مقاله پژوهشی

بررسی اثر تنوع ژن‌های ایمنی IL-18 و IFN-γ برشدت بیماری مالاریا و کیفیت درمان

غلامرضا عامری[۱و۲]، کیانوش ملک زاده[۱*]، زهرا نور محمدی[۲]، محمد شکاری[۱]، حبیب اله ترکی[۱]، هانیه سلیمانی[۱]

۱- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۲- دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۶/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: در مالاریای انسانی، ژنوتیپ سایتوکاین‌ها در پروسه دفاع سیستم ایمنی نقش دارند. در این مطالعه ارتباط بین ژنوتیپ IL-18-137G/C و IL-18+874A/T در IFN-γ بر شدت بیماری مالاریا و نیز کیفیت درمان - به عنوان فاکتورهای موثر در ایجاد افراد بدون علامت در مناطق اندمیک- بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ۱۰۰ نفر بیمار و ۱۰۲ نفر سالم با روش Nested –PCR و گسترش ضخیم مورد ارزیابی قرار گرفتند. ژنوتیپ افراد برای IL-18(G-137C) با روش Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction و برای IFN-γ(A+874T) با ARMS-PCR تعیین گردید و نتایج مورد آنالیز آماری قرار گرفتند.

نتایج: در این تحقیق، مشاهده گردید که آلل T در ژن IFN-γ و آلل C در ژن IL-18 اثر محافظت کننده‌ای را القاء می‌نمایند. همچنین مشاهده گردید که آنمی ناشی از مالاریا، ملایم‌تر و تعداد پارازیت در میکرو لیتر خون به طور معنی داری کاهش یافته بود ($p<0.0001$). این موضوع در پاسخ بیمار به درمان نیز دیده شد به طوری که پارازیت در خون دارندگان ژنوتیپ IFN-γTT و IL-18CC در پایان روز دوم درمان دیده نشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق، تئوری تاثیر ژنوتیپ سیستم ایمنی بر کیفیت درمان و امکان ایجاد افراد بدون علامت و ذخیره انگلی به عنوان فاکتور موثر در اندمیک شدن مالاریا را مطرح می‌کند. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد که ایمنوژنوتیپ افراد یک منطقه نیز می‌تواند به عنوان عامل مهمی در استراتژی‌هایی که به منظور کنترل بیماری مالاریا در مناطق اندمیک لحاظ می‌گردد، در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: مالاریا، IL-18، IFN-γ، ژنوتیپ و ذخیره انگلی

مقدمه

مالاریای انسانی مهم‌ترین بیماری انگلی خونی است که بیش از ۴۰٪ جمعیت جهان را تهدید می‌کند، در حدود ۱۰۰ کشور جهان که عمدتاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌باشند بیماری مالاریا مشاهده شده و تخمین زده می‌شود که حدود ۲/۵ میلیارد نفر در معرض خطر باشند. میزان ابتلاء سالانه به مالاریا حدود ۵۰۰ - ۳۰۰ میلیون و مرگ و میری حدود ۳- ۱/۷ میلیون نفر دارد. مالاریا هزینه اقتصادی زیادی بر جوامع تحمیل می‌کند و رشد اقتصادی سالانه اغلب کشورهای درگیر را کاهش می‌دهد (۳-۱). فاکتورهای ژنتیکی میزبان نقش تعیین کننده‌ای در حساسیت ایمنی تعدادی از بیماری‌ها از قبیل مالاریا دارد (۶-۴). پاسخ‌های ایمنی نیز می‌توانند در شدت بیماری موثر باشند، سیتوکین‌های پیش التهابی از قبیل اینترفرون گاما (IFN-γ) می‌توانند نقش محافظتی داشته باشند (۷). اینترلوکین-۱۸(IL-18) یک سیتوکین ۱۸/۳ کیلو دالتونی است و طیف وسیعی از عملکردهای تنظیم ایمنی، القاء بیان ژن و سنتز عامل نکروز کننده

* **نویسنده مسئول: کیانوش ملک زاده**، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران. تلفن: ۰۹۱۷۶۱۰۸۳۹۶
Email: keyanoosh@gmail.com

تومور آلفا (TNF-α)،IFN-γ و IL-1 بوسیله ماکروفاژها، القاء سیتوتوکسیسیتی سلول NK و افزایش تمایز Th1را دارد (۸). در حقیقت IL-12 به IL-18 برای تولیدIFN-γ نیازمند است، که گیرنده IL-18 بوسیله IL- 12 تنظیم می‌گردد (۹). ژن IL-18 در کروموزوم 11q22.2-q22.3 واقع و از شش اگزون و پنج اینترون تشکیل شده است. سه SNPs شامل 656G/T- و 607C/A- و - 137G/C در پروموتور اولین اگزون ژن قرار دارد (۱۳-۱۰). IL-18 در ابتدا با عنوان عامل تحریک کننده IFN-γ و به عنوان یک سیتوکین پیش التهابی که در تنظیم پاسخ‌های هر دو ایمنی ذاتی و اختصاصی نقش دارد شناخته می‌شد که در تنظیم تعادل پاسخ ایمنی (Th1/Th2) تاثیر می‌گذارد (۱۴). به نظر می‌رسد متعاقب پاسخ ایمنی سلولی، ترشح IL-12 و IL-18 برای دفاع در برابر مالاریا از منوسیت‌ها/ماکروفاژها، سلول‌های B و دیگر انواع سلول‌ها نشان دهنده یک پیش آگهی با اهمیت در عفونت مالاریا است. IL-18 به تنهایی تولید غلظت کمی از IFN-γ را به واسطه سلول‌های T تحریک می‌کند (۱۵). دو SNPs پروموتور ژن IL-18 در موقعیت 607- و 137- به علت تفاوت‌ها در مکان اتصال[1] فاکتورهای نسخه برداری پیشنهاد شده و روی فعالیت ژن IL-18 و همچنین پتانسیل بالقوه IFN-γ موثر هستند (۱۶). تغییر در موقعیت 137- از G به C باعث تغییر فاکتور مکان اتصال هسته‌ای H4TF-1 می‌گردد (۱۷).

IFN-γ از اینترفرون‌های نوع II و از سیتوکین‌های اصلی فعال کننده ماکروفاژ می‌باشد که مهم‌ترین نقش آن در ایمنی ذاتی و به ویژه ایمنی سلولی است (۱۸، ۱۹). ژن IFN-γ به طور معمول به صورت تک نسخه و در کروموزوم 12q24.12. واقع شده است. دو SNPs مهم در اولین اینترون آن شناخته شده است (۱۳). پلی مورفیسم 874 A/T+ در انتهای ´5 منطقه تکرار میکروساتلیت CA قرار دارد (۱۳). عملکردهای IFN-γ در ایمنی سلولی در مقابل میکروب‌های درون سلولی مهم هستند. IFN-γ عملکرد میکروب کشی ماکروفاژها را بواسطه تحریک سنتز اکسیژن واکنش گر و نیتریک اکسید، افزایش می‌دهد (۲۰). پلی مورفیسم‌های ناحیه پروموتری ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی در شدت بیماری مالاریا همانند سایر بیماری‌های عفونی و التهابی تاثیر می‌گذارد (۲۱ و ۲۲).

در این تحقیق سعی گردید که ارتباط بین ژنوتیپ‌های- 137G/C در ژن IL-18 و 874A/T+ در ژن IFN-γ و تاثیر آن بر رشد و توسعه پارازیت، شدت بیماری مالاریا، عوارض بیماری چون کم خونی و نیز تاثیر آن بر کیفیت درمان و پاسخ مناسب به مالاریا مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین تلاش گردید که به این سئوال جواب داده شود که آیا ژنتیک سیستم ایمنی افراد می‌تواند در ایجاد افراد asymptomatic به عنوان جمعیت مخزن برای انگل در یک منطقه اندمیک چون استان هرمزگان تاثیر داشته باشد؟

Kojima و همکاران (۲۰۰۴) با توجه به یک بررسی انجام شده معتقد بودند که IL-18 نقش کلیدی در بیماری مالاریای شدید از طریق افزایش IFN-γ بازی می‌کند (۲۳). Medina و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی بیان کردند که افزایش سطح IL- 10 و IFN-γ در مالاریا پلاسمودیوم ویواکس یک تنظیم دو طرفه است که به واسطه پلی مورفیسم پروموتر IL-10 تغییر نکرده است (۲۴). ولیکن بر اساس جستجوهای انجام شده تاکنون تحقیق مشابهی که تعداد انگل را به عنوان ملاکی از رشد و توسعه پارازیت و نیز میزان هموگلوبین را به عنوان معیاری از شدت بیماری با ژنوتیپ میزبان مورد مطالعه قرار داده باشند، یافت نگردید و به نظر می‌رسد که این تحقیق در نوع خود برای اولین بار انجام پذیرفته شده باشد.

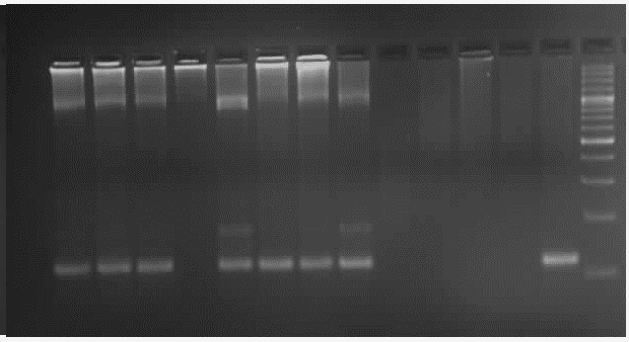
مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه و استخراج DNA: نمونه برداری بعد از اخذ رضایت کتبی و از ۱۰۰ نفر بیمار مبتلا به مالاریا و ۱۰۲ نفر غیر بیمار به عنوان کنترل که از منطقه شرق استان هرمزگان بشاگرد و میناب و از نظر سن، جنسیت و نژاد دارای شرایط مشابه بودند، انجام شد. میزان ۳ میلی لیتر خون در لوله‌های حاوی EDTA(0.5M - pH=7.8 –8.0) تهیه و برای استخراج DNA از روش استاندارد نمک اشباع[2](۲۵) استفاده گردید و نمونه‌های DNA تا زمان آنالیز در فریزر 20°C- نگه داری شد. مشخصات بیوگرافی نمونه‌ها نیز در جدول ۱ عنوان گردیده است.

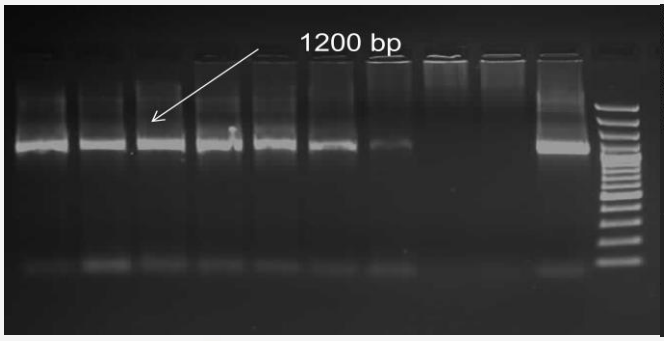
[1]Binding Site
[2]Salting out

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده برای Nested, ARMS & SSP-PCR

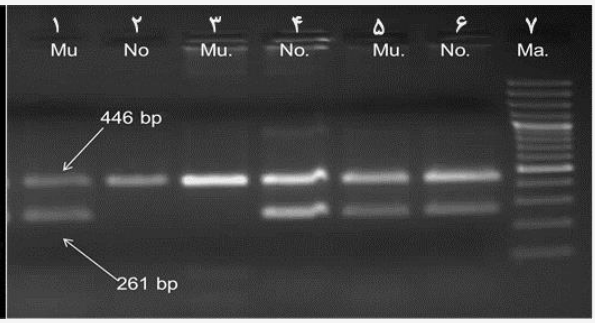
	Name	Primer 5'→3'
1	rPLU5	CTT GTT GTT GCCTTA AAC TTC
2	rPLU6	TAA AAA TTG TTG CAG TTA CG
3	rV1V1	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAA TGA TAC
4	rV1V2	ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA
5	rFAL1	TTA ACC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT
6	rFAL2	ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC
7	Generic	TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA
8	Primer (A)	TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA
9	Primer (T)	TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT
10	Internal F	GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA
11	Internal R	TCA CGG ATT TCT GTT GTG TT TC
12	Reverse primer	AGGAGGGCAAAATGCACTGG
13	F (G)	CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAG
14	F (C)	CCCCAACTTTTACGGAAGAAAA
15	Common Forward	CCAATAGGACTGATTATTCCGCA



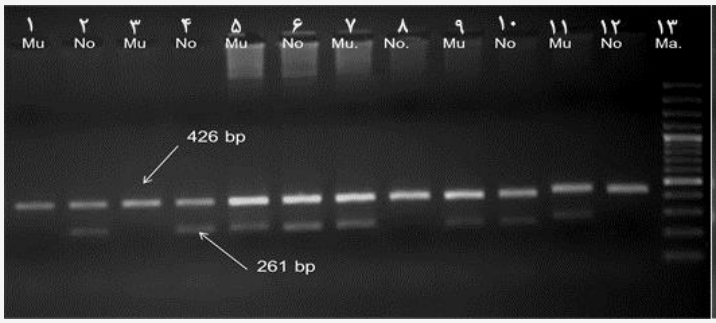
شکل ۱: نمونه محصول Nested-PCR ژن 18S rDNA مالاریائی



شکل ۲: نمونه محصول Nested-PCR مرحله دوم پلاسمودیوم ویواکس.



شکل ۳: نمونه محصول SSP-PCR ژن IL-18
Ma: مارکر100bp —Mu: پرایمر موتانت - No.: پرایمر نرمال
چاهک‌های ۱ و ۲: هموزیگوت موتانت IL-18GG
چاهک‌های ۳ و ۴: هموزیگوت آلل وحشی IL-18CC
چاهک‌های ۵ و۶: هتروزیگوت IL-18GC چاهک ۷: مارکر



شکل ۴: نمونه محصول ARMS-PCR ژن IFN–γ
Ma:مارکر 100bp— Mu: پرایمر موتانت - No.: پرایمر نرمال
چاهک‌های ۱ و ۲ و نیز ۳ و ۴: هموزیگوت آلل وحشی IFN–γ TT
چاهک‌های ۵ و ۶ و نیز ۹ و ۱۰: هتروزیگوت IFN–γ AT
چاهک‌های ۷ و ۸ و نیز ۱۱ و ۱۲: هموزیگوت آلل موتانت IFN–γ AAچاهک۱۳: مارکر

تعیین نوع و شمارش تعداد پارازیت: روش گسترش ضخیم چه قبل از درمان و چه در ابتدای روز سوم درمان (قبل از شروع مصرف دارو در روز سوم) برای تعیین تعداد پارازیت و نیز اثبات وجود پارازیت به کار برده شد، علاوه بر روش میکروسکوپی با روش Nested–PCR نیز وجود انگل (با استفاده از پرایمرهای ۱ و ۲، جدول ۲) و نوع پلاسمودیوم (پرایمرهای ۳ و ۴ برای ویواکس و پرایمرهای ۵ و ۶ برای فالسیپاروم، جدول ۱) تعیین گردید.

تعیین ژنوتیپ: ژنوتیپ IFN-γ (+874A/T) افراد بیمار و کنترل با روش ARMS-PCR مشخص گردید. هر واکنش PCR با حجم 25 µl شامل 2.5 µl 10X PCR Buffer (50 mM Tris-HCl; pH 8.3)، 1.5µl $MgCl_2$ 3.0 mM، 0.5 µl از پرایمرهای اختصاصی (ردیف‌های ۷ الی ۱۱ جدول ۱) 10 pmol/µl، 0.4µl dNTP mM0.20، 0.4µl Taq 4unit (همگی تهیه شده ازشرکت ژن فن آوران - ایران)، 1µl DNA ژنومی 100ηg/µl

جدول۲: تعریف متغیرها در افراد بیمار و شاهد

Variables	Patient (n=۱۰۰)	Control (n=۱۰۲)	P
Mean Age (±SD) (Min-Max)	۳۷/۴ (± ۱/۵۱) (۸-۶۶)	۳۴/۴ (±۱/۴۲) (۸-۷۲)	۰/۱۵۰
Age ≤۳۵	۴۷ (%۴۷/۰)	۶۰ (%۵۸/۸)	
Age >۳۵	۵۳ (%۵۳/۰)	۴۲ (%۴۱/۲)	
Gender			۰/۱۷۴
Male	۸۱ (%۸۱/۰)	۷۶ (%۷۴/۵)	
Female	۱۹ (%۱۹/۰)	۲۶ (%۲۵/۵)	
Kind of Malaria			
Free of Malaria	۰	۱۰۰ (%۹۸/۰)	
Vivax	۹۶ (%۹۶/۰)	۲ (%۲/۰)	
Falsiparum	۴ (%۴/۰)	۰	
Stage			
Free of Malaria	۰	۱۰۰ (%۹۸/۰)	
Symptomatic	۱۰۰(%۱۰۰)	۰	
Asymptomatic	۰	۲ (%۲,۰)	
Mean No. of Parasite/ul (±SD) (Min-Max)	۹۷۹۷/۳ (±۲۲۰/۳) (۴۵۶۰ – ۱۴۸۰۰)		
Parasitemia status (before treat)			
Group<%۰/۲ (<۹۰۰۰ parasite)	۲۹ (%۲۹/۰)	۰	
Group≥۰/۲% (≥۹۰۰۰ parasite)	۷۱ (%۷۱/۰)	۰	
Mean No. of remain parasite/ul (±SD) (Min-Max)	۵۳۰ (±۶۲/۸) (۱۶۰–۸۹۶)		
Parasitemia status (in 3rd days of treatment)			
Free of parasite	۸۴ (%۸۴/۰)	۰	
Remain parasite	۱۶ (%۱۶/۰)	۰	
Mean Hb (g/dL)(±SD) (Min-Max)	۷/۰۷ (±۰/۸۴) (۵/۸-۱۱/۵)	۱۲/۳۴ (±۱/۳) (۸/۰-۱۵/۲)	۰/۰۰۰۱
Hb status			
normal (≥۱۲/۰ g/dL)	۰	۶۷ (%۶۵/۷)	
anemia (۸/۰ ≤ Hb <۱۲/۰)	۱۲ (%۱۲/۰)	۳۵ (%۳۴/۳)	
sever anemia (<۸/۰ g/dL)	۸۸ (%۸۸/۰)	۰	

وDDW µl18.2 بود. برنامه دستگاه ترموسایکلر (Biorad آمریکا) عبارت از 94°C (4 دقیقه)، و سپس 10سیکل(20s)94^0C، (40s)68^0C و سپس (40s)72^0C و پس از آن 20 سیکل(40s)94^0C، 60^0C، (50s)72^0C و نهایتاً (5min)72^0C بود که قطعه‌های 426bp مربوط به اینترنال کنترل و 261bp مربوط به محصول نرمال یا جهش یافته بود. ژنوتیپ IL-18(G-137C) افراد بیمار و سالم با روش SSP-PCR (Sequence Specific Primers – Polymerase Chain Reaction) تعیین گردید (ردیف‌های ۱۵-۱۲ جدول ۲). شرایط دمایی و چرخه‌ها نیز عبارت از 95°C (5 دقیقه)، 95°C (30S)، 65°C(45S)، 72°C(45S) و 72°C(5 دقیقه) به تعداد 30 سیکل بود که قطعه‌های 446bp مربوط به اینترنال کنترل و 261bp مربوط به محصول نرمال یا جهش یافته بود. محصول PCR روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد و توسط اتیدیوم بروماید (ژن فن آوران، ایران) رنگ آمیزی گردید و ژل‌ها توسط UV transilluminator بررسی و از محصول توسط دوربین عکس تهیه شد (تصاویر ۱ الی ۴).

تعیین میزان کم خونی: میزان هموگلوبین قبل از شروع درمان، به عنوان ملاکی از شدت بیماری با آزمایش CBC بیمار تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: با روش‌های آماری $\chi 2$ و Fisher exact test در برنامه آماری SPSS و Epi Info وExcel آزمون‌های T-Student و One way Regression مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

نتایج

در این تحقیق که به صورت مورد شاهدی[3] انجام شد، علاوه بر تعیین گونه‌های پلاسمودیوم، فراوانی آلل‌ها، رابطه سن، جنس، میزان انگل، میزان رشد و نمو انگل، باقی مانده انگل و میزان هموگلوبین با ژنوتیپ‌های جمعیت بیمار و شاهد در موقعیت‌های G-137C ژن IL-18 و T+874A ژن IFN-γ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. فراوانی آلل‌های A وT ژن IFN-γ (+874) در افراد بیمار و کنترل به ترتیب 72.5 و 27.5 و 56.5 و 45.5 درصد و در فراوانی ژنوتیپ (+874) تفاوت معنی داری بین بیمار و کنترل وجود دارد (P< 0.0001). فراوانی آلل‌های G و C در ژن IL-18(-137) افراد بیمار و کنترل به ترتیب 61 و 39 و 66.5 و 33.5 درصد و بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ GC در بیمار و کنترل به ترتیب 62 و 54 درصد بود، در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت معنی داری بین افراد بیماری که حامل حداقل یک آلل C (CC+GC) در مقایسه با ژنوتیپ مرجع (GG) باشد، دیده نشد (P=0.2276) در حالی‌که حاملین حداقل یک آلل A(AT+AA) در موقعیت +874 ژن IFN-γ در مقایسه با افراد با ژنوتیپ TT و نیز جمعیت شاهد، حدود 4 برابر به حضور انگل مالاریا حساس‌تر بودند (OR=4.08; 95%CI=2.04-4.18). مردان بیمار حامل حداقل یک آلل C در موقعیت 137- سایتوکاین IL-18 در مقایسه با جمعیت زنان و با ژنوتیپ GG به بیماری مالاریا حساس تر نبودند (OR=0.91 ; 95%CI= 0.75- 1.09) چنین وضعیتی در خصوص آلل A در موقعیت +874 سایتوکاین IFN-γ در مقایسه با جمعیت زنان مشاهده گردید (OR=1.14 ; 95%CI= 0.71- 1.85).

به منظور بررسی رابطه بین ایمینوژنوتیپ افراد و رشد و نمو انگل به عنوان شاخصی از شدت بیماری، بر اساس میانگین تعداد پارازیت شمارش شده در واحد میکرولیتر خون، بیماران بر اساس میانگین تعداد انگل در میکرولیتر خون به دو گروه تقسیم شدند (جدول ۳). تفاوت معنی داری با اثر بازدارنده در خصوص ژنوتیپ IL-18CC نسبت به ژنوتیپ GG آن بین بیماران با تعداد شمارش شده ۹۰۰۰ پارازیت در میکرو لیتر خون نسبت به بیماران که میانگین تعداد پارازیت آنان در میکرو لیتر خون کمتر از ۹۰۰۰ بود، مشاهده گردید (p<0.0001; OR=0.15; 95%CI= 0.02-0.96) که دال بر اثر محافظتی ژنوتیپ CC در مقایسه با ژنوتیپ GG در موقعیت 137- ژن IL-18 در مقابل توسعه بیماری مالاریا داشت، در حالی‌که حاملین ژنوتیپ GG، حساسیت ۶/۶ برابری نسبت به ژنوتیپ CC از لحاظ توسعه و رشد انگل در بدن را نشان می‌دادند. همچنین مشاهده گردید که حاملین حداقل یک آلل A (مجموع ژنوتیپ‌های AA+AT)، 5 برابر حساسیت بیشتری در برابر رشد و توسعه انگل مالاریا نشان می‌دادند (p<0.0030; OR=5.33; 95%CI=1.7-32.93) و بالعکس دارندگان ژنوتیپ IFN-γ+874TT مقاومت واضحی را در خصوص رشد انگل مالاریا نشان می‌دادند (OR=0.19; 95%CI=0.03- 1.06).

[3]Case-control

جدول۳: بررسی میزان انگل بر اساس ژنوتیپ‌های متفاوت IL-18(G-137C) و IFN-γ (T+874A)

Patient	Group > %۰/۲ (>۹۰۰۰ parasite / ul) n=(%)۷۲	Group ≤%۰/۲ (≤۹۰۰۰ parasite / ul) n= (%)۲۸	OR (۹۵% CI)	p
IL-18 Genotype				
GG	۱۹ (%۲۶/۴)	۴ (%۱۴/۳)	۱/۰ (Ref.)	
GC	۵۲(%۷۲/۲)	۱۷ (%۶۰/۷)	۰/۹۱ (۰/۷۲- ۱/۱۵)	۰/۴۷۵۷
CC	۱ (%۱/۴)	۷ (%۲۵/۰)	۰/۱۵ (۰/۰۲- ۰/۹۶)	۰/۰۰۰۰
GC+CC	۵۳ (%۷۳/۶)	۲۴ (%۸۵/۷)	۰/۸۳ (۰/۶۶- ۱/۰۶)	۰/۱۹۸۸
GG in compare to CC			۶/۶۱ (۱/۰۵- ۴۱/۷۴)	۰/۰۰۰۰
IFN-ϒ Genotype				
TT	۱ (%۱/۴)	۶ (%۲۱/۴)	۱/۰ (Ref.)	
AT	۳۶ (%۵۰/۰)	۱۱ (%۳۹/۳)	۵/۳۶ (۰/۸۷- ۳۳/۱۴)	۰/۰۰۲۶
AA	۳۵ (%۴۸/۶)	۱۱ (%۳۹/۳)	۵/۳۳ (۰/۸۶- ۳۲/۹۳)	۰/۰۰۳۰
AA+AT	۷۱ (%۹۸/۶)	۲۲ (%۷۸/۶)	۵/۳۴ (۰/۸۷- ۳۲/۹۲)	۰/۰۰۱۷
TT in compare to AA+AT			۰/۱۹ (۰/۰۳- ۱/۱۶)	۰/۰۰۳۰

جدول ۴: بررسی مقایسه‌ای دو گروه با کم خونی و کم خونی شدید از بیماران مالاریائی با ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

Patient	severe anemia (<۸/۰ g/dL) n=(%)۱۲	anemia (۸/۰ ≤ Hg <۱۲/۰) n=(%)۸۸	OR (۹۵% CI)	p
IL-18 Genotype				
GG	۲۱ (%۲۳/۹)	۲ (%۱۶/۷)	۱,۰ (Ref.)	
GC	۶۵ (%۷۳/۹)	۴ (%۳۳/۳)	۰/۹۳ (۰/۸۳- ۱/۰۵)	۰/۴۳۴۸
CC	۲ (%۲/۳)	۶ (%۵۰/۰)	۰/۲۷ (۰/۰۸- ۰/۹۲)	۰/۰۰۰۹
GC+CC	۶۷ (%۷۶/۲)	۱۰ (%۸۳/۳)	۰/۹۵(۰/۸۲-۱/۱۱)	۰/۷۲۸۰
GG in compare to CC			۳/۶۵ (۱/۰۹- ۱۲/۲۱)	۰/۰۰۰۹
IFN-ϒ Genotype				
TT	۲ (%۲/۳)	۵ (%۴۱/۷)	۱/۰ (Ref.)	
AT	۴۲ (%۴۷/۷)	۵ (%۴۱/۷)	۳/۱۳ (۰/۹۷- ۱۰/۱۳)	۰/۰۰۱۳
AA	۴۴ (%۵۰/۰)	۲ (%۱۶/۷)	۳/۳۵ (۱/۰۴- ۱۰/۸۲)	۰/۰۰۰۱
AA+AT	۸۶ (%۹۷/۷)	۷ (%۵۸/۴)	۳/۲۴ (۱/۰۰- ۱۰/۴۶)	۰/۰۰۰۱
TT in compare to AA			۰/۳۱ (۰/۱۰-۱/۰۰)	۰/۰۰۰۱

به منظور اثر ژنوتیپ سیتوکین‌ها برکیفیت درمان، شمارش انگلی نیز دوباره در ابتدای روز سوم درمان انجام پذیرفت. مشاهده گردید در اکثر حاملین بیمار حداقل یک آلل C (CC+GC) اثری از پارازیت در خون آن‌ها دیده نشده (۶۹ نفر بدون پارازیت در مقابل ۸ نفر دارای پارازیت) در مقایسه با ژنوتیپ GG (۱۵ نفر بدون پارازیت در مقابل ۸ نفر دارای پارازیت) تفاوت معنی داری با اثر بازدارندگی در برابر بقای انگل مشاهده گردید (P=0.0093;OR=0.22 ; 95%CI=0.06-0.77) که البته افراد بیمار با ژنوتیپ IL-18CC همگی از پارازیت پاک گردیده بودند. همچنین مشاهده گردید که پارازیت در خون ۱۳ نفر از بیماران با ژنوتیپ (IFN-γ+874AA) در ابتدای روز سوم درمان، مشاهده گردید در حالی‌که ۳۳ نفر از بیماران بدون انگل تشخیص داده

شدند. پارازیت در هیچ یک از بیماران با ژنوتیپ IFN-γTT دیده نشد و چون آلل T، آلل وحشی و ژنوتیپ TT به عنوان ژنوتیپ مرجع محسوب می‌گردید، به همین علت OR قابل محاسبه نبود. مشاهد گردید که بیماران با ژنوتیپ GG درمقایسه با بیماران با ژنوتیپ CC با حدود 3.5 برابر بیشتر امکان قرار گرفتن در گروه کم خونی شدید را داشتند (95%CI=1.09-12.21(P=0.0009 OR=3.65;. همچنین حاملین آلل A در ژنوتیپ IFN-γ (AA+AT) در مقایسه با افراد با ژنوتیپ TT، حدود 3 برابر شانس بیشتر برای ابتلا به کم خونی شدید ناشی از مالاریا ((Hgb<8.0g/dl داشتند(OR=3.24; 95%CI=1.00- 10.46) (جدول۴).

بحث و نتیجه گیری

مالاریا بیماری پیچیده‌ای است که عوامل متعدد محیطی و نیز عواملی چون سن میزبان، ساختار ژنتیکی انگل، وضعیت ایمنی و زمینه ژنتیکی میزبان بر شدت و توسعه بیماری آن موثر است (۲۶). پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اختصاصی نیز مکانیسم‌هایی هستند که می‌توانند به طور موثر یک عامل محدود کننده جهت جلوگیری از رسیدن انگل‌ها به حداکثر خود باشد و از شدت بیماری و همچنین تعداد سلول‌های عفونی در جریان خون بکاهد هر چند که عدم موفقیت در حذف کامل عفونت منجر به درجه پایین تحمل ۴ به دلیل حضور مکرر انگل درمدت زمان زیاد (در حد ماه یا سال) می‌گردد (۲۷). سیتوکین‌ها ملکول‌های مهم تنظیم کننده سیستم ایمنی در پاسخ ایمنی بر علیه میکروارگانیسم‌های پاتوژنیک هستند. ژن‌های سیتوکین‌ها شدیداً پلی مورفیک و متغیر هستند که بر بیان آن‌ها موثر بوده که نهایتاً منجر به علائم متنوعی چون پتانسیل ابتلا به تعدادی از بیماری‌های مزمن، افزایش نرخ عفونت و نیز دامنه‌ای از علایم و عوارض ناشی از بیماری‌های حاد را باعث می‌شود (۲۸، ۲۹). بدیهی است مطالعه واریانت‌های ژنی که حساسیت به انگل مالاریا را تشدید می‌کنند، برای درک بهتر از این بیماری و نیز امکان asymptomatic شدن انگل که از شروط و فاکتورهای اساسی در اندمیک شدن آن است، مهم می‌باشند. سئوالی که در این تحقیق مطرح شده این است که چه ژن یا مسیرهای ژن، حساسیت به مالاریا را تشدید می‌نمایند و یا بر شدت بیماری، تظاهرات آن و یا حتی بر کیفیت درمان موثر است؟ با چنین رویکردی، تمرکز خاصی بر روی ژن‌های پاسخ ایمنی ذاتی در افراد مبتلا به انگل صورت گرفت. با توجه به این که پلی مورفیسم در پروموتور ژن‌های IL-18 و IFN-γ به عنوان دو سایتوکاین کلیدی در حساسیت فرد نسبت به بیماری نقش دارد، در این تحقیق سعی گردید که اثر ژنوتیپ‌های IL-18 (-137G/C) و نیز IFN-γ(+874A/T) در رشد و توسعه پارازیت پلاسمودیوم و نیز شدت عوارض بیماری مالاریا همانند کم خونی و نیز اثر آنان برکیفیت درمان و در نتیجه به عنوان فاکتورهایی موثر درامکان ایجاد مخزن انگلی در جمعیت استان هرمزگان مورد بررسی قرار گیرد. تاکنون مطالعات محدودی در این زمینه صورت گرفته که بیشتر در مدل‌های حیوانی بوده است. مالاریا با مدل‌های موشی نشان داده که نتیجه جایگزینی تک نوکلئوتید با کاهش تولید IL-18 همراه است که پتانسیل محافظت در مقابل مالاریای شدید را دارد. یک سری مطالعات نشان داده‌اند که موقعیت 137– ممکن است تولید IL-18 در هپاتوسیت‌های کبد را به طور متفاوت تنظیم کند (۳۰، ۳۱). حضورIL-18 در سلول‌های کبد و نقش IL-18 در سلول‌های کبدی آسیب دیده پیشنهاد می‌کند که موقعیت 137– بطور بالقوه می‌تواند در مرحله قبل گلبول قرمزی (کبدی) مهم باشد (۳۲). این مطالعه نشان داد که پلی مورفیسم و ترکیبی از ژنوتیپ‌های مختلف در حذف انگل در بیماران مالاریای پلاسمودیوم فالسیپاروم اثری متفاوت نداشتند (۳۳). همین طور در یک مطالعه دیگر نشان داده شد که IL-18 مسئول القاء پاسخ‌های Th1 نیست ولی در مقاومت میزبان به وسیله تحریک سلول‌های Th1 در تولید IFN-γ نقش دارد (۳۴). همچنین مشخص شد که سطح IFN-γ در زنان بارداری که مبتلا به مالاریا نبودند در مقایسه با کسانی که به مالاریا مبتلا بودند بیشتر بود (۳۵). این مشاهدات دلیلی بر امکان نقش ضد انگلی NO و سیتوکین‌های نوع TR1 همانند IFN–γ و TNF-α در انسان را نشان می‌دهند که در ایجاد علائم بیماری دخیل هستند. از سوی دیگر، سیتوکین‌های نوع 2 چون IL-10 وIL-4 با حفاظت در برابر کم خونی مالاریایی ارتباط دارند (۳۶، ۳۷). کاهش ترشح IFN-γ توسط سلول‌های ایمنی T

[4] tolerance

در پاسخ به مالاریا نیز گواه بر این موضوع بود و همچنین مشاهده گردید که کاهش پاتولوژیکی پارازیت در افراد ایمن، می‌تواند به کاهش بیان (down-regulation) سیتوکین‌های TR1 بیانجامد (۳۸،۲۰). مشابهت نسبی با فراوانی‌های ژنوتیپ‌های بررسی شده در این مطالعه در پلی مورفیسم 874+ در ژن IFN-γ با یک مطالعه مربوط به مالاریا (۳۵) و نیز مطالعات مربوط به بیماری‌های عفونی همانند لیشمانیوز[5] (۳۹) و توبرکلوزیس[6] (۴۰) و سارس[7] (۴۱) مشاهده گردید. بررسی‌ها در این مطالعه و بر اساس محاسبات آماری، مشاهده گردید که احتمالا مولفه جنسیت و سن بر اثر ژنوتیپ‌های IFN-γ در موقعیت 874+ و IL-18G-137C در حساسیت و یا محافظت در برابر بیماری مالاریا اثری ندارد. طی این مطالعه، مشخص نمودن ارتباط ژنوتیپ سایتوکاین‌هایIL-18 و IFN-γ با شدت بیماری با تعداد انگل در خون به عنوان ملاک و معیاری از رشد و نمو انگل و یا به عبارت دیگر شدت بیماری مالاریا بود چرا که IFN-γ کلید ایجاد مکانیسم‌های موثر ایمنی است که برای کنترل عفونت مالاریا هم در مرحله قبل از گلبول قرمز و هم در مرحله عفونت زایی گلبول قرمزی ضروری به نظر می‌رسد (۴۳،۴۲) و اثر محافظتی آلل T در ژن IFN-γ به اثبات رسید. همچنین حضور آلل C در موقعیت 137- سایتوکاین IL-18 و نیز آلل A در موقعیت 874+ ژن IFN-γ در افرادی که در ابتدای روز سوم درمان (پایان داروهای روز دوم)، باقی مانده انگل در خون خود داشتند، این فرضیه و نتیجه منتج شده از یافته‌ها را تقویت نمود که حضور این آلل‌ها شاید باعث حساسیت سیستم ایمنی میزبان گردیده که در نتیجه خود محیط مناسبی را برای رشد و نمو انگل سبب می‌گردند. این می‌تواند دال بر ارتباط ژنوتیپ میزبان در کیفیت و طول درمان اشاره داشته باشد و نیز این فرضیه را که شاید عملکرد سیستم ایمنی میزبان در ایجاد ذخایر انگلی در مناطق اندمیک نقش داشته باشد را سبب گردد. ماکروفاژهای تحریک شده در طحال و سیتوکین‌ها به خصوص TNF-α، IFN-γ و IL-10، گلبول‌های قرمز خون آلوده و غیر آلوده به انگل را نیز از بین برده و اریتروپوئزیس (Erythropoiesis) (تولید گلبول‌های قرمز) را کاهش می‌دهند، که خود به ایجاد کم خونی کمک بیشتری می‌نمایند (۴۴). بنابراین بخشی از مطالعات ما بر اثر مالاریا روی کم خونی استوار گردید. نتیجه حاصل از این بررسی نشان داد که آلل C در موقعیت 137- ژن IL-18 بطور معنی داری در برابر کم خونی ناشی از مالاریا محافظت کننده بوده در حالی که آلل G در مقابل این بیماری حساس می‌باشد و آلل T نیز در موقعیت 874+ ژن IFN-γ باعث محافظت از کم خونی در بیماری مالاریا شده در حالی که افراد حامل آلل A به میزان ۳ برابر برای کم خونی ناشی از مالاریا مستعدتر بودند. البته مشاهده گردید که بین میزان IL-18 سرمی و مالاریای شدید ارتباط مستقیمی وجود دارد (۲۳). میزان تولید IL-18 در ژنوتیپ - 137GG بیشتر از ژنوتیپ 137GC- است (۴۵) که نتیجه این مطالعه نیز می‌تواند تائید کننده یافته‌های فنوتیپیکی تحقیق حاضر باشد.

بطور خلاصه، آلل T درموقعیت 874+ ژن IFN-γ و نیزآلل C در پروموتور IL-18 اثر محافظت کننده در مقابل رشد پارازیت و در نتیجه شدت و عوارض بیماری مانند آنمی داشته و ممکن است در کیفیت درمان تاثیرگذار باشند. سن و جنس میزبان، اثرقابل ملاحظه‌ای بر میزان تاثیر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر رشد و نمو پارازیت پلاسمودیوم ندارد. یافته‌های فوق، تئوری تاثیر ژنوتیپ سیستم ایمنی در ایجاد افراد asymptomatic و ذخیره انگلی به عنوان فاکتور موثر در اندمیک شدن مالاریا را مطرح می‌کند. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که ایمنوژنوتیپ افراد یک منطقه نیز می‌تواند به عنوان عامل مهمی در استراتژی‌های که به منظورکنترل بیماری مالاریا در مناطق اندمیک لحاظ می‌گردد، در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان بابت تامین هزینه طرح و نیز از کارشناسان مالاریای مرکز بهداشت استان هرمزگان که درجمع آوری نمونه‌ها همکاری دلسوزانه‌ای داشته‌اند، تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

[5] leishmaniose
[6] tuberculosis
[7] Severe Acute Respiratory Syndrom (SARS)

References

1. Warrell DA, Gilles HM. Essential malariology. 4th edition London: Arnold publisher. 2002. P:8-34.
2. Neil AJ. MalariaEditor: Zaim M. Department of Health, Ministry of Health and Medical Education press. 1st edition. 1993. P:8-16.
3. White NJ. Plasmodium knowlesi:The Fifth Human Malaria Parasite. Clin Infect Dis. 2008; 46(2): 172–173.
4. Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, et al. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. Nature.1991; 352:595-600.
5. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. Am J Hum Genet. 2005; 77(2):171-192.
6. Verra F, Mangano VD, Modiano D. Genetics of susceptibility to Plasmodium falciparum from classical malaria resistance genes towards genome-wide association studies. Parasite Immunol. 2009; 31(5):234-253.
7. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. Nature. 2002; 415(6872): 673–679.
8. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning a new cytokine that induces IFN–γ production by T cells. Nature. 1995; 378(6552): 88–91.
9.Dinarello CA. Interleukin 18. Methods. 1999; 19 (1): 121–32.
10. Kruse S, Kuehr J, Moseler M, Kopp MV, Kurz T, Deichmann KA, et al. Polymorphisms in the IL 18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2003; 111(1):117-122.
11. Sugiura T, Kawaguchi Y, Harigai M, Terajima-lchida H, Kitamura Y, Furuya T, et al. Association between adult-onset Still's disease and interleukin-18 gene polymorphisms. Genes Immun. 2002;3 (7):394-399.
12. Kretowski A, Mironczuk K, Karpinska A, Bojaryn U, Kinalski M, Puchalski M, et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. Diabetes.2002; 51(11):3347-3349.
13. Khani-Hanjani A, Lacalle D, Hoar D, Chalmers A, Horsman D, Anderson M, et al. Association between dinucleotide repeat in non-coding region of interferon-gamma gene and susceptibility to, and severity of, rheumatoid arthritis. Lancet. 2000; 356(9232):820–825.
14. Reddy P. Interleukin-18: recent advances. Current Opinion in Hematology. 2004;11(6):405-10.
15. Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, et al. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper(Th) type 1 but not Th2 cells. J Exp Med. 1998; 188(8):1485–92.
16. Zhang P-A, Wu J-M, Li Y, Yang XS. Association polymorphisms of interleukin-18 gene promoter region with chronic hepatitis B in chinese Han population. World J Gasteroenterol. 2005; 11(11): 1594-8.
17. Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J. 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.
18. Goldsby AR, Kindt JT, Osborne AB. Kuby immunology (4th). USA. Freeman and Company. 2000. P: 308-311.
19. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-γ production. Hum Immunol. 2000; 61(9):863–866.
20. Winkler S, Willheim M, Baier K, Schmid D, Aichelburg A, Graninger W, et al. Frequency of cytokine-producing T cells in patients of different age groups with Plasmodium falciparum malaria. J Infect Dis. 1999; 179(1): 209–16.
21. McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with suceptibility to cerebral malaria. Nature. 1994; 371(6497): 508-10.
22. Ubalee R, Tsukahara T, Kikuchi M, Lum JK, Dzodzomenyo M, Kaneko A, et al. Associations between frequencies of a susceptible TNFα promoter allele and protective α-thalassaemias and malaria parasite incidence in Vanuatu. Trop Med Int Heal .2005; 10(6): 544-49.
23. Somei K,Yukiko N, Massashi H, Sornchai L, Kenji N. A potential role of interleukin 18 in severe falciparum malaria. Acta Tropica . 2004; 89(3):279-284.
24. Medina TS, Costa SP, Oliveira MD, Ventura AM, Souza JM, Gomes TF, et al. Increased interleukin-10 and interferon-g levels in Plasmodium vivax malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. Malaria Journal. 2011;10:264-272.
25. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res.1988; 16(3): 1215.

26. Mackinnon MJ, Mwangi TW, Snow RW, Marsh K, Williams TN. Heritability of malaria in Africa. PLoS Med. 2005; 2(12): e340-348.
27. Franks S, Koram KA, Wagner GE, Tetteh K, McGuinness D, Wheeler JG, et al. Frequent and persistent, asymptomatic Plasmodium falciparum infections in African infants, characterized by multilocus genotyping. J Infect Dis. 2001; 183(5):796- 804.
28. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic,and inflammatory diseases. Clin Microbiol Rev. 1996; 9(4): 532-562.
29. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. Genes Immun. 2001; 2(2): 61-70.
30. Bingle CD, Hackett BP, Moxley M, Longmore W, Gitlin J D. Role of hepatocyte nuclear factor-3 alpha and hepatocyte nuclear factor-3 beta in Clara cell secretory protein gene expression in the bronchiolar epithelium. Biochem J. 1995; 308(Pt 1):197-202.
31. Huang MC, Li KK, Spear BT. The mouse alpha-fetoprotein promoter is repressed in HepG2 hepatoma cells by hepatocyte nuclear factor-3 (FOXA). DNA Cell Biol. 2002; 21(8):561-569.
32. Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, Nakano H, Hayashi N, Takeda K, et al. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. Immunity. 1999; 11(3):359-367.
33. Carpenter D, Rooth I, Färnert A, Abushama H, Quinnell RJ, Shaw MA. Genetics of susceptibility to malaria related phenotypes. Infect Genet Evol. 2009; 9(1):97-103.
34. Hashimoto W, Osaki T, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Nagata S, et al. Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. J Immunol. 1999; 163(2):583-589.
35. MooreJM, Ayisi J, Nahlen BL, Misore A, Lal AA, Udhayakumar V. Immunity to placental malaria. Elevated production of interferon- gamma by placental blood mononuclear cells is associated with protection in an area with high transmission of malaria. J Infect Dis. 1999; 179(5): 1218-25.
36. Biemba G, Gordeuk VR, Thuma P, Weiss G. Markers of inflammation in children with severe malarial anaemia. Trop Med Int Health. 2000; 5(4): 256-62.
37. Chizzolini C, Grau GE, Geinoz A, Schrijvers D. T lymphocyte interferon-gamma production induced by Plasmodium falciparum antigen is high in recently infected non-immune and low in immune subjects. Clin. Exp. Immunol. 1990; 79(1): 95-9.
38. Riley EM. Is T cell priming required for initiation of pathology in malaria infections?. Immunol Today. 1999; 20(5): 228-33.
39. Guilherme Inocêncio M, Claudia de J FC, Rita de CB, Adriano G-S, Fabiana M, Viviane CM, et al. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-γ production. BMC Infect Dis. 2007;7:33-45.
40. Sallakci N, Coskun M, Berber Z, Gürkan F, Kocamaz H, Uysal G. Interferon-gamma gene +874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. Tuberculosis (Edinb). 2007; 87(3):225-230.
41. Chong WP, Ip WK, Tso GH, Ng MW, Wong WH, Law HK, et al. The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. BMC Infectious Diseases. 2006; 6:82-86.
42. Plebanski M, Hill AV. The immunology of malaria infection. Curr Opin Immunol. 2000; 12(4):437-441.
43. Felli N, Pedini F, Zeuner A, Petrucci E, Testa U, Conticello C, et al. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. J Immunol. 2005; 175(3): 1464-72.
44. Nicholas PJD, Hien TT, SchollaardtT, LocPP, ChuongLV, Hong Chau TT, et al. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and anti inflammatory cytokines in severe malaria. J Infect Dis. 1999; 180(4):1288-1297.
45. Arimitsu J, Hirano T, Higa S, Kawai M, Naka T, Ogata A, et al. IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2006;342(4):1413-1416.

Original Article

The Impact of IL-18 and IFN-γ on Severity of Malaria and Quality of Treatment

Ameri GR[1,2], Malekzadeh K[1 *], Noor-Mohamadi Z[2], Shekari M[1], Turki H[1], Solaimani H[1]

1- Molecular Medicine Research Centre, Hormozgan University of Medical Science, Bandar Abbas, Iran.
2- Department of Biology-Genetics, Faculty of Basic sciences, Science Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 10 May 2014 Accepted: 01 Sep 2014

Abstract

Background & Objective: In human malaria, genotype of cytokines affect immune system. The impact of genotype -137G/C in IL-18 and +874A/T in IFN-γ on the severity of malaria and the quality of treatment – as factors to form asymptomatic persons in endemic regions- has been investigated.

Materials & Methods: 100 patients and 102 healthy persons were evaluated by Nested-PCR and thick blood film. IL-18(G-137C) and IFN- γ (A+874T) were determined by Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction and ARMS-PCR methods, respectively. The results were analyzed statistically.

Results: In this research, it has been observed that allele-T in IFN- γ gene and allele-C in IL-8 gene have protective effects against severity of Malaria. In addition, it has clearly been found that development and growth rate of plasmodium in µl of blood as well as anemia induced malaria significantly reduced in carriers of these alleles ($p<0.0001$). This effect has also been observed in the quality of the treatment in such a way that no parasite remained at the end of second day of treatment in carriers of alleles IFN- γTT and IL-18CC.

Conclusion: These findings issue the impact of immunogenetypes of patients on treatment quality and asymptomatic patients and parasite reservoir as effective factors in endemic malaria. Immunogenetypes of people may play as a remarkable factor to control malaria in endemic areas.

Keywords: **Malaria, IL-18, IFN-γ, Genotype, Parasite Reservoir**

* **Corresponding author: Keyanoosh Malekzadeh,** Molecular Medicine Research Centre, Hormozgan University of Medical Science, Bandar Abbas, Iran.
E-mail: keyanoosh@gmail.com
Tel: +989176108396

Journal of Fasa University of Medical Sciences/ Autumn 2014/ Vol.4/ No.3/ P 284-294