

Original Article

ارتباط بین پلی مورفیسم‌های ژن اینترلوکین ۱۸ (موقعیت‌های -۶۵۶ G/T ، -۱۳۷ G/C و $+۱۰۵\text{ A/C}$) و بیماری کالآزار

یاسر منصوری^۱، علی مروج^۲، سهراب نجفی پور^۳، سید امین کوهپایه^۳، محمد حسن مشکی باف^۱، عباس عبدالهی^۲
منوچهر رسولی^{۴*}، قادر الهوردی^۱

۱- گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فارس، ایران.

۲- گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فارس، ایران.

۳- گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فارس، ایران.

۴- گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، فارس، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۰۳/۲۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: مقاومت میزبان به انگل *لیشمانیا* به طور عمده توسط پاسخ ایمنی سلولی که منجر به فعال شدن ماکروفاژها می‌شود انجام می‌گیرد. اینترلوکین ۱۸ (IL-18) به عنوان عامل القاء کننده تولید اینترفرون γ شناخته شده و با تحریک سلول‌های T منجر به تولید IFN- γ می‌شود. با توجه به نقش مهم IL-18 در دفاع در برابر لیشمانیوز احشایی (VL) و نقش شناخته شده پلی مورفیسم‌های ژن *IL18* در تولید این سایتوکاین، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط احتمالی بین پلی مورفیسم‌های ژن *IL18* و استعداد ابتلا به VL در بیماران ایرانی است.

مواد و روش‌ها: گروه‌های مورد مطالعه شامل ۱۱۸ کودک مبتلا به VL و ۱۵۶ کودک سالم غیر وابسته از منطقه بومی بیماران بودند. در هر دو گروه مورد مطالعه پلی مورفیسم‌های ژن *IL18* در موقعیت‌های -۶۵۶ G/T ، -۱۳۷ G/C و $+۱۰۵\text{ A/C}$ با استفاده از روش PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: نتیجه این تحقیق نشان داد که فراوانی آلل T در موقعیت -۶۵۶ در گروه شاهد به طور معنی داری در مقایسه با بیماران مبتلا به کالآزار بالاتر است ($P=0.047$). اما در هیچ یک از ژنوتیپ‌های IL-18 بین بیماران و گروه شاهد تفاوت معنی داری وجود نداشت. علاوه بر این، فراوانی هاپلوتیپ ATG و هاپلوتیپ AGG/ATG به میزان قابل توجهی در گروه شاهد در مقایسه با بیماران مبتلا به VL بالاتر بود ($P=0.043$ و $P=0.044$). به علاوه، مشخص شد که حرکت ترجیحی قوی بین پلی مورفیسم‌های ژن *IL18* در موقعیت‌های -۶۵۶ G/T ، -۱۳۷ G/C و $+۱۰۵\text{ A/C}$ وجود دارد ($P<0.001$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی آلل T در موقعیت -۶۵۶ و فراوانی هاپلوتیپ ATG و هاپلوتیپ AGG/ATG (موقعیت‌های -۱۳۷ ، -۶۵۶ و $+۱۰۵$) به طور معنی داری در گروه کنترل بیشتر است. بر اساس اطلاعات ما تاکنون مطالعه‌ای در مورد ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن *IL18* و بیماری VL در ایران و در کشورهای دیگر انجام نشده است، بنابراین امکان مقایسه نتایج به دست آمده با مطالعات دیگر وجود نداشت و به نظر می‌رسد که تحقیقات بیشتر در این زمینه در سایر جمعیت‌ها ارزشمند خواهد بود.

کلمات کلیدی: اینترلوکین ۱۸، پلی مورفیسم ژنی، لیشمانیوز احشایی، ایران

مقدمه

لیشمانیوز احشایی (VL)، یک بیماری عفونی سیستمیک ناشی از تک یاخته درون سلولی به نام *لیشمانیا دونوانتی* است. این بیماری از نظر بالینی با علائمی مثل تب طولانی مدت، کاهش وزن، بزرگ شدن کبد و طحال و هایپرگاماگلوبولینمی مشخص می‌شود که در صورت عدم درمان، ممکن است عواقب کشنده داشته باشد. تعداد موارد ابتلا به VL حدود ۵۰۰۰۰۰ نفر در هر سال در سراسر جهان با بیش از ۵۰۰۰۰ مورد مرگ تخمین زده می‌شود (۱). *لیشمانیا* می‌تواند با تعدیل فعالیت‌های ضد میکروبی و هم چنین با افزایش سیالیت غشای

لیشمانیوز احشایی (VL)، یک بیماری عفونی سیستمیک ناشی از تک یاخته درون سلولی به نام *لیشمانیا دونوانتی* است. این بیماری از نظر بالینی با علائمی مثل تب طولانی مدت، کاهش وزن، بزرگ شدن کبد و طحال و هایپرگاماگلوبولینمی مشخص می‌شود که در صورت عدم درمان، ممکن است عواقب کشنده داشته باشد. تعداد موارد ابتلا به VL حدود ۵۰۰۰۰۰ نفر در هر سال در سراسر جهان با بیش از ۵۰۰۰۰ مورد مرگ تخمین زده می‌شود (۱). *لیشمانیا* می‌تواند با تعدیل فعالیت‌های ضد میکروبی و هم چنین با افزایش سیالیت غشای

*نویسنده مسئول: منوچهر رسولی، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، فارس، ایران. تلفن: ۰۷۱۱-۶۴۷۴۳۰۴
Email: rasouliman@yahoo.com

شاهد ۸ میلی لیتر خون حاوی ضد انعقاد EDTA گرفته و نمونه‌ها با استفاده از روش Salting out استخراج شد (۳۲). این مطالعه تحت نظارت کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز انجام شد و نمونه خون پس از اخذ رضایت‌نامه از پدر و مادر کودکان گرفته شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز - پلی مورفیسم محدود به طول قطعه (PCR-RFLP): پلی مورفیسم ژن *IL18* توسط PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای هر نمونه، سه واکنش PCR با استفاده از سه جفت پرایمر اختصاصی برای نقاط پلی مورفیک (۶۵۶ G/T، ۱۳۷ G/C، ۱۰۵ A/C) (کدون ۳/۳۵) انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی PCR ۱ X بافر، ۰/۵ میکرومولار پرایمر اختصاصی (Primers، ایتالیا)، ۰/۵ واحد DNA پلیمرز، ۰/۲ میلی لیتر مخلوط dNTPs (همه از CinnaGen، ایران)، و غلظت اختصاصی $MgCl_2$ (جدول ۱) بود. برنامه دستگاه PCR (Thermocycler 5530 Mastercycler Eppendorf، آلمان) عبارت بود از دناتوراسیون به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ سیکل به ترتیب ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در دماهای خاص اتصال پرایمر (جدول ۱)، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و نهایتاً ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه. پس از انجام PCR، محصولات توسط آنزیم‌های محدودالانتر (Fermentas، لیتوانی) هضم شدند. در نهایت محصولات هضم شده در ژل آگارز ۳٪ الکتروفورز شد و توسط اتیدیوم بروماید (CinnaGen، ایران) رنگ‌آمیزی گردید. سپس ژل‌ها در زیر دستگاه UV transilluminator مورد مطالعه قرار گرفتند. توالی پرایمرها، دماهای اتصال پرایمر، غلظت $MgCl_2$ ، آنزیم‌های محدودالانتر و اندازه محصول DNA پس از هضم در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

تجزیه و تحلیل آماری: میزان آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها به روش شمارش مستقیم محاسبه شد و با استفاده از آزمون مجذور کای با سطح اهمیت کمتر از ۰/۰۵ توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ و EPI INFO 2000 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از نرم‌افزار Arlequin به منظور برآورد میزان هاپلوتیپ و هاپلوژنوتیپ و تعادل هاردی وینبرگ استفاده شد. علاوه بر این، حرکت ترجیحی (LD) با برنامه LD2SNPping برآورد شد.

IL-1 است، در حال حاضر به عنوان یک تنظیم‌کننده مهم پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی شناخته می‌شود. IL-18 به عنوان عامل القای تولید اینترفرون γ شناخته شده است و موجب تحریک سلول‌های T-CD4+ و تولید IFN- γ توسط این سلول‌ها می‌شود (۶-۴). اگرچه IL-8 در اصل به عنوان یک عامل قادر به القای تولید IFN- γ توسط سلول‌های T مشخص شده است، اما شناخت نقش مؤثر IL-18 در سایر فعالیت‌های ایمنی به سرعت در حال گسترش است. IL-18 باعث فعال شدن نوتروفیل، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و آزادسازی سایتوکین‌ها می‌شود (۷-۸). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که IL-18 نقش مهمی در بیان مولکول‌های چسبان ICAM-1 و VCAM-1 بر روی سلول‌های اندوتلیال دارد (۹). نقش مهم IL-8 در مصنویت در مقابل VL به خوبی شناخته شده است. مشخص شده است که در هنگام عفونت سلول‌ها با گونه‌های مختلف لیشمانیا، ترشح IL-18 افزایش می‌یابد (۱۰). علاوه بر آن ثابت شده است که موش‌های دارای نقص در تولید IL-18 که آلوده به لیشمانیا هستند تولید IFN- γ در آن‌ها به طور قابل توجهی پایین‌تر است و همچنین سطح سرمی IL-12 در آن‌ها پایین است که این موارد خود نشان دهنده کاهش پاسخ Th1 در این موش‌هاست (۱۱).

تحقیقات نشان می‌دهد که افراد مختلف به میکروکروم‌های مشابه پاسخ‌های ایمنی متفاوتی نشان می‌دهند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پلی مورفیسم ژن‌ها بر بیان سایتوکین‌ها تأثیر بسزایی دارند، بنابراین پلی مورفیسم‌های ژنی نقش مهمی در استعداد افراد گوناگون به بیماری‌های عفونی ایفا می‌کنند (۱۵-۱۲). با توجه به نقش مهم IL-18 در دفاع در برابر VL و اثر پلی مورفیسم‌های ژن *IL18* در تولید آن، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط احتمالی بین پلی مورفیسم ژن *IL18* و استعداد ابتلا به VL بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و استخراج DNA: گروه مورد مطالعه شامل ۱۱۸ کودک مبتلا به لیشمانیوز احشایی و ۱۵۶ کودک غیر وابسته سالم از منطقه بومی بیماران بود. تمام بیماران با تشخیص VL بر اساس تظاهرات بالینی کالآزار مثل کم‌خونی، بزرگی کبد و طحال و تب، اسمیر مثبت مغز استخوان و تست آنتی‌بادی فلورسنت غیر مستقیم (IFA) $\leq 1:128$ در بخش بیماری‌های عفونی اطفال بیمارستان نمازی شیراز بستری شده بودند. از تمام بیماران و گروه

جدول ۱: توالی پرایمرها و شرایط PCR و آنزیم‌های محدودالانتر برای تکثیر ژن IL-18 در نقاط پلی مورفیک مختلف

IL-18 Polymorphisms	PCR primers	Annealing Temp.(°C)	MgCl ₂ (mM)	Restriction enzymes	Fragment sizes (bp)
-656(G/T)	F: AGGTCAGTCTTTGCTATCATTCAGG R: CTGCAACAGAAAGTAAGCTTGGCGAGAGG	۶۰	۱	<i>Mwo I</i>	G: ۹۶ + ۲۴ T: ۱۲۰
-137 (G/C)	F: CCAGCTTGCTGAGCCCTTTGCTCC R: GCAGGTGGCAGCCGCTTTAGCAGCTAG	۶۰	۱/۵	<i>Mbo II</i>	G: ۱۱۶ + ۳۹ C: ۱۵۵
codon35/3 (A/C)	F: AGATTTAATGTTTATTGTAGAAAACCTGGACTC R: CAGTCATATCTTCAAATAGAGGCCG	۵۵	۳	<i>Dde I</i>	A: ۱۰۹ + ۳۲ C: ۱۴۱

نتایج

هاپلوژنوتیپ AGG/ATG به طور قابل توجهی در بیماران مبتلا به VL در مقایسه با گروه شاهد (۱۲/۷٪ در مقابل ۵/۷٪، $P=0.044$) بالاتر بود. نتایج مهم‌ترین هاپلوژنوتیپ‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. علاوه بر این همان‌طور که در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است، حرکت ترجیحی قوی ($P<0.001$) بین نقاط پلی‌مورفیک ۶۰۷، ۱۳۷- و کدون ۳/۳۵ تشخیص داده شد.

بحث

مشابه با سایر انگل‌های داخل سلولی، مقاومت در برابر عفونت *لیشمانیا* نیاز به فعال شدن پاسخ سیستم ایمنی از مسیر Th1 و تولید $\text{IFN-}\gamma$ و فعال شدن ماکروفاژها دارد و از طرف دیگر تولید IL-10 در تشدید بیماری تأثیرگذار است. به این ترتیب، توازن میان پاسخ‌های Th1 و Th2 در کنترل مقاومت یا استعداد ابتلا به عفونت *لیشمانیا*

در این مطالعه سه نقطه پلی‌مورفیک مهم از ژن *IL18* با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج فراوانی آلل و ژنوتیپ پلی‌مورفیک ژن *IL18* در گروه بیمار و شاهد در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در این جدول نشان داده شده است، میزان آلل T در موقعیت ۶۵۶- در گروه شاهد در مقایسه با بیماران مبتلا به VL (۶۳/۴٪ در مقابل ۵۵/۰٪، $P=0.047$) بالاتر بود. در هیچ‌یک از ژنوتیپ‌های IL-18 ارتباط معنی‌داری بین بیماران و گروه شاهد وجود نداشت.

مقایسه هاپلوژنوتیپ‌ها نشان داد که توزیع هاپلوژنوتیپ ATG به طور قابل توجهی در گروه شاهد در مقایسه با بیماران مبتلا به VL (۵۸/۶٪، در مقابل ۵۰/۰٪، $P=0.043$) بالاتر بود (جدول ۳). ۳۴ هاپلوژنوتیپ در دو گروه مورد مطالعه مشاهده شد. توزیع

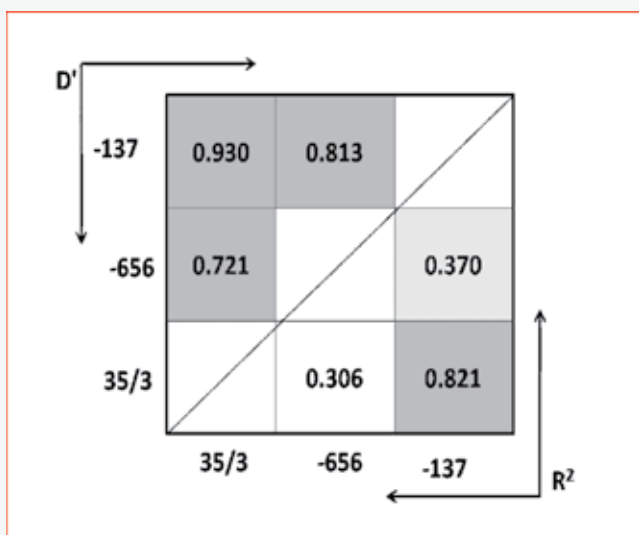
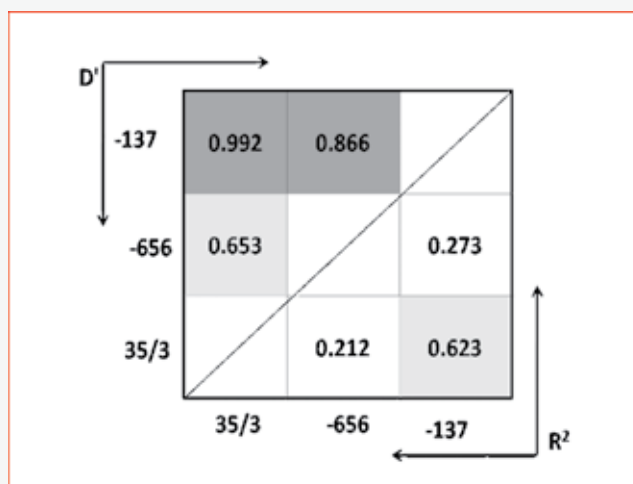
جدول ۲: فراوانی الی و ژنوتیپی ژن IL-18 در نقاط مختلف پلی‌مورفیک در بیماران و گروه کنترل

Genotypes and alleles	Patient group n (%)	Control group n (%)	χ^2	P value*	OR (95% CI)	Study power (%)
IL-18 -656 Genotypes						
TT	۳۸ (۳۲/۲)	۶۴ (۴۱/۰)	۲/۲۴	۰/۱۳	۰/۶۸ (-۰/۴۰-۱/۱۶)	۳۳
TG	۵۴ (۴۵/۸)	۷۰ (۴۴/۹)	۰/۰۲	۰/۸۸	۱/۰۴ (-۰/۶۲-۱/۷۲)	۴
GG	۲۶ (۲۲/۰)	۲۲ (۱۴/۱)	۲/۹۲	۰/۰۸	۱/۷۲ (-۰/۸۸-۲/۳۷)	۳۹
Alleles						
T	۱۳۰ (۵۵/۰)	۱۹۸ (۶۳/۴)	۳/۹۲	۰/۰۴۷	۰/۷۱ (-۰/۴۹-۱/۰۱)	۵۱
G	۱۰۶ (۴۵/۰)	۱۱۴ (۳۶/۶)				
IL-18 -137 Genotypes						
GG	۷۳ (۶۱/۹)	۹۳ (۵۹/۶)	۰/۱۴	۰/۷۰	۱/۱ (-۰/۶۵-۱/۸۵)	۶
GC	۳۶ (۳۰/۵)	۵۰ (۳۲/۱)	۰/۰۷	۰/۷۸	۰/۹۳ (-۰/۵۴-۱/۶۱)	۵
CC	۹ (۷/۶)	۱۳ (۸/۳)	۰/۰۵	۰/۸۳	۰/۹۱ (-۰/۳۴-۲/۳۷)	۴
Alleles						
G	۱۸۲ (۷۷/۱)	۲۳۶ (۷۵/۶)	۰/۱۶	۰/۶۸	۰/۹۲ (-۰/۶۱-۱/۴۰)	۵
C	۵۴ (۲۲/۹)	۷۶ (۲۴/۴)				
IL-18 Codon 35/3 Genotypes						
AA	۶۹ (۵۸/۵)	۹۱ (۵۸/۳)	۰/۰۰	۰/۹۸	۱/۰۱ (-۰/۶-۱/۶۸)	۳
AC	۳۰ (۲۵/۴)	۵۱ (۳۲/۷)	۱/۷۰	۰/۱۹	۰/۷۰ (-۰/۴۰-۱/۲۴)	۲۶
CC	۱۹ (۱۶/۱)	۱۴ (۹/۰)	۳/۲۲	۰/۰۷	۱/۹۵ (-۰/۸۸-۲/۳۳)	۴۱
Alleles						
A	۱۶۸ (۷۱/۲)	۲۳۳ (۷۴/۷)	۰/۸۴	۰/۳۶	۱/۱۹ (-۰/۸۰-۱/۷۸)	۱۰
C	۶۸ (۲۸/۸)	۷۹ (۲۵/۳)				

هر P-value نتیجه مقایسه هر ردیف با مجموع دو ردیف دیگر است.

جدول ۳: فراوانی هاپلوتیپی و هاپلوژنوتیپی ژن IL-18 در نقاط مختلف پلی مورفیک در بیماران و گروه کنترل

Haplotypes (codon 35/3, -656, -137)	Patient Group n (%)	Control group n (%)	χ^2	P value*	OR (95%CI)	Study power (%)
Single haplotype						
ATG	۱۱۸ (۵۰/۰)	۱۸۳ (۵۸/۶)	۴/۰۶	۰/۰۴۳	۰/۷۰ (-۰/۴۹-۱/۰۱)	۵۲
AGG	۴۷ (۱۹/۹)	۴۶ (۱۴/۷)	۲/۵۵	۰/۱۱۰	۱/۴۴ (-۰/۱۹-۲/۳۰)	۳۵
CGC	۴۸ (۲۰/۳)	۶۵ (۲۰/۸)	۰/۰۲	۰/۸۸۷	۰/۹۷ (-۰/۶۲-۱/۵۱)	۳
Double haplotype						
ATG/ATG	۳۴ (۲۸/۸)	۵۸ (۳۷/۲)	۲/۱۱	۰/۱۴۶	۰/۶۸ (-۰/۴۰-۱/۱۸)	۳۱
ATG/CGC	۹ (۷/۶)	۲۴ (۱۵/۴)	۳/۸۲	۰/۰۵۰	۰/۴۵ (-۰/۱۹-۱/۰۸)	۵۴
AGG/ATG	۱۵ (۱۲/۷)	۹ (۵/۷)	۴/۰۵	۰/۰۴۴	۲/۳۸ (-۰/۹۴-۶/۱۵)	۵۰
AGG/AGG	۶ (۵/۱)	۶ (۳/۸)	۰/۲۵	۰/۶۱۹	۱/۳۴ (-۰/۳۷-۴/۸۴)	۷
ATG/AGG	۱۰ (۸/۵)	۱۵ (۹/۶)	۰/۱۱	۰/۷۴۵	۰/۸۷ (-۰/۳۵-۲/۱۵)	۵
CGC/ATG	۶ (۵/۱)	۱۱ (۷/۰)	۰/۴۵	۰/۵۰۴	۰/۷۱ (-۰/۲۲-۲/۱۴)	۱۰


 شکل ۲: حرکت ترجیحی پلی مورفیسم‌های اینترلوکین ۱۸ بر اساس R^2 و D' در گروه کنترل.

 شکل ۱: حرکت ترجیحی پلی مورفیسم‌های اینترلوکین ۱۸ بر اساس R^2 و D' در گروه بیماران.

دو پلی مورفیسم در تغییر سطح IL-18 و نقش مهم این سایتوکاین در دفاع در برابر VL، مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط بین حساسیت به VL و پلی مورفیسم ژن *IL18* انجام پذیرفت. در مطالعه قبلی ما (۲۸) مشخص شد که حرکت ترجیحی (LD) بسیار قوی ($R^2=1$, $P<0.0001$) برای دو پلی مورفیسم در موقعیت -۶۵۶ و -۶۰۷ هم‌چنین برای سه پلی مورفیسم در موقعیت -۱۳۷، -۱۱۳ و ۱۲۷ ($R^2=1$, $P<0.0001$) وجود دارد. بنابراین، در مطالعه حاضر یک نقطه پلی مورفیک از هر گروه برای تجزیه و تحلیل انتخاب شد.

مطالعات قبلی نشان داده است که حضور نوکلئوتید G در موقعیت -۱۳۷ و A در موقعیت ۱۰۵ (کدون ۳/۳۵) (۲۷-۲۴) با افزایش تولید IL-18 همراه است، بنابراین ما پیش‌بینی می‌کردیم که فراوانی این آلل‌ها که با تولید بالاتر این سایتوکاین همراه است در گروه شاهد نسبت به بیماران VL بیشتر باشد. با این حال در نتیجه ما هیچ تفاوت معنی‌داری در به ارث بردن این آلل در میان دو گروه بیمار و شاهد

اهمیت بسزایی دارد (۱۸-۱۶). IL-18 یک سایتوکاین چندکاره است که می‌تواند هر دو بازوی سیستم ایمنی طبیعی و اکتسابی را تنظیم کند (۱۰-۷). شناخته شده‌ترین فعالیت بیولوژیک IL-18 تولید γ -IFN در حضور IL-12 است (۷). در واقع IL-18 و IL-12 به طور سینرژیسم در تولید γ -IFN توسط سلول‌های Th1، سلول‌های B و سلول‌های NK عمل می‌کنند (۱۹). با این حال تحت شرایط خاصی، IL-18 هم‌چنین می‌تواند پاسخ‌های Th2 را با تنظیم تولید سایتوکاین‌های IL-4، IL-13 و IL-10 کنترل نماید (۲۲-۲۰). IL-18 علاوه بر تأثیر بر تولید γ -IFN، با تحریک تولید سایتوکاین‌های IL-6، IL-1 β ، IL- α و TNF- α اثرات مستقیم پیش التهابی نیز دارد (۲۳).

با توجه به نقش کلیدی IL-18 در پاتوژنز بیماری لیشمانیوز، ژن این سایتوکاین می‌تواند کاندیدای مهم در تعیین نتیجه این بیماری باشد. مطالعات ژنتیکی اخیر نشان داده است که برخی از پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در ژن *IL18* انسان می‌تواند میزان رونویسی از این سایتوکاین را تحت تأثیر قرار دهد (۲۷-۲۴). با توجه به درگیری این

که مردم چینی حامل آلل C در موقعیت ۱۳۷- در برابر عفونت HBV محافظت می‌شوند (۲۹). قادری و همکارانش ارتباط پلی‌مورفیسم ژن *IL18* با استعداد ابتلا به سرطان معده و روده بزرگ در جمعیت ایرانی بررسی کردند ولی نتوانستند هیچ گونه تفاوت معنی‌داری بین افراد مبتلا به این سرطان‌ها و جمعیت طبیعی پیدا کنند (۳۰).

نتیجه‌گیری

در مجموع این مطالعه نشان داد که فراوانی آلل T در موقعیت ۶۵۶- و هاپلوتیپ ATG و هاپلوژنوتیپ AGG/ATG (موقعیت ۳/۳۵، ۶۵۶- و ۱۳۷-) به طور معنی‌داری در گروه شاهد بالاتر از گروه بیماران است. بر اساس اطلاعات ما، مطالعه پلی‌مورفیسم ژن *IL18* و VL در ایران و در کشورهای دیگر انجام نشده است، در نتیجه امکان مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با سایر مطالعات وجود نداشت، بنابراین به نظر می‌رسد که تحقیقات بیشتر در این زمینه در سایر جمعیت‌ها ضروری باشد.

References

1. Werneck GL, Batista MS, Gomes JR. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection*. 2003;31(3):174-177.
2. Chakraborty D, Banerjee S, Sen A. Leishmania donovani affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. *Journal of Immunology*. 2005;175(5):3214-3224.
3. Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology*. 2007;85(2):138-147.
4. Kharazmi A, Kemp K, Ismail A. T-cell response in human leishmaniasis. *Immunology Letters*. 1999;65(1-2):105-108.
5. Nakamura K, Okamura H, Wada M. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun*. 1989;57(2):590-595.
6. Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA. Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(5):2256-2261.
7. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1999;104(10):1393-1401.
8. Leung BP, Culshaw S, Gracie JA. A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol*. 2001;167(5):2879-2886.
9. Morel JC, Park CC, Woods JM. A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF kappa B and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J Biol Chem*. 2001;276(10):37069-37075.
10. Iannello D, Arena A, Buemi C. Differential induction of TNFalpha and IL-18 in human peripheral blood mono-

nuclear cells infected with Leishmania major or Leishmania donovani. *New Microbiol*. 2003;26(4):399-404.- 11. Mullen AB, Lawrence CE, McFarlane E. Endogenous interleukin-18 is involved in immunity to Leishmania donovani but its absence does not adversely influence the therapeutic activity of sodium stibogluconate. *Immunology*. 2006;119(3):348-354.
- 12. Moravej A, Rasouli M, Kalani M. IL-1 β (-511T/C) gene polymorphism not IL-1 β (+3953T/C) and LT- α (+252A/G) gene variants confers susceptibility to visceral leishmaniasis. *Mol Biol Rep*. 2012 39(6):6907-6914.
- 13. Kalani M, Rasouli M, Moravej A. Association of interleukin-15 single nucleotide polymorphisms with resistance to brucellosis among Iranian patients. *Tissue Antigens*. 2011;78(5):352-358.
- 14. Farshad S, Rasouli M, Jamshidzadeh A, Hosseinkhani A, Japoni A, Alborzi A & et al. IL-1 β (+3953 C/T) and IL-8 (-251 A/T) gene polymorphisms in H. pylori mediated gastric disorders. *Iran J Immunol*. 2010;7(2):96-108.
- 15. Rasouli M, Kiany S, Behbin M. Interleukin-10 gene polymorphisms and susceptibility to brucellosis in Iranian patients. *Iran J Immunol*. 2008;5(2):131-5.
- 16. Melby PC, Tabares A, Restrepo BI. Leishmania donovani. Evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol*. 2001;99(1):17-25.
- 17. Kaye PM, Svensson M, Ato M. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev*. 2004;201:239-253.
- 18. Lehmann J, Enssle KH, Lehmann I. The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4

مشاهده نشد. هم‌چنین بر خلاف انتظار، نتایج نشان داد که فراوانی آلل T در موقعیت ۶۵۶- و هاپلوتیپ ATG و هاپلوژنوتیپ AGG/ATG در گروه شاهد در مقایسه با بیماران مبتلا به VL بالاتر بود ($P=0.043$, $P=0.047$) و ($P=0.044$ ، به ترتیب)، بنابراین شاید بتوان نتیجه گرفت افرادی که این آلل، هاپلوتیپ و هاپلوژنوتیپ را به ارث می‌برند تولید IL-18 در آن‌ها بالاتر است و بنابراین در برابر VL مقاوم‌ترند. البته ما نتوانستیم مقاله‌ای پیدا کنیم که رابطه بین این آلل، هاپلوتیپ و هاپلوژنوتیپ و میزان بیان IL-18 را نشان دهد.

تحقیقات متعددی در رابطه با پلی‌مورفیسم ژن *IL18* و استعداد ابتلا به انواع بیماری‌های عفونی و غیر عفونی در میان جمعیت ایرانی و دیگر جمعیت‌ها وجود دارد، اما بر اساس اطلاعات ما، هیچ مطالعه‌ای بر روی پلی‌مورفیسم ژن *IL18* و استعداد ابتلا به VL در ایران و یا در کشورهای دیگر انجام نشده است. در مطالعه قبلی ما نشان داده شد که فراوانی آلل، ژنوتیپ، هاپلوتیپ و هاپلوژنوتیپ‌های ژن *IL18* که با تولید بیشتر IL-18 همراه است در گروه شاهد بیشتر از گروه بیماران است و مشخص شد که ممکن است از عوامل مؤثر در حفاظت در برابر عفونت بروسلا باشد (۲۵). در یک مقاله، ژانگ و همکارانش پیشنهاد کردند

nuclear cells infected with Leishmania major or Leishmania donovani. *New Microbiol*. 2003;26(4):399-404.

- 11. Mullen AB, Lawrence CE, McFarlane E. Endogenous interleukin-18 is involved in immunity to Leishmania donovani but its absence does not adversely influence the therapeutic activity of sodium stibogluconate. *Immunology*. 2006;119(3):348-354.
- 12. Moravej A, Rasouli M, Kalani M. IL-1 β (-511T/C) gene polymorphism not IL-1 β (+3953T/C) and LT- α (+252A/G) gene variants confers susceptibility to visceral leishmaniasis. *Mol Biol Rep*. 2012 39(6):6907-6914.
- 13. Kalani M, Rasouli M, Moravej A. Association of interleukin-15 single nucleotide polymorphisms with resistance to brucellosis among Iranian patients. *Tissue Antigens*. 2011;78(5):352-358.
- 14. Farshad S, Rasouli M, Jamshidzadeh A, Hosseinkhani A, Japoni A, Alborzi A & et al. IL-1 β (+3953 C/T) and IL-8 (-251 A/T) gene polymorphisms in H. pylori mediated gastric disorders. *Iran J Immunol*. 2010;7(2):96-108.
- 15. Rasouli M, Kiany S, Behbin M. Interleukin-10 gene polymorphisms and susceptibility to brucellosis in Iranian patients. *Iran J Immunol*. 2008;5(2):131-5.
- 16. Melby PC, Tabares A, Restrepo BI. Leishmania donovani. Evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol*. 2001;99(1):17-25.
- 17. Kaye PM, Svensson M, Ato M. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev*. 2004;201:239-253.
- 18. Lehmann J, Enssle KH, Lehmann I. The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4

- determines the resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mice. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20(1):63–77.
19. Yoshimoto T, Takeda H, Tanaka T. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol.* 1998;161(7):3400–3407.
20. Dinarello C, Fantuzzi G. Interleukin 18 and host defence. *J Infectious Dis.* 2003;187:370–384.
21. Helmby H, Grecis RK. IL-18 regulates intestinal mastocytosis and Th2 cytokine production independently of IFN-c during *Trichinella spiralis* infection. *J Immunol.* 2002;169(5):2553–2560.
22. Wei XQ, Leung BP, Arthur HM. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18. *J Immunol.* 2001;166(1):517–521.
23. Netea MG, Kullberg BJ, Verschueren I. Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. *Eur J Immunol.* 2000;30(10):3057–3060.
24. Folwaczny M, Glas J, Török HP. Polymorphisms of the interleukin-18 gene in periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2005;32(5):530–534
25. Giedraitis V, He B, Huang WX. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol.* 2001;112(1-2):146–152.
26. Liang XH, Cheung W, Heng CK. Reduced transcriptional activity in individuals with IL-18 gene variants detected from functional but not association study. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(2):736–741
27. Arimitsu J, Hirano T, Higa S, Kawai M, Naka T, Ogata A. IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342(4):1413–1416.
28. Rasouli M, Kalani M, Moravej A, Kiany S. Interleukin-18 single nucleotide polymorphisms contribute to the susceptibility to brucellosis in Iranian patients. *Cytokine.* 2011;54(3):272–276.
29. Zhang PA, Wu JM, Li Y, Yang XS. Association of polymorphisms of interleukin-18 gene promoter region with chronic hepatitis B in Chinese Han population. *World J Gastroenterol.* 2005;11(11):1594–1598.
30. Haghshenas MR, Hosseini SV, Mahmoudi M, Saberi-Firozi M, Farjadian S, Ghaderi A. IL-18 serum level and IL-18 promoter gene polymorphism in Iranian patients with gastrointestinal cancers. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(6):1119–1122.
31. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Tonenchi L, Paschos E, Bauer B. Polymorphisms of the interleukin-18 gene in periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2005;32(5):530–534
32. Leung WK, Chan MC, To KF, Man EP, Ng EK, Chu ES. *H. pylori* genotypes and cytokine gene polymorphisms influence the development of gastric intestinal metaplasia in a Chinese population. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(4):714–720.



Original Article

Association of IL18 Gene Polymorphisms (positions -656 G/T, -137 G/C and +105A/C) with Kala-Azar

Mansoori Y¹, Moravej A², Najafipour S², Kouhpayeh SA³, Meshkibaf MH¹, Abdollahi A², Rasouli M^{4*}
Allahverdi Gh¹

1- Department of Biochemistry, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Fars, Iran.

2- Department of Microbiology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Fars, Iran.

3- Department of Pharmacology, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Fars, Iran.

4- Department of Immunology, Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz, Fars, Iran.

Abstract

Background & Objective: Host resistance to *Leishmania* infection is mediated by cellular immune responses leading to macrophage activation and parasite killing. IL-18 known as interferon- γ inducing factor, stimulate IFN- γ production by T-cells. According to the important role of IL-18 in defense against VL and known effect of IL-18 gene polymorphisms on its production, the aim of this study was to investigate the probable relation between IL-18 gene polymorphisms and susceptibility to VL in Iranian patients.

Materials & Methods: The study groups included 118 pediatric patients suffered from VL and 156 non-relative healthy persons from the same endemic area as the patients. In both study groups IL-18 gene polymorphisms at positions -656 G/T, -137 G/C and +105A/C (codon 35/3) were analyzed by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism).

Results: The result showed that the frequency of T allele at position -656 was significantly higher in the controls compared to that in the patients ($P=0.047$). But in none of the genotypes of IL-18 there was significant difference between patients and controls. In addition, the distribution of ATG haplotype and AGG/ATG haplo-genotype were significantly higher in the controls compared to that in patients with VL ($P=0.043$ and $P=0.044$, respectively). Furthermore a strong LDs ($P<0.001$) were detected between the -607, -137 and codon 35/3 SNPs.

Conclusion: In conclusion, this study showed that the frequency of T allele at position -656 and ATG haplotype and AGG/ATG haplogenotype (positions +105, -656 and -137) were significantly higher in the controls. To the best of our knowledge no study has been conducted on IL-18 gene polymorphisms and VL in other countries, therefore, we were not able to compare our results with other investigations, so it seems that more researches in this field on other populations will be worthy.

Keywords: IL-18, Genetic polymorphisms, Visceral leishmaniasis, Iran

* **Corresponding author:** Rasouli Manoochehr, Department of Immunology, Professor Alborzi Clinical Microbiology Research Center, Shiraz, Fars, Iran.

Tel: +98 711 6474304

Email: rasouliman@yahoo.com