

## Original Article

## ارتباط بین پلی مورفیسم های ژن اینترلوکین ۱۸ (موقعیت های ۶۵۶ G/T، ۱۳۷ G/C و ۱۰۵ A/C) و بیماری کالآزار

ياسر منصوری<sup>۱</sup>، علی مروج<sup>۲</sup>، سهراب نجفی پور<sup>۲</sup>، سید امین کوهپایه<sup>۳</sup>، محمد حسن مشکی باف<sup>۱</sup>، عباس عبدالمهی<sup>۲</sup>  
منوچهر رسولی<sup>۴</sup>، قادر الهوردی<sup>۱</sup>

- 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 *لشمانیا* به طور عمده توسط پاسخ ایمنی سلولی که منجر به فعال شدن ماکروفاژها می شود انجام می گیرد. اینترلوکین ۱۸ (IL-18) به عنوان عامل القاء کننده تولید اینترفرون  $\gamma$  شناخته شده و با تحریک سلول های T منجر به تولید IFN- $\gamma$  می شود. با توجه به نقش مهم IL-18 در دفاع در برابر *لشمانیوز* احشایی (VL) و نقش شناخته شده پلی مورفیسم های ژن IL18 در تولید این سایتوکاین، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط احتمالی بین پلی مورفیسم های ژن IL18 و استعداد ابتلا به VL در بیماران ایرانی است.

**مواد و روش ها:** گروه های 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 مورفیسم های ژن IL18 در موقعیت های ۶۵۶(G/T)، ۱۳۷(G/C) و ۱۰۵(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 ژنوتیپ های IL-18 بین بیماران و گروه شاهد تفاوت معنی داری وجود نداشت. علاوه بر این، فراوانی هاپلوتیپ ATG و هاپلوزنوتیپ 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 مورفیسم های ژن IL18 در موقعیت های ۶۵۶(G/T)، ۱۳۷(G/C) و ۱۰۵(A/C) وجود دارد ( $P<0.001$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی آلل T در موقعیت ۶۵۶- و فراوانی هاپلوتیپ ATG و هاپلوزنوتیپ AGG/ATG (موقعیت های ۱۳۷-، ۶۵۶- و ۱۰۵+) به طور معنی داری در گروه کنترل بیشتر است. بر اساس اطلاعات ما تاکنون مطالعه ای در مورد ارتباط پلی مورفیسم های 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 می رسد که تحقیقات بیشتر در این زمینه در سایر جمعیت ها ارزشمند خواهد بود.

**کلمات کلیدی:** اینترلوکین ۱۸، پلی مورفیسم ژنی، *لشمانیوز* احشایی، ایران

## مقدمه

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

سلول های میزبان، در ماکروفاژها بقا و تکثیر پیدا کند (۲). مقاومت میزبان در برابر انگل *لشمانیا* توسط پاسخ ایمنی سلولی و تا حدودی توسط پاسخ ایمنی ذاتی انجام می گیرد. ایمنی ضد *لشمانیا* در پاسخ ایمنی تطبیقی با واسطه فعال سازی مؤثر ماکروفاژها و سلول های دندریتیک توسط سلول های T-CD4+ و T-CD8+ انجام می شود (۳). سلول های T-CD4+ مسئول تولید سایتوکاین های حیاتی برای فعال شدن ماکروفاژها و پاک سازی مؤثر انگل است. اینترلوکین ۱۸ (IL-18)، که یکی از اعضای خانواده سایتوکاین

\*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 نمونه ها 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 رضایت نامه از پدر و مادر کودکان گرفته شد.

**واکنش زنجیره ای 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 G/T ۶۵۶-، G/C ۱۳۷- و A/C ۱۰۵+ (کدون ۳/۳۵) انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی PCR ۱ X بافر، ۰/۵ میکرومولار پرایمر اختصاصی (Primm، 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 Mastercycler 5530 (Eppendorf، آلمان) عبارت بود از دناتوراسیون به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۳۰ سیکل به ترتیب ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در دماهای خاص اتصال پرایمر (جدول ۱)، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و نهایتاً ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه. پس از انجام PCR، محصولات توسط آنزیم های محدودالایر (Fermentas، لیتوانی) هضم شدند. در نهایت محصولات هضم شده در ژل آگارز ۳٪ الکتروفورز شد و توسط اتیدیوم بروماید (CinnaGen، ایران) رنگ آمیزی گردید. سپس ژل ها در زیر دستگاه UV transilluminator مورد مطالعه قرار گرفتند. توالی پرایمرها، دماهای اتصال پرایمر، غلظت  $MgCl_2$ ، آنزیم های محدودالایر و اندازه محصول DNA پس از هضم در جدول ۱ نشان داده شده اند.

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

*IL-18* است، در حال حاضر به عنوان یک تنظیم کننده مهم پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی شناخته می شود. *IL-18* به عنوان عامل القای تولید اینترفرون  $\gamma$  شناخته شده است و موجب تحریک سلول های  $T-CD4+$  و تولید  $IFN-\gamma$  توسط این سلول ها می شود (۶-۴). اگرچه *IL-8* در اصل به عنوان یک عامل قادر به القای تولید  $IFN-\gamma$  توسط سلول های T مشخص شده است، اما شناخت نقش مؤثر *IL-18* در سایر فعالیت های ایمنی به سرعت در حال گسترش است. *IL-18* باعث فعال شدن نوتروفیل، تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و آزادسازی سایتوکین ها می شود (۷-۸). مطالعات اخیر نشان می دهد که *IL-18* نقش مهمی در بیان مولکول های چسبان ICAM-1 و VCAM-1 بر روی سلول های اندوتلیال دارد (۹). نقش مهم *IL-8* در مصونیت در مقابل VL به خوبی شناخته شده است. مشخص شده است که در هنگام عفونت سلول ها با گونه های مختلف لیشمانیا، ترشح *IL-18* افزایش می یابد (۱۰). علاوه بر آن ثابت شده است که موش های دارای نقص در تولید *IL-18* که آلوده به لیشمانیا هستند تولید  $IFN-\gamma$  در آن ها به طور قابل توجهی پایین تر است و همچنین سطح سرمی *IL-12* در آن ها پایین است که این موارد خود نشان دهنده کاهش پاسخ  $Th1$  در این موش هاست (۱۱).

تحقیقات نشان می دهد که افراد مختلف به میکروب های مشابه پاسخ های ایمنی متفاوتی نشان می دهند. مطالعات متعدد نشان داده اند که پلی مورفیسم ژن ها بر بیان سایتوکین ها تأثیر بسزایی دارند، بنابراین پلی مورفیسم های ژنی نقش مهمی در استعداد افراد گوناگون به بیماری های عفونی ایفا می کنند (۱۵-۱۲). با توجه به نقش مهم *IL-18* در دفاع در برابر VL و اثر پلی مورفیسم های 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 روش ها

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

جدول ۱: توالی پرایمرها و شرایط PCR و آنزیم های محدودالایر برای تکثیر ژن *IL-18* در نقاط پلی مورفیک مختلف

| IL-18 Polymorphisms | PCR primers                                                         | Annealing Temp.(°C) | MgCl <sub>2</sub> (mM) | Restriction enzymes | Fragment sizes (bp)   |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|-----------------------|
| -656(G/T)           | F: AGGTCAGTCTTTGCTATCATTCCAGG<br>R: CTGCAACAGAAAGTAAGCTTGCGGAGAGG   | ۶۰                  | ۱                      | <i>Mwo I</i>        | G: ۹۶ + ۲۴<br>T: ۱۲۰  |
| -137 (G/C)          | F: CCAGCTTGCTGAGCCCTTTGCTCC<br>R: GCAGGTGGCAGCCGCTTTAGCAGCTAG       | ۶۰                  | ۱/۵                    | <i>Mbo II</i>       | G: ۱۱۶ + ۳۹<br>C: ۱۵۵ |
| codon35/3 (A/C)     | F: AGATTTAATGTTTATTGTAGAAAACTGGACTC<br>R: CAGTCATATCTTCAAATAGAGGCCG | ۵۵                  | ۳                      | <i>Dde I</i>        | A: ۱۰۹ + ۳۲<br>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 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 (۳۴/۴٪ 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

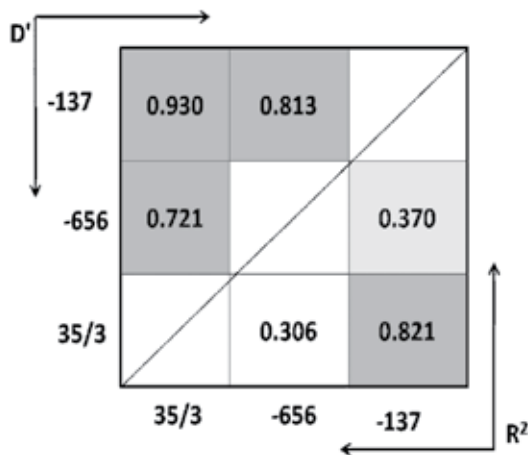
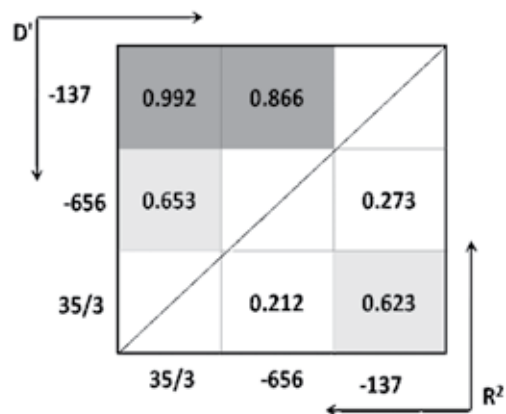
جدول ۲: فراوانی آللی و ژنوتیپی ژن IL-18 در نقاط مختلف پلی‌مورفیک در بیماران و گروه کنترل

| Genotypes and alleles             | Patient group n (%) | Control group n (%) | $\chi^2$ | P value* | OR (95%CI)       | Study power (%) |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|----------|----------|------------------|-----------------|
| <b>IL-18 -656 Genotypes</b>       |                     |                     |          |          |                  |                 |
| 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              |
| <b>Alleles</b>                    |                     |                     |          |          |                  |                 |
| 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)          |          |          |                  |                 |
| <b>IL-18 -137 Genotypes</b>       |                     |                     |          |          |                  |                 |
| 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               |
| <b>Alleles</b>                    |                     |                     |          |          |                  |                 |
| 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)           |          |          |                  |                 |
| <b>IL-18 Codon 35/3 Genotypes</b> |                     |                     |          |          |                  |                 |
| AA                                | ۶۹ (۵۸/۵)           | ۹۱ (۵۸/۳)           | ۰/۰۰     | ۰/۹۸     | ۱/۰۱ (۰/۶۰-۱/۶۸) | 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              |
| <b>Alleles</b>                    |                     |                     |          |          |                  |                 |
| 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<br>(codon 35/3, -656, -137) | Patient Group<br>n (%) | Control group<br>n (%) | $\chi^2$ | P value* | OR (95%CI)       | Study<br>power (%) |
|----------------------------------------|------------------------|------------------------|----------|----------|------------------|--------------------|
| <b>Single haplotype</b>                |                        |                        |          |          |                  |                    |
| 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 (۰/۹۰-۲/۳۰) | ۳۵                 |
| CGC                                    | ۴۸ (۲۰/۳)              | ۶۵ (۲۰/۸)              | ۰/۰۲     | ۰/۸۸۷    | ۰/۹۷ (۰/۶۲-۱/۵۱) | ۳                  |
| <b>Double haplotype</b>                |                        |                        |          |          |                  |                    |
| 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)                | ۰/۳۵     | 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 مورفیسم های اینترلوکین ۱۸ بر اساس  $R^2$  و  $D'$  در گروه کنترل.

 شکل ۳: حرکت ترجیحی پلی مورفیسم های 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 هم چنین 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) (۲۴-۲۷) با افزایش تولید IL-18 همراه است، بنابراین ما پیش بینی می کردیم که فراوانی این آلل ها 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 معنی داری 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 می تواند هر دو بازوی سیستم ایمنی طبیعی و اکتسابی را تنظیم کند (۱۰-۷). شناخته شده ترین فعالیت بیولوژیک IL-18 تولید  $IFN-\gamma$  در حضور IL-12 است (۷). در واقع IL-12 و IL-18 به طور سینرژیک در تولید  $IFN-\gamma$  توسط سلول های  $Th1$ ، سلول های B و سلول های NK عمل می کنند (۱۹). با این حال تحت شرایط خاصی، IL-18 هم چنین می تواند پاسخ های  $Th2$  را با تنظیم تولید سایتوکاین های IL-4، IL-13 و IL-10 کنترل نماید (۲۲-۲۰). IL-18 علاوه بر تأثیر بر تولید  $IFN-\gamma$ ، با تحریک تولید سایتوکاین های IL-6، IL-1 $\beta$ ، IL-8 و TNF- $\alpha$  اثرات مستقیم پیش التهابی نیز دارد (۲۳).

با توجه به نقش کلیدی IL-18 در پاتوژنز بیماری لیشمانیوز، ژن این سایتوکاین می تواند کاندیدای مهم در تعیین نتیجه این بیماری باشد. مطالعات ژنتیکی اخیر نشان داده است که برخی از پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی در ژن *IL18* انسان می تواند 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 هاپلوزنوتیپ 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.

مشاهده نشد. همچنین بر خلاف انتظار، نتایج نشان داد که فراوانی آلل T در موقعیت ۶۵۶- و هاپلوتیپ ATG و هاپلوزنوتیپ 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 هاپلوزنوتیپ 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 هاپلوزنوتیپ 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 هاپلوزنوتیپ‌های 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

### 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 mononuclear 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-1β (-511T/C) gene polymorphism not IL-1β (+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-1β (+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- $\gamma$  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-1 $\beta$ . *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 Y<sup>1</sup>, Moravej A<sup>2</sup>, Najafipour S<sup>2</sup>, Kouhpayeh SA<sup>3</sup>, Meshkibaf MH<sup>1</sup>, Abdollahi A<sup>2</sup>, Rasouli M<sup>4\*</sup>  
Allahverdi Gh<sup>1</sup>

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- $\gamma$  inducing factor, stimulate IFN- $\gamma$  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