Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 29, No.2, Summer 2019 **ORIGINAL ARTICLE**

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

***Mahsa Naeimi*[1], *Rasoul Zahmatkesh Roudsari*[2]**
[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 interlekin-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 allel and C allel, 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

Original Article

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

بررسی پلی‌مورفیسم‌های پروموتر 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: *کولیت‌اولسروز یک بیماری چندعاملی است که در ایجاد آن هر دو عامل محیطی و ژنتیکی هم‌زمان نقش دارند. اینترلوکین‌ها گروهی از سایتوکاین هستند که توسط سلول‌های T، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های اندوتلیال تولید می‌شوند. اینترلوکین ۱۰، یک سایتوکاین چندعملکردی مهم است که نقش کلیدی در پاسخ التهابی بازی می‌نماید. پروموتر اینترلوکین ۱۰ بسیار پلی‌مورفیک است و بسیاری از پلی‌مورفیسم‌های آن شناسایی شده‌اند. هدف پژوهش حاضر تشخیص و بررسی پلی‌مورفیسم‌های A10825 و T819C پروموتر اینترلوکین ۱۰ در ارتباط با بیماری کولیت اولسروز بود.*

روش بررسی: در این مطالعه مورد- *شاهدی، DNA ژنومی ۱۵۰ فرد مبتلا به کولیت اولسرو و ۱۵۰ فرد سالم به وسیله تکنیک PCR تعیین ژنوتیپ شد. نسبت شانس و فاصله اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شد و با آزمون کای‌دو توسط نرم‌افزار SPSS تحلیل انجام شد.*

یافته‌ها: *نتایج نشان داد که تفاوت توزیع ژنوتیپ GG و CC و فراوانی الل‌های جهش‌یافته G و C (به ترتیب مربوط به پلی‌مورفیسم‌های A1082G و T819C)، در دو گروه بیمار و کنترل معنی‌دار است.*

نتیجه‌گیری: *باتوجه به نتایج به دست آمده در رابطه با هر دو نوع پلی‌مورفیسم‌های A1082G و T819C پروموتر ژن IL-10، به ترتیب احتمالاً الل G و الل C، به عنوان فاکتورهای خطر برای ایجاد بیماری کولیت اولسروز، محسوب می‌شوند. همچنین هر دو ژنوتیپ GG و CC، احتمال ابتلا به بیماری کولیت اولسروز را افزایش می‌بخشند. به علاوه، با بررسی نتایج پلی‌مورفیسم‌های مربوط به این دو ژن به نظر می‌رسد که ارتباط معنی‌داری بین هر دو پلی‌مورفیسم و افزایش ابتلا به بیماری کولیت اولسرو وجود دارد.*

واژگان کلیدی: *کولیت اولسروز، پلی‌مورفیسم، IL-10 (A1082G)، IL-10 (T819C).*

مقدمه

بیماری‌های التهابی روده که به دلیل اختلال در پاسخ‌های ایمنی نسبت به عوامل محیطی، در افرادی که از نظر ژنتیکی مستعد هستند، ایجاد می‌شود، به دو نوع کرون و کولیت اولسراتیو تقسیم می‌شوند. این بیماری‌ها دارای دوره‌های متناوب حمله و نهفتگی می‌باشند. بین علایم کرون و کولیت اولسراتیو تفاوت وجود دارد (۱، ۲).

بیماری کولیت‌اولسروز (Ulcerative Colitis; UC) اغلب در سنین ۱۵ تا ۴۰ سال دیده می‌شود. کولیت‌اولسروز تنها در دیواره داخلی روده‌ی بزرگ و مقعد رخ می‌دهد. وقتی فقط مقعد را درگیر کند، پروکتیت (Proctitis) نامیده می‌شود. التهاب مقعد و روده بزرگ باعث جلوگیری از جذب آب و در نتیجه ایجاد اسهال می‌شود. کولیت‌اولسروز بیماری است که گاهی بهبود می‌یابد و گاهی دوباره عود می‌کند (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

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. درواقع، یک ارتباط قوی بین ژن‌های ناحیه‌ی آنتی‌ژن لکوسیت انسانی مداخله کننده 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 تأثیر قرار می‌دهند. در نهایت، پلی‌مورفیسم‌های آنتاگونیست گیرنده اینترلوکین-۱ که احتمالاً شدت و وجود بیماری را تحت تأثیر قرار می‌دهد، گزارش شده‌اند؛ خصوصاً در بیماران مثبت از لحاظ pANCA و همچنین MUC3، ژن کد کننده موسین‌های روده‌ای که می‌تواند همچنین با پاتوژنز UC در ارتباط باشد (۴). گرچه مرگ به علت این بیماری درحال حاضر شایع نیست، ولی این بیماری هم‌چنان باعث از کار افتادگی و ضعف به خصوص در جوانان بالغ می‌شود (۵).

بیماری کولیت‌اولسروز 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 کولیت‌اولسروز 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، ایمنولوژیک 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 برروی جمعیتی از بیماران صورت گرفته است (۷، ۸).

همچنین فراوانی ابتلا به کولیت‌اولسروز در زنان به میزان بیشتری دیده می‌شود و افزایش فراوانی ابتلای بیماران زن در کولیت‌اولسروز فامیلی با نسبت زن به مرد ۱/۳ تا ۱/۵ 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 کولیت‌اولسروز 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 ماست‌سل 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

حساسیت و مقاومت نسبت به بیماری‌هایی مانند اریتروماتوس لوپوس سیستمیک، سرطان، عفونت‌های میکروباکتریایی و خوره، تعریف شده‌اند. پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی و میکروستلایت‌ها در ناحیه‌ی پروموتر ژن IL-10، هاپلوتایپ‌های متعددی را تشکیل می‌دهند که با سطوح متمایز تولید IL-10 مرتبط می‌باشند. هاپلوتایپ‌های پلی‌مورفیسم‌های دیستال و پروگزیمال پروموتر 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 فوق‌تخصص 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 کلونوسکوپی 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 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 ۲µl 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 پلیمراز (PCR) براساس پروتکل آمده در ادامه، صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 ((chi-square($\chi 2$) و نسبت شانس (Odds Ratio: OR) انجام گرفت. $p<۰/۰۵$ 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 ($p=۰/۵۲$). همچنین میانگین سنی افراد مورد مطالعه در این

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای پلی‌مورفیسم A1082G پروموتر ژن *IL10* (۱۳)

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

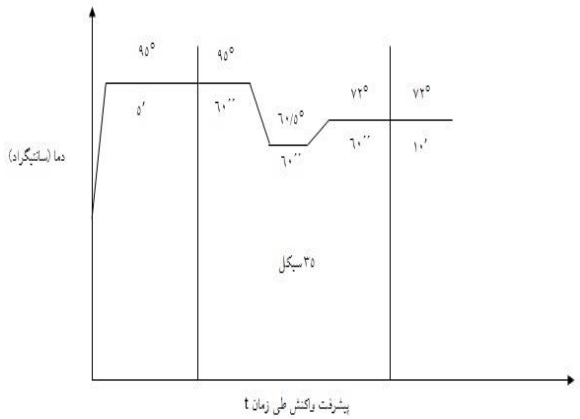
*W = Wild type; *M= Mutant

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده برای پلی‌مورفیسم T819C پروموتر ژن IL10 (۱۳)

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

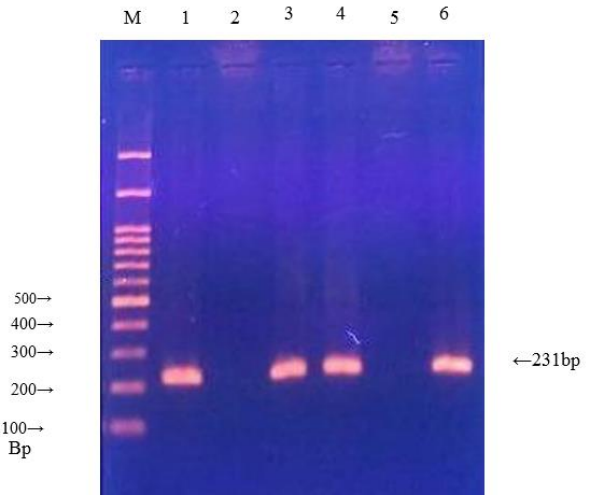
*W = Wild type; *M= Mutant

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=۰/۹۳).

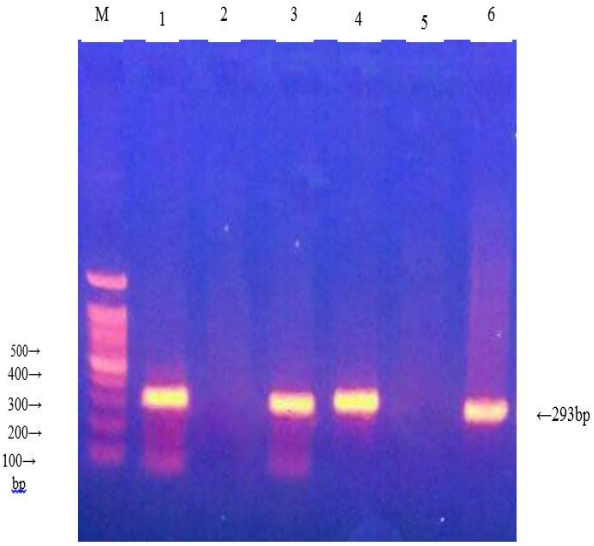


شکل ۱. پروفایل حرارتی واکنش PCR ژن IL10

در این تحقیق پلی‌مورفیسم A1082G(A→G) ژن 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 (۶۰-۴۵ دقیقه) الکتروفورز انجام و باندهای DNA مربوط به ناحیه تکثیر شده ژن 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 وR؛ 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 ۳۴ نفر (۲۲/۷ ٪) دارای ژنوتیپ GG بودند (نمودار ۱). آزمون آماری کای‌دو تفاوت معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌ها در دو گروه مورد مطالعه نشان داد (p<۰/۰۰۰۱).



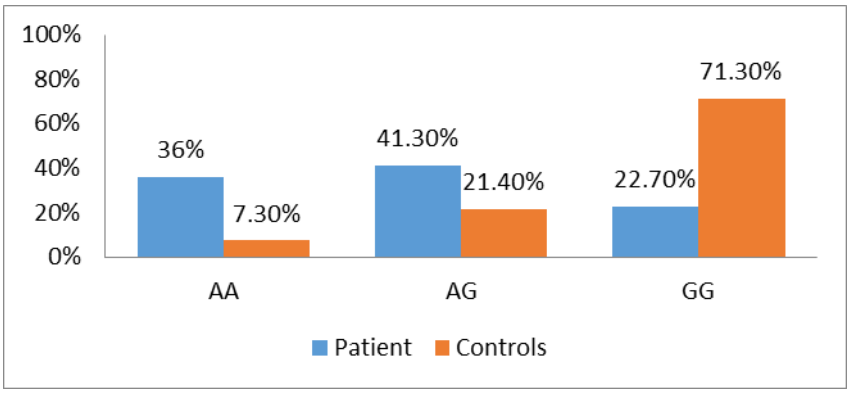
شکل ۲. محصولات PCR پلی‌مورفیسم A1082G زن IL-10 بر روی ژل آگارز ۲٪. ردیف‌های ۱ و ۲ مربوط به فرد با ژنوتیپ AA، ۳ و ۴ فرد AG و ۵ و ۶، فرد GG هستند. ردیف M مربوط به مارکر 100bp (Bioron ساخت کشور ایتالیا) جهت تشخیص قطعه تکثیر شده است.



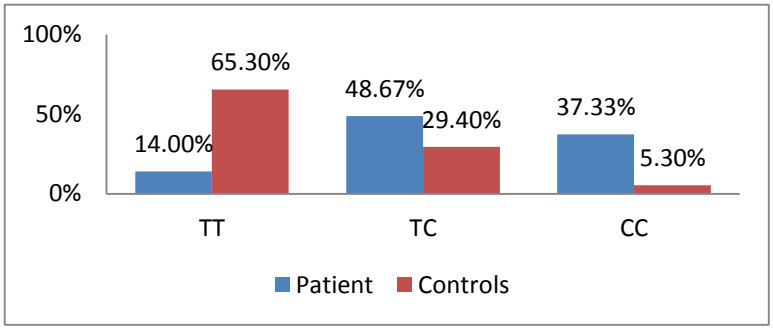
شکل ۳. محصولات PCR پلی‌مورفیسم T819C ژن IL10 برروی ژل آگارز ۲٪. ردیف‌های ۱ و ۲ مربوط به فرد با ژنوتیپ TT، ۳ و ۴ فرد TC و ۵ و ۶، فرد CC هستند. ردیف M مربوط به مارکر 100bp (Bioron ساخت کشور ایتالیا) جهت تشخیص قطعه تکثیر شده است.

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=۰/۰۱). با توجه به میزان OR به دست آمده به میزان ۰/۴ (فاصله اطمینان ۹۵٪: ۰/۸۶-۰/۱۹) 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 الل A برابر ۵۶/۶۷ ٪ و فراوانی الل G برابر ۴۳/۳۳ ٪ بود. در گروه



نمودار ۱. درصد فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده‌ی پلی‌مورفیسم A1082G پروموتر ژن IL10 در دو گروه کنترل و بیمار



نمودار ۲. درصد فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده‌ی پلی‌مورفیسم T819C پروموتر ژن IL10 در دو گروه کنترل و بیمار.

کنترل، فراوانی الل A برابر با ۱۸ ٪ و فراوانی الل G برابر با ۸۲ ٪ بود. در جدول ۴، فراوانی‌های اللی آورده شده است. تفاوت مشاهده شده بین افراد بیمار و کنترل باتوجه به آزمون کای‌دو از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۰۱). پلی‌مورفیسم T819C(T→C) در پروموتر ژن IL10 مورد بررسی قرار گرفت. در این پلی‌مورفیسم تبدیل باز تیمین به سیتوزین صورت می‌گیرد. برای این پلی‌مورفیسم 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. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، محصول حاصل از PCR پلی‌مورفیسم مربوطه ژن که قطعه‌ای به طول ۲۹۳ جفت باز است، شامل ناحیه‌ای است که دارای الل 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 پلی‌مورفیسم T819C پروموتر 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 TC و ۸ نفر (۵/۳ ٪) دارای ژنوتیپ هموزیگوت موتانت CC بودند. در بین ۱۵۰ نفر گروه بیمار، ژنوتیپ TT در ۲۱ نفر (۱۴ ٪)، 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<۰/۰۰۰۱).

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<۰/۰۰۰۱). همچنین براساس میزان OR به دست آمده یعنی ۳۲/۶۷ (فاصله اطمینان ۹۵ ٪: ۷۸/۶۰-۱۳/۵۸) احتمالاً این ژنوتیپ خطر ابتلا به بیماری کولیت‌اولسراتیو را افزایش می‌بخشد و می‌تواند به عنوان یک فاکتور خطر منفی محسوب شود.

همچنین، بررسی فراوانی اللی در افراد کنترل و بیمار در پلی‌مورفیسم T890C پروموتر ژن IL10 نشان می‌دهد که در افراد کنترل فراوانی الل T برابر ۸۰ ٪ و فراوانی الل C برابر ۲۰ ٪ و در افراد بیمار به ترتیب فراوانی الل T، ۳۸/۳۳ ٪ و فراوانی الل C، ۶۱/۶۷ ٪ است و تفاوت معنی‌داری بین فراوانی اللی افراد کنترل و بیمار مشاهده شد (p<۰/۰۰۰۱). 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 الل

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

پلی‌مورفیسم	ژنوتیپ	گروه کنترل (٪) n	گروه بیمار (٪) n	OR (CI 95%)	P
A1082G	AA	۵۴ (٪۳۶)	۱۱ (٪۷/۳)	Ref (1)	-
	AG	۶۲ (٪۴۱/۳)	۳۲ (٪۲۱/۴)	۰/۴۸(۰/۱۹-۰/۸۶)	۰/۰۱۸۹
	GG	۳۴ (٪۲۲/۷)	۱۰۷ (٪۷۱/۳)	۰/۰۶(۰/۰۳-۰/۱۴)	<۰/۰۰۰۱

جدول ۴. بررسی فراوانی اللی پلی‌مورفیسم A1082G

پلی‌مورفیسم	آلل	گروه بیمار (٪)	گروه کنترل (٪)	X2	P
A1082G	A	۵۶/۶۷	۱۸	۹۴/۲۱	<۰/۰۰۰۱
	G	۴۳/۳۳	۸۲		

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

پلی‌مورفیسم	ژنوتیپ	گروه بیمار (٪)n	گروه کنترل (٪)n	OR (95% CI)	p
T89C	TT	۲۱ (٪۱۴)	۹۸ (٪۶۵/۳)	Ref (1)	-
	TC	۷۳ (٪۴۸/۶۷)	۴۴ (٪۲۹/۴)	۷/۷۴ (۴/۲۴-۱۴/۱۳)	<۰/۰۰۰۱
	CC	۵۶ (٪۳۷/۳۳)	۸ (٪۵/۳)	۳۲/۶۷ (۱۳/۵۸-۷۸/۶۰)	<۰/۰۰۰۱

جدول ۶. بررسی فراوانی اللی پلی مورفیسم T819C ژن IL-10

پلی‌مورفیسم	آلل	گروه بیمار (٪)	گروه کنترل (٪)	OR	95% CI	χ2	P
T890C	T	۳۸/۳۳	۸۰	۶/۴۳	۴/۴۶-۹/۲۸	۱۰۶/۰۷	<۰/۰۰۰۱
	C	۶۷/۶۱	۲۰				

معنی‌دار است (p<۰/۰۰۰۱). باتوجه به میزان OR بدست آمده یعنی ۶/۴۳ (فاصله اطمینان ۹۵٪: ۹/۲۸-۴/۴۶) 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).

مطالعات متعددی در زمینه ارتباط پلی‌مورفیسم‌های پروموتر 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 IL10 A1082G، 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

هاپلوتایپ‌های ATA/ATA در بیماران به عنوان عوامل مستعد کننده بیماری تب مالت مطرح می‌شوند (۱۸).

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

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

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

در مطالعه‌ای، محققان پلی‌مورفیسم‌های سایتوکاین (TNFα, LTα و IL-10) را در بیماری‌های التهابی روده و افراد سالم به منظور تعیین اثرات متمایز برروی تولید و فراوانی‌های آللی، بررسی کردند. نتایج آنها شاهدی دال بر وجود اثر پلی‌مورفیسم‌های ژن TNFα، LTα و IL-10 برروی اختلاف میزان تولید در بیماران مبتلا به کرون، مبتلا به کولیت اولسروز و افراد سالم فرآهم آورد (۲۰).

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

در پژوهشی دیگر، ارتباط بین جهش‌های تأثیرگذار بر گیرنده اینترلوکین-۱۰ و بیماری التهابی روده مورد بررسی قرار گرفت. محققان این پژوهش بیان کردند که جهش‌های رخ دهنده در ژن‌های کد کننده زنجیره‌های پلی‌پپتیدی گیرنده IL10 که مسیر سیگنالینگ ایمونومدولاسیون میانجی شده توسط IL10 را معیوب می‌کنند، به شدت با التهاب بیش از حد روده در ارتباط هستند (۲۲).

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

براساس نتایج بدست آمده در این مطالعه، بین پلی‌مورفیسم‌های A1082G و T819C پروموتر ژن IL-10 در دو گروه کنترل و بیمار، ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p<0/05$). این نتایج با مشاهدات تحقیقات قبلی محققان در رابطه با نقش این پلی‌مورفیسم‌ها و تغییرات ژنتیکی آن در بیماری‌های مختلف از جمله HBV (۱۳) و تب مالت (۱۲) در توافق است. به علاوه، باتوجه به تغییرات اللی که در پلی‌مورفیسم‌های A1082G و T819C رخ می‌دهد، یعنی به ترتیب، تبدیل آللی A به G و T به C، ارتباط معنی‌داری بین فراوانی الل‌های 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 مطالعه‌ای مشابه در این منطقه جغرافیایی است.

باتوجه به نتایج به دست آمده در رابطه با هر دو نوع پلی‌مورفیسم‌های A1082G و T819C پروموتر ژن IL-10، به ترتیب احتمالاً الل G و الل C، فاکتورهای خطر برای ایجاد بیماری کولیت‌اولسروز، محسوب می‌شوند. همچنین هر دو ژنوتیپ GG و CC، احتمال ابتلا به بیماری کولیت‌اولسروز را افزایش می‌بخشند. به علاوه با بررسی نتایج پلی‌مورفیسم‌های مربوط به این دو ژن به نظر می‌رسد که ارتباط معنی‌داری بین هر دو پلی‌مورفیسم و افزایش ابتلا به بیماری کولیت اولسرو وجود دارد.

این مطالعه به سبب بررسی هم‌زمان ارتباط بین دو پلی‌مورفیسم A1082G و T819C پروموتر ژن IL-10 با کولیت‌اولسروز، برای اولین بار در جمعیت شمال ایران، حائز اهیمت است. لذا برای درک بهتر نقش این عوامل ژنتیکی و نتیجه‌گیری کلی‌تر، مطالعات وسیع‌تر، دقیق‌تر و بسیار کنترل شده‌تر 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 معنی‌دار اندازه جمعیت تغییر کند.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه 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

زحمات دکتر بهمن ساجدی که زحمت تامین نمونه‌ها را بر عهـده داشتند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

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 Iraninan 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.