر از ۳۵ سال و ۷۶ نفر (۵۰/۶۷٪) سن کمتر از ۳۵ سال داشتند. ارتباط معنی‌داری بین سن و ایجاد بیماری مشاهده نشد ($p=0/93$).



شکل ۱. پروفایل حرارتی واکنش PCR زن IL10

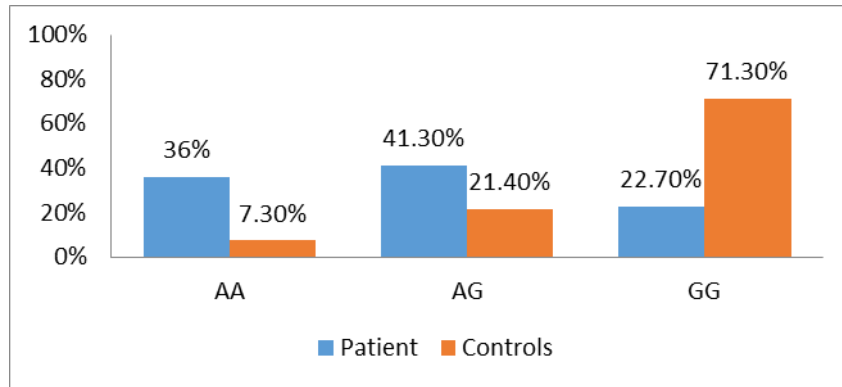


شکل ۳. محصولات PCR پلی مورفیسم T819C زن IL10 بر روی ژل آگارز ۲٪. ردیف‌های ۱ و ۲ مربوط به فرد با ژنوتیپ AA، ۳ و ۴ فرد TC و ۵ و ۶ فرد CC هستند. ردیف M مربوط به مارکر 100bp (Bioron ساخت کشور ایتالیا) جهت تشخیص قطعه تکثیر شده است.

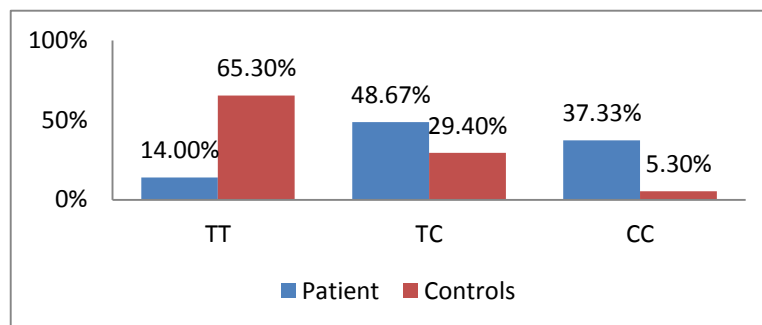
در این تحقیق پلی مورفیسم A1082G(A→G) زن IL-10 مورد بررسی قرار گرفت. ژل آگارز ۲٪ آماده شد و پس از انجام واکنش PCR، محصولات PCR به همراه DNA مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، روی این ژل بارگذاری شده و در محدوده زمانی نسبتاً کوتاه (۴۵-۶۰ دقیقه) الکتروفورز انجام و باندهای DNA مربوط به ناحیه تکثیر شده زن IL-10(A1082G) از هم تفکیک شدند. سپس نتیجه حاصل با کمک دستگاه Gel Doc مشاهده شد. طول قطعه تکثیر شده ۲۳۱ bp است. DNA افرادی که دارای ژنوتیپ GG به صورت هموزیگوت هستند، فقط با پرایمر F1 و R؛ DNA افرادی که دارای ژنوتیپ AA به صورت هموزیگوت هستند، فقط با پرایمر F2 و R؛ و در نهایت DNA افراد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت AG با هر دو پرایمر F1 و F2 کار می‌کند. تصویر مربوط به این ژل آگارز ۲٪ در شکل ۲ مشاهده می‌شود. نتایج آزمایشات نشان داد که در میان ۱۵۰ فرد بیمار، ۱۱ نفر (۷/۳٪) دارای ژنوتیپ AA، ۳۲ نفر (۲۱/۴٪) دارای ژنوتیپ AG و ۱۰۷ نفر (۷۱/۳٪) دارای ژنوتیپ GG بودند. در میان ۱۵۰ فرد سالم، ۵۴ نفر (۳۶٪) دارای ژنوتیپ AA، ۶۲ نفر (۴۱/۳٪) دارای ژنوتیپ AG و ۲۴ نفر (۲۲/۷٪) دارای ژنوتیپ GG بودند (نمودار ۱). آزمون آماری کای دو تفاوت معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه مورد مطالعه نشان داد ($p<0/0001$).

همان طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، فراوانی ژنوتیپ AG در افراد بیمار بیش از افراد کنترل و تفاوت توزیع این ژنوتیپ معنی‌دار بود ($p=0/01$). با توجه به میزان OR به دست آمده به میزان ۰/۴ (فاصله اطمینان ۰/۱۹-۰/۸۶) این ژنوتیپ احتمالاً می‌تواند خطر ابتلا به کولیت اولسراتیو را کاهش دهد و یک فاکتور محافظتی محسوب می‌شود.

نتایج آزمایشات نشان داد که در جمعیت بیمار، فراوانی ال A برابر ۵۶/۶۷٪ و فراوانی ال G برابر ۴۳/۳۳٪ بود. در گروه



نمودار ۱. درصد فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده‌ی پلی مورفیسم A1082G پرموتر ژن IL10 در دو گروه کنترل و بیمار



نمودار ۲. درصد فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده‌ی پلی مورفیسم T819C پرموتر ژن IL10 در دو گروه کنترل و بیمار.

ژنوتیپ هتروزیگوت TC در ۷۳ نفر (۴۸/۶۷٪) و ژنوتیپ CC در ۵۶ نفر (۳۷/۳۳٪) مشاهده شد. در نمودار ۲ درصد فراوانی ژنوتیپی آورده شده است. تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه مورد مطالعه مشاهده شد ($p < 0.0001$).

باتوجه به نتایج آورده شده در جدول ۵، فراوانی ژنوتیپ CC در گروه بیمار بیش از گروه کنترل بود و تفاوت توزیع این ژنوتیپ معنی‌دار بود ($p < 0.0001$). همچنین براساس میزان OR به دست آمده یعنی ۳۲/۶۷ (فاصله اطمینان ۹۵٪: ۱۳/۵۸-۷۸/۶۰) احتمالاً این ژنوتیپ خطر ابتلا به بیماری کولیت اولسراتیو را افزایش می‌بخشد و می‌تواند به عنوان یک فاکتور خطر منفی محسوب شود.

همچنین، بررسی فراوانی اللی در افراد کنترل و بیمار در پلی مورفیسم T890C پرموتر ژن IL10 نشان می‌دهد که در افراد کنترل فراوانی اللی T برابر ۸۰٪ و فراوانی اللی C برابر ۲۰٪ و در افراد بیمار به ترتیب فراوانی اللی T، ۳۸/۳۳٪ و فراوانی اللی C، ۶۱/۶۷٪ است و تفاوت معنی‌داری بین فراوانی اللی افراد کنترل و بیمار مشاهده شد ($p < 0.0001$). همان طور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود، فراوانی اللی C در افراد بیمار نزدیک به چهار برابر افراد کنترل بوده و تفاوت توزیع این اللی

کنترل، فراوانی اللی A برابر با ۱۸٪ و فراوانی اللی G برابر با ۸۲٪ بود. در جدول ۴، فراوانی‌های اللی آورده شده است. تفاوت مشاهده شده بین افراد بیمار و کنترل باتوجه به آزمون کای دو از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.0001$). پلی مورفیسم T819C(T→C) در پرموتر ژن IL10 مورد بررسی قرار گرفت. در این پلی مورفیسم تبدیل باز تیمین به سیتوزین صورت می‌گیرد. برای این پلی مورفیسم سه حالت ژنوتیپی TT، TC و CC وجود دارد. ژنوتیپ نمونه‌ها همانند قسمت (۳-۲-۳) تعیین شد. باندهای DNA مربوط به ناحیه تکثیر شده ژن IL10(T819C) از هم تفکیک شدند. همان طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، محصول حاصل از PCR پلی مورفیسم مربوطه ژن که قطعه‌ای به طول ۲۹۳ جفت باز است، شامل ناحیه‌ای است که دارای اللی طبیعی T مورد نظر است. به منظور بررسی کیفیت محصول PCR و اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر، از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. بررسی نتایج مربوط به پلی مورفیسم T819C پرموتر ژن IL10 نشان داد که از ۱۵۰ فرد کنترل، ۹۸ نفر (۶۵/۳٪) دارای ژنوتیپ هموزیگوت طبیعی TT، ۴۴ نفر (۲۹/۴٪) ژنوتیپ هتروزیگوت موتانت CC بودند و ۸ نفر (۵/۳٪) دارای ژنوتیپ هموزیگوت موتانت CC بودند. در بین ۱۵۰ نفر گروه بیمار، ژنوتیپ TT در ۲۱ نفر (۱۴٪)،

جدول ۳. نتایج مربوط به فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده در پلی‌مورفیسم A1082G پروموتور ژن IL10

پلی‌مورفیسم	ژنوتیپ	گروه کنترل n (%)	گروه بیمار n (%)	OR (CI 95%)	P
A1082G	AA	۵۴ (۳۶٪)	۱۱ (۷۳٪)	Ref (1)	-
	AG	۶۲ (۴۱٪)	۳۲ (۲۱٪)	۰/۴۸ (۰/۱۹-۰/۸۶)	۰/۰۱۸۹
	GG	۳۴ (۲۲٪)	۱۰۷ (۷۱٪)	۰/۰۶ (۰/۰۳-۰/۱۴)	<۰/۰۰۱

جدول ۴. بررسی فراوانی اللی پلی‌مورفیسم A1082G

پلی‌مورفیسم	آلل	گروه بیمار (%)	گروه کنترل (%)	X2	P
A1082G	A	۵۶/۶۷	۱۸	۹۴/۲۱	<۰/۰۰۱
	G	۴۳/۳۳	۸۲		

جدول ۵. تعداد و درصد ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم T819C پروموتور ژن IL10

پلی‌مورفیسم	ژنوتیپ	گروه بیمار n (%)	گروه کنترل n (%)	OR (95% CI)	P
T89C	TT	۲۱ (۱۴٪)	۹۸ (۶۵٪)	Ref (1)	-
	TC	۷۳ (۴۸/۶۷٪)	۴۴ (۲۹/۴٪)	۷/۷۴ (۴/۲۴-۱۴/۱۳)	<۰/۰۰۱
	CC	۵۶ (۳۷/۳۳٪)	۸ (۵/۳٪)	۳۲/۶۷ (۱۳/۵۸-۷۸/۶۰)	<۰/۰۰۱

جدول ۶. بررسی فراوانی اللی پلی‌مورفیسم T819C ژن IL-10

پلی‌مورفیسم	آلل	گروه بیمار (%)	گروه کنترل (%)	OR	95% CI	χ^2	P
T890C	T	۳۸/۳۳	۸۰	۶/۴۳	۴/۴۶-۹/۲۸	۱۰۶/۰۷	<۰/۰۰۱
	C	۶۷/۶۱	۲۰				

مطالعات متعددی در زمینه ارتباط پلی‌مورفیسم‌های پروموتور ژن IL-10 با بیماری‌های مختلف از جمله سرطان کولون و کولیت اولسروز صورت گرفته‌اند. در اغلب این مطالعات، محققان نشان داده‌اند که این پلی‌مورفیسم‌ها می‌توانند خطر ابتلا به بیماری‌های مختلف را افزایش بخشند. در زیر، چندین مورد از مطالعات ذکر شده‌اند.

در مطالعه‌ای، ارتباط پلی‌مورفیسم ژن IL-10 (A1082G) با سرطان سلول سنگفرشی دهان (OSCC) در جمعیت شمال هند بررسی شد. محققان دریافتند که حضور آلل G در موارد OSCC در مقایسه با افراد کنترل معنی‌دار بود؛ این می‌تواند به سبب سیگار کشیدن و جویدن توتون باشد. یافته‌های آنها نشان داد که در پلی‌مورفیسم A1082G IL10، ژنوتیپ AG و آلل G می‌تواند در ترویج OSCC دخالت کند (۱۷).

منوچهری و همکارانش پلی‌مورفیسم‌های ژن IL-10 و استعداد ابتلا به تب مالت در بیماران ایرانی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که فراوانی‌های بالاتر آلل‌های C در موقعیتهای ۸۱۹- و ۵۹۲- ژن اینترلوکین-۱۰ و فراوانی کمتر

معنی‌دار است ($p < 0/0001$). با توجه به میزان OR بدست آمده یعنی ۶/۴۳ (فاصله اطمینان ۰/۹۵-۹/۲۸) احتمالاً الل C یک فاکتور خطر و منفی محسوب می‌شود.

بحث

مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهند که ممکن است مجموعه‌ای از اختلال سیستم ایمنی و فرآیندهای بیماری‌زای خودبه‌خودی، یک اختلال بالینی رایج را شکل دهد. از این رو، پاتوژنز بیماری UC با ترکیب میکروبیوم مرتبط است. محققان اینگونه توجیه می‌کنند که فاکتورهای تعیین‌گر ترکیب و عملکرد این اجتماعات باکتریایی، می‌توانند منجر به پیشرفت وضعیت‌های مجزای میکروبیوم شوند که به صورت عوامل بیماری‌زای مجزا فعالیت می‌کنند تا به طور قطعی وضعیت فعال‌سازی سیستم ایمنی و شدت بیماری را تحت تأثیر قرار دهند. ژنتیک میزبان، رژیم غذایی و قرارگیری در معرض عوامل محیطی، ۳ فاکتوری هستند که به وسیله قومیت احاطه شده‌اند و هر دو مورد پاتولوژی میکروبیوم روده و UC را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۵، ۱۶).

براساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، بین پلی مورفیسم های A1082G و T819C پروموتور ژن IL-10 در دو گروه کنترل و بیمار، ارتباط معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$). این نتایج با مشاهدات تحقیقات قبلی محققان در رابطه با نقش این پلی مورفیسم ها و تغییرات ژنتیکی آن در بیماری های مختلف از جمله HBV (۱۳) و تب مالت (۱۲) در توافق است. به علاوه، باتوجه به تغییرات اللی که در پلی مورفیسم های A1082G و T819C رخ می دهد، یعنی به ترتیب، تبدیل آلی A به G و T به C، ارتباط معنی داری بین فراوانی ال های جهش یافته در دو گروه کنترل و بیمار مشاهده شد ($p < 0.05$). همچنین لازم به ذکر است که نوآوری این پژوهش به سبب عدم انجام مطالعه ای مشابه در این منطقه جغرافیایی است.

باتوجه به نتایج به دست آمده در رابطه با هر دو نوع پلی مورفیسم های A1082G و T819C پروموتور ژن IL-10، به ترتیب احتمالاً ال G و ال C، فاکتورهای خطر برای ایجاد بیماری کولیت اولسروز، محسوب می شوند. همچنین هر دو ژنوتیپ GG و CC، احتمال ابتلا به بیماری کولیت اولسروز را افزایش می بخشد. به علاوه با بررسی نتایج پلی مورفیسم های مربوط به این دو ژن به نظر می رسد که ارتباط معنی داری بین هر دو پلی مورفیسم و افزایش ابتلا به بیماری کولیت اولسروز وجود دارد.

این مطالعه به سبب بررسی هم زمان ارتباط بین دو پلی مورفیسم A1082G و T819C پروموتور ژن IL-10 با کولیت اولسروز، برای اولین بار در جمعیت شمال ایران، حائز اهمیت است. لذا برای درک بهتر نقش این عوامل ژنتیکی و نتیجه گیری کلی تر، مطالعات وسیع تر، دقیق تر و بسیار کنترل شده تر مورد نیاز است. علاوه بر این باتوجه به چند عاملی بودن این بیماری و نقش موثر عوامل ژنتیکی و محیطی در ایجاد آن باید در مطالعات مربوط به این بیماری عوامل مختلف و تأثیر متقابل آنها بر یکدیگر نیز مطالعه شود. به علاوه، نتایج به دست آمده ممکن است با تغییر خزانه ژنتیکی جمعیت و یا تغییر معنی دار اندازه جمعیت تغییر کند.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه خانم مهسا نعیمی مصوب پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن (کد مصوب: ۱۴۲۵۳، ۱۳۹۶/۶/۱۲) است. از تمامی مراکز درمانی و بیماران مشارکت کننده، دانشگاه آزاد تنکابن، و بخش آزمایشگاه این دانشگاه که ما را در تهیه و تنظیم این پژوهش یاری کردند و همچنین از

هاپلوتایپ های ATA/ATA در بیماران به عنوان عوامل مستعد کننده بیماری تب مالت مطرح می شوند (۱۸).

Chen و همکارانش پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی IL-10 و استعداد ابتلا به بیماری جذام در گروه های بومی جنوب چین را بررسی کردند. آنها نشان دادند که پلی مورفیسم های G/819C/592C پروموتور IL-10 با استعداد ابتلا به بیماری جذام در جمعیت جنوب غربی چین مرتبط است (۱۳).

Bineshnia و همکارانش ارتباط بین پلی مورفیسم (-IL-10/819C/T) و عفونت هپاتیت B را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که هیچ ارتباطی بین این پلی مورفیسم در گروه کنترل عفونت هپاتیت B مزمن وجود ندارد (۱۹).

به علاوه، مطالعاتی در زمینه بررسی ارتباط بین اینترلوکین-۱۰ و بیماری های روده ای صورت پذیرفته است که به چندین مورد از آنها اشاره خواهد شد.

در مطالعه ای، محققان پلی مورفیسم های سایتوکاين (TNF α ، LT α و IL-10) را در بیماری های التهابی روده و افراد سالم به منظور تعیین اثرات متمایز بر روی تولید و فراوانی های آلی، بررسی کردند. نتایج آنها شاهدهی دال بر وجود اثر پلی مورفیسم های ژن TNF α ، LT α و IL-10 بر روی اختلاف میزان تولید در بیماران مبتلا به کرون، مبتلا به کولیت اولسروز و افراد سالم فراهم آورد (۲۰).

Franke و همکارانش در سال ۲۰۰۸، انواع توالی های موجود در IL10، ARPC2 و چندین لوکوس دیگر مشارکت کننده در ایجاد استعداد ابتلا به بیماری کولیت اولسروز را مورد بررسی قرار دادند. یافته های این پژوهش با اطمینان زیادی نشان داد که نقص در عملکرد IL10 هسته ای مرکزی پاتوژنز بیماری UC است (۲۱).

در پژوهشی دیگر، ارتباط بین جهش های تأثیرگذار بر گیرنده اینترلوکین-۱۰ و بیماری التهابی روده مورد بررسی قرار گرفت. محققان این پژوهش بیان کردند که جهش های رخ دهنده در ژن های کد کننده زنجیره های پلی پپتیدی گیرنده IL10 که مسیر سیگنالینگ ایمونومدولاسیون میانجی شده توسط IL10 را معیوب می کنند، به شدت با التهاب بیش از حد روده در ارتباط هستند (۲۲).

Andersen و همکارانش در سال ۲۰۱۰، ارتباط پلی مورفیسم rs3024505 مربوط به IL-10 را با خطر بیماری UC و کرون در یک مطالعه موردی-شاهدهی دانمارکی بررسی کردند. یافته های این پژوهش نشان داد که پلی مورفیسم نشانگر rs3024504 حمله کننده به ژن IL-10 به طور معنی داری با خطر ابتلا به UC و CD مرتبط است. به این معنی که IL-10 در اتیولوژی IBD در این جمعیت نقش دارد (۲۳).

REFERENCES

1. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-29.
2. Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Oikonomopoulos A, Ziring D, Hommes DW, et al. A microRNA signature in pediatric ulcerative colitis: deregulation of the miR-4284/CXCL5 pathway in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:996-1005.
3. Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004;53:V1-16.
4. Ardizzone S, Puttini PS, Cassinotti A, Porro GB. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2008;40:S253-9.
5. Sartor RB. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995;24:475-507.
6. Feagan BG, Macdonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:CD000543.
7. Aghazadeh R, Zali MR, Bahari A, Amin K, Ghahghaie F, Firouzi F. Inflammatory bowel disease in Iran: a review of 457 cases. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1691-5.
8. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:720-7.
9. Monsen U, Bernell O, Johansson C, Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:302-6.
10. Ordas I, Echmann L, Talamini M, Baumgart D, Sandborn W. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012;380:1606-19.
11. Budak F, Göral G, Heper Y, Yılmaz E, Aymak F, Baştürk B, et al. IL-10 and IL-6 gene polymorphisms as potential host susceptibility factors in Brucellosis. *Cytokine* 2007;38:32-6.
12. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy-review of a new approach. *ACPET* 2003;55:241-69.
13. Chen XH, Xiong JH, Ning Y, Wen Y, Liu J, Mao C, et al. IL-10 promoter SNPs and susceptibility to leprosy in ethnic groups from southwest China. *Genet Mol Res* 2013;12:2876-85.
14. Lio D, Scola L, Crivello A, Colonna-Romano G, Candore G, Bonafe M, et al. Gender-specific association between-1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes and Immunity* 2002;3:30-3.
15. Mar JS, LaMere BJ, Lin DL, Levan S, Nazareth M, Mahadevan U, et al. Disease severity and immune activity relate to distinct interkingdom gut microbiome states in ethnically distinct ulcerative colitis patients. *MBio* 2016;7:e01072-16.
16. Langan RC, Gotsch PB, Krafczyk MA, Skillinge DD. Ulcerative colitis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2007;76.
17. Hussain SR, Ahmad MK, Mahdi AA, Naqvi H, Ahmad MW, Srivastava S, et al. Association of interleukin-10 (A1082G) gene polymorphism with oral squamous cell carcinoma in north Indian population. *J Genet* 2016;95:249-55.
18. Manouchehri R, Kiani S, Behbin M. Polymorphisms of interleukin-10 and susceptibility to Malta fever in Iranian patients. *Teb Jonoub* 1387;11:129-38. [[n Persian]].
19. Bineshian F, Irajian G, Bagheri Mansoori MH. The relationship between IL-10 (-819 C/T) polymorphism and Hepatitis B infection. *Iran J Med Microbiol* 2016;10:47-53.
20. Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF [alpha], LT [alpha] and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes and Immunity* 2000;1:185.
21. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 2008;40:1319.
22. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 2009;361:2033-45.
23. Andersen V, Ernst A, Christensen J, Østergaard M, Jacobsen BA, Tjønnelan A, et al. The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohns disease in a Danish case-control study. *BMC Med Genet* 2010;11:82.