Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Mosul
College of Medicine

Interleukin-6 Serum Level and Single Nucleotide Gene -174 G/C Promoter Polymorphism in Patients with Rheumatoid Arthritis/Nineveh

A Thesis submitted
to
the Council of the College of Medicine
University of Mosul
in partial fulfillment of the requirements for the
Degree of Master of Science (M.Sc.) in
Microbiology
by

Ruba Ahmed Ibrahim Al- Khames Aga
B. Sc. Biology (1994)
College of Science, Department of Biology, University of Mosul

Supervised by
Lecturer Dr. Firas Muhammed Al-Tae

2021 A.D. **1442 A. H.**

ABSTRACT

Objectives: This study was conducted to achieve the following aims: **1)** To assess serum IL-6 levels in patients with RA and compare them to IL-6 levels in healthy controls. **2)** To study IL-6 promoter -174 G>C single nucleotide polymorphism (SNP) as a risk factor for disease development. **3)** To illustrate the effect of IL-6 promoter -174 G>C SNP on the IL-6 serum concentration. **4)** To find any association between IL-6 serum level and other parameters such as age, gender, clinical severity of diseases and disease activity scores (DAS28).

Materials & methods: This is a case - control study carried out at "Ibn - Senna Teaching Hospital" in Mosul city between November 2020 and July 2021. It included 61 RA patients diagnosed according to ACR / EULAR criteria (2010) and 50 healthy controls. IL-6 serum levels were ascertained by ELISA immunoassay and IL-6 promoter genotyping was accomplished by the sequence-specific primer-polymerase chain reaction (SSP-PCR).

Results: Mean IL-6 level in RA (69.42 ng /l ± 62.99) was significantly increased compared to healthy controls (14.66 ng /l ± 23.58), $P < 0.001$. No age or gender effects on IL-6 concentration were noted. The optimal cut-off value of IL-6 for the diagnosis of RA with the best discriminative utility compared to healthy controls was 22.80 ng/l. At this cut-off value the sensitivity of IL-6 was 91.8%, specificity 82.0% and accuracy rate 73.80%. G/G genotype was the most prevalent in both patients and controls (70.5% in RA and 64% in healthy controls). However, it did not seem to be a risk factor for RA development compared to G/C and C/C genotypes (OR = 1.3438, 95% CI=0.605-2.984, P=0.469). Meanwhile, the mean IL-6 level in patients with GG genotype was (73.70 ng / l ± 71.09) compared to (58.37 ng /l ± 37.86)

in patients with GC genotype. Unfortunately, only one patient with CC genotype had been reported in this study with IL-6 level of 73.28 ng/l. There was no significant difference in the IL-6 level between patients with GG and patients with GC genotypes (P = 0.2375). Furthermore, the mean IL-6 concentration in patients with mild RA was (49.67 ng/l ± 17.33) in comparison to (55.76 ng/l ± 24.00) in moderate RA and (77.91 ng/l ± 76.04) in severe RA respectively. Although higher IL-6 mean concentration was reported in severe RA, no significant difference was found between all three groups. No correlations of IL-6 serum levels with overall DAS 28 score (r = 0.1145, P = 0.3796) or with ESR (r = -0.1136, P = 0.3832) were reported.

Conclusions: IL-6 serum level was higher in RA compared to healthy controls which confirmed its pivotal role in the pathogenesis of RA. We could not find any particular age trend or gender difference between males and females in regard to IL-6 concentration in RA patients. Our data did not support the role of IL-6 promoter -174 G> C polymorphism as a risk factor for the development RA, nor seem to play a major role in the increase of IL-6 level among our RA patients.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل/ كلية الطب

مستوى مصل الانترلوكين ٦ مع تعدد اشكال النيوكليوتايد المفرد - G/C 174 في محفزه الجيني لدى مرضى التهاب المفاصل الرثوي/ نينوى

رسالة مقدمة

لمجلس كلية الطب/ جامعة الموصل كجزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

علوم/احياء مجهرية

من قبل

ربا احمد إبراهيم آل خميس آغا

بكالوريوس علوم (١٩٩٤)

كلية العلوم، قسم علوم الحياة، جامعة الموصل

بإشراف

المدرس الدكتور فراس محمد الطائي

1442 هـ

2021 م

مستوى مصل الانترلوكين 6 مع تعدد اشكال النكليوتايد المفرد - G/C 174 في محفزه الجيني لدى المرضى المصابين بالتهاب المفاصل الرثوي /نينوى

الخلاصة

الأهداف : أجريت هذه الدراسة لتحقيق الأهداف التالية: **1)** تقييم مستويات الانترلوكين السادس في امصال المرضى المصابين بداء المفاصل الرثوي ومقارنتها بمثيلاتها في الاشخاص الاصحاء. **2)** دراسة تعدد أشكال النكليوتايد المفرد (SNP) - G/C 174 في المحفز الجيني للانترلوكين السادس كعامل خطورة محتمل في تطور ونشوء المرض **3)** توضيح مدى تأثير تعدد أشكال النكليوتايد المفرد (SNP) - G/C 174 على المستويات المصلية للانترلوكين السادس لدى المرضى المصابين بداء المفاصل الرثوي. 4) دراسة مدى الارتباط بين الانترلوكين ومعايير أخرى مثل العمر والجنس والشدة السريرية للمرض ودرجة نشاط المرض (DAS 28).

المواد وطرق العمل: هذه الدراسة هي من نوع دراسات الحالات والشواهد وقد اجريت في مستشفى ابن سينا التعليمي في مدينة الموصل في الفترة الممتدة بين شهري تشرين الثاني 2020 الى تموز 2021. تضمنت هذه الدراسة 61 مريضًا بالتهاب المفاصل الرثوي شخصوا من قبل أطباء اخصائيين (تم تشخيصهم اعتمادا على الخصائص المعتمدة من قبل الكلية الامريكية لأمراض المفاصل والرابطة الاوروبي للمفاصل لعام 2010) و 50 شخصا طبيعيا للمقارنة. تم التحقق من مستويات IL-6 في امصال المشاركين بواسطة فحص الاليزا المناعي، بالمقايسة الامتصاصيَّة المناعيَّة للإنزيم المرتبط (ELISA) بينما تم الكشف عن تعدد أشكال النكليوتايد المفرد - G/C 174 بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئات (برايمرات) خاصة بالتسلسل الجيني (SSP-PCR) .

النتائج : متوسط مستوى الانترلوكين السادس في المرضى المصابين بالتهاب المفاصل الرثوي ± 69.42) (62.99 نانوغرام / لتر أعلى بشكل ملحوظ مقارنة بالأشخاص الطبيعيين (23.58 ± 14.66) نانوغرام/ لتر ، $P < 0.001$. لم يلاحظ أي تأثير للعمر أو الجنس على متوسط مستويات الانترلوكين السادس . كانت القيمة الفاصلة المثلى للانترلوكين السادس في مرضى المفاصل والتي أعطت أفضل فائدة تمييزية عن الأشخاص الطبيعيين هي 22.80 نانوغرام / لتر. عند هذه القيمة بلغت الحساسية التشخيصية 91.8 % والخصوصية 82.0 % ومدى الدقة 73.8 % . كان النمط الجيني G / G هو الأكثر انتشارًا في كلا من المرضى المصابين بالتهاب المفاصل الرثوي وللأشخاص الطبيعيين على حد سواء (70.5 ٪ في المرضى و

64 ٪ في الاشخاص الطبيعيين). ومع ذلك، لا يبدو أنه عامل خطر للإصابة بداء المفاصل الرثوي بين المرضى مقارنة بالأنماط الجينية G / C أو C / C (OR = 1.3438, 95% CI = 0.605-2.984 9) .P=0.46

كان متوسط مستوى الانترلوكين السادس في المرضى ذوو النمط الجيني G/G هو (71.09 ± 73.70) نانوغرام / لتر مقارنة ب (58.37 ± 37.86) نانوغرام / لتر في المرضى ذو النمط الجيني G/C . تم تسجيل مريض واحد فقط في هذه الدراسة من ذوي النمط الجيني C/C وكان مستوى الانترلوكين السادس فيه هو 73.28 نانوغرام / لتر . لم يكن هنالك اية فروقات احصائية بين المستويات المصلية للانترلوكين السادس بين المرضى ذوو النمط الجيني G/G والمرضى ذوو النمط الجيني G/C (P = 0.2375) . اضافة الى ذلك كان معدل مستويات الانترلوكين السادس في المرضى ذوو الشدة الخفيفة هو (49.67 ± 17.33 نانوغرام / لتر مقرنة ب (55.76 ± 24.00) نانوغرام / لتر في الحلالات المتوسطة الشدة و (77.91 ± 76.04) نانوغرام / لتر في الحلالات الشديدة. وعلى الرغم من تسجيل متوسط تركيز اعلى في الحلالات الشديدة ، الا انه لم يتم ملاحظة اي فروقات احصائية في متوسط تركيز الانترلوكين السادس بين المجاميع الثلاثة. كذلك لم يتم تسجيل أي ارتباط او علاقة بين مستويات الانترلوكين السادس المصلية مع نتيجة النشاط المرضي DAS28 (r = 0.1145, P = (0.379 او مع ESR (r = -0.1136, P = 0.3832) .

الاستنتاجات : كانت مستويات الانترلوكين السادس في امصال المرضى المصابين بالتهاب المفاصل الرثوي اعلى بكثير من مستوياتها في الاشخاص الطبيعيين مما يؤكد على الدور الحيوي الذي يلعبه الانترلوكين السادس في التسبب بالتهاب المفاصل الرثوي بين المرضى. لم تثبت الدراسة وجود تأثير للعمر او الجنس على مستويات الانترلوكين السادس بين المرضى . لم تدعم بياناتنا ايضا دور تعدد أشكال النكليوتايد المفرد - G/C 174 في المحفز الجيني للانترلوكين السادس كعامل خطورة لنشوء المرض ، كما انه لا يبدو أنه يلعب دورًا رئيسيًا في زيادة المستويات المصلية للانترلوكين السادس بين مرضى التهاب المفاصل الرثوي.