

## بررسی فراوانی پلی مورفیسیم‌های $TNF\alpha-244G \rightarrow A$ ، $TNF\alpha-308G \rightarrow A$ و $TNF\alpha-238G \rightarrow A$ در افراد سالم و مبتلا به مالاریا در دو استان کرمان و هرمزگان

پریسا عاطف وحید<sup>۱</sup>، محمدرضا علی‌وند<sup>۲</sup>، فیض‌اله هاشمی گرجی<sup>۱</sup>، مهرداد هاشمی<sup>۳</sup>، محمد رضا نوری دلویی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی-مولکولی، گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران

<sup>۳</sup> استادیار، دکترای ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

<sup>۴</sup> استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران

### چکیده

**سابقه و هدف:** عامل نکروز کننده تومور آلفا ( $TNF\alpha$ ) یکی از سایتوکین‌های اصلی می‌باشد که در بیماری‌های عفونت‌ها نقش مهمی دارد. به نظر می‌رسد که استعداد ژنتیکی ابتلا به نوع حاد مالاریا نیز با چندشکلی در ناحیه پروموتوری این ژن در ارتباط باشد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی چند شکلی‌های  $TNF\alpha-308G \rightarrow A$ ،  $TNF\alpha-244G \rightarrow A$  و  $TNF\alpha-238G \rightarrow A$  در ناحیه پروموتوری ژن  $TNF\alpha$  در ۱۷۴ فرد بومی دو استان کرمان و هرمزگان بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه مورد-شاهدی، DNA ژنومی ۱۷۴ (۵۴ نفر سالم و ۲۰ نفر بیمار) فرد بومی غیرخویشاوند استان‌های کرمان و هرمزگان از نمونه خون استخراج شد و فراوانی چند شکلی‌های رایج در ناحیه پروموتوری ژن  $TNF\alpha$  با استفاده از PCR-RFLP بررسی شد.

**یافته‌ها:** ۸۶/۲ درصد نمونه‌های مربوط به افراد سالم در این سه مکر دارای ژنوتیپ GG، ۱۴/۲۶ درصد دارای ژنوتیپ AG و ۰/۱۹ درصد دارای ژنوتیپ AA بودند. ۱۰۰ درصد نمونه‌های بیمار در این سه مکر دارای ژنوتیپ GG بودند.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد مالاریا فشار تکاملی بر روی ژنوم افراد بومی این دو استان ایجاد کرده و سبب افزایش فراوانی چند شکلی‌هایی شده که با استعداد ابتلا به مالاریا در ارتباطند، اگرچه مقایسه فراوانی این چندشکلی‌ها در افراد سالم و بیمار در هیچ یک از مقرها رابطه معنی‌داری را با استعداد ابتلا به مالاریا نشان نداد.

**واژگان کلیدی:** مالاریا،  $TNF\alpha$ ، چندشکلی، PCR-RFLP.

### مقدمه

عامل نکروز کننده تومور آلفا ( $TNF\alpha$ )، یک پروتئین هموتریمری است که در ایجاد التهاب نقش دارد. این پروتئین جز سایتوکین‌هایی است که واکنش‌های مرحله حاد را فعال می‌کنند.  $TNF$  به طور عمده توسط ماکروفاژها تولید می‌شود،

اما سلول‌های گوناگون دیگری نیز مقداری از این سایتوکین تولید می‌کنند. ژن کد کننده  $TNF\alpha$  مجاور ژن  $TNF\beta$  در کمپلکس HLA، بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۶ در ناحیه ۲۱.۳ قرار دارد.  $TNF\alpha$  دارای فعالیت‌های زیستی بسیاری از جمله تنظیم سلول‌های سیستم ایمنی، القا آپوپتوز، القا التهاب و ممانعت از ایجاد تومور و تکثیر ویروس است (۲،۱). مشخص شده که چندشکلی‌هایی در ناحیه پروموتوری ژن  $TNF\alpha$  با میزان بیان این ژن در ارتباطند. این چندشکلی‌ها همچنین در ایجاد مقاومت و یا استعداد ابتلا به انواع بیماری‌های عفونی و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی،

محمد رضا نوری دلویی (email: nooridalooii@sina.tums.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۱۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۰۵/۲۷

مواردی از ابتلا به این بیماری مشاهده می‌شود. استان‌های هرمزگان و کرمان از جمله مناطق پرخطر بروز مالاریا بعد از سیستان و بلوچستان در کشور هستند (۹). هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی چند شکلی‌های  $\alpha$ -TNF در دو استان مالاریا خیز ۲۳۸- در ناحیه پروموتری ژن  $\alpha$ -TNF در دو استان مالاریا خیز کرمان و هرمزگان بود.

## مواد و روشها

در این مطالعه مورد-شاهدی، ۱۵۴ نمونه خون از افراد سالم و ۲۰ نمونه از افراد مبتلا به مالاریا بومی دو استان هرمزگان و کرمان جمع‌آوری شدند. نمونه‌های بیماران مربوط به افرادی بود که از سال ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۸ با علائم مشکوک به مالاریا به مراکز بهداشت این دو استان مراجعه کرده بودند و بعد از تهیه لام خونی و مشاهده انگل مالاریا توسط مسئول آزمایشگاه و تشخیص قطعی مالاریا، از این افراد خون‌گیری به عمل آمد. نمونه‌های خون از افراد بومی غیرخویشاوند این دو استان جمع‌آوری شد و هنگام جمع‌آوری از تمام افراد رضایت‌نامه گرفته شد. از هر فرد حدود ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر خون گرفته و با ۵۰۰ لاندا EDTA مخلوط شده و بر روی یخ به پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری در ورداور تهران (محل انجام طرح) منتقل شد. با استفاده از روش فنل و کلروفرم DNA نمونه‌ها استخراج شد و کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر در طیف نوری ۲۶۰ لاندا  $G \rightarrow A$  سنجیده شد. نمونه‌ها از نظر وجود ۳ چند شکلی  $G \rightarrow A$  ۲۴۴-،  $G \rightarrow A$  ۲۳۸- و  $G \rightarrow A$  ۳۰۸- در ناحیه پروموتری ژن  $\alpha$ -TNF مورد بررسی قرار گرفتند.

ابتدا قطعه حاوی چند شکلی‌های مورد نظر با استفاده از پرایمرهای مناسب (جدول ۱) و با روش PCR تکثیر شد. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرو لیتر و در شرایط واسرشتگی (denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگرها (annealing) در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ساخت DNA (elongation) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و تکمیل ساخت DNA (final extention) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه در ۳۰ سیکل انجام شد. سپس محصولات PCR برای اطمینان از صحت واکنش PCR به همراه یک DNA ladder بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند. برای تشخیص هر یک از چند شکلی‌ها از آنزیم محدود کننده‌ای که چند شکلی مورد نظر را شناسایی می‌کند استفاده

التهابی و حتی سرطان دخیلند. یکی از بیماری‌هایی که ممکن است با چندشکلی در ناحیه پروموتری این ژن در ارتباط باشد مالاریا است (۳،۴). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که شیوع انگل در یک جمعیت، بر روی فراوانی ژن‌ها و صفاتی که سبب ایجاد مقاومت و یا استعداد ابتلا به بیماری می‌شوند، تاثیر می‌گذارد. مطالعات انجام شده در دهه‌های اخیر نشان داده است که مالاریا به دلیل سابقه طولانی که در مبتلا کردن انسان داشته و همین‌طور به دلیل خطر بالای مرگ و میر در اثر ابتلا به آن در قرون گذشته، قویترین فشار تکاملی را در تاریخ اخیر نسل بشر داشته است (۵). در جوامع مختلف در مناطق مالاریا خیز جهان تطابق‌های ژنتیکی مختلفی در ارتباط با مالاریا به وجود آمده است که شامل نواقص گلوبول‌های قرمز نظیر کم خونی داسی شکل، تالاسمی (نوع  $\alpha$  و  $\beta$ ) و کمبود آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز است (۶). وجود یک الگوی جغرافیایی برای انتشار صفت کم خونی داسی شکل و ارتباط آن با استعداد ابتلا به مالاریا به خوبی مطالعه شده است (۷). این بیماری‌ها و نواقص به دلیل فشار تکاملی مالاریا بر روی ژنوم انسان در مناطق مالاریا خیز دارای شیوع بسیار بالاتری نسبت به مناطق فاقد مالاریا هستند (۶). علاوه بر این نواقص، چند شکلی‌های ژنتیکی در بعضی از ژن‌ها مثل NOS2، MBL2 و  $\alpha$ -TNF نیز با استعداد ابتلا به مالاریا در ارتباط هستند (۸،۹). عامل نکروز کننده تومور آلفا ( $\alpha$ -TNF) دارای طیف گسترده‌ای از نقش‌های بیولوژیکی است (۱). به نظر می‌رسد چندشکلی‌های ۲۴۴- و ۳۰۸- و ۲۳۸- در ناحیه پروموتری این ژن با میزان تولید  $\alpha$ -TNF و شدت ابتلا به مالاریا در ارتباط هستند (۸،۱۰). نشان داده شده است که میزان بالای این سایتوکین در خون سبب افزایش شدت و تظاهرات مالاریا در انسان می‌شود (۴). جایگزینی باز آدنین به جای گوانین در این ۳ ناحیه سبب افزایش بیان این سایتوکین می‌گردد (۸)، در نتیجه احتمال ابتلا به مالاریای مغزی و یا مرگ در افرادی که در این سه جایگاه دارای ژنوتیپ AG هستند بیشتر است (۳، ۱۰، ۱۱). در مطالعات مشخص شده است که افراد دارای ژنوتیپ AA در ناحیه ۳۰۸-، ۷ برابر بیشتر از افراد دیگر در خطر ابتلا به مرگ و یا آسیب‌های مغزی در اثر مالاریا قرار دارند (۳).

ایران نیز در گذشته جز مناطق مالاریا خیز به حساب می‌آمده است، اما به دلیل مبارزات پیگیر و به کار بردن راه کارهای پیشگیرانه در چندین دهه اخیر، اکنون این بیماری در اکثر مناطق کشور ریشه کن شده است و این مناطق به مرحله پاک رسیده‌اند، اما هنوز در مناطقی از جنوب و جنوب شرقی

**جدول ۱-** جانشینی باز باعث از بین رفتن ( ) و یا به وجود آمدن جایگاه برش جدید (+) برای آنزیم محدود کننده می شود.

چند شکلی	توالی پرایمر	اندازه قطعه	مرجع آنزیم محدود کننده	شماره
TNF $\alpha$ -308 G $\rightarrow$ A	TNF $\alpha$ 1:5'GGCAATAGGTTTTGAGGGCCATG-3' TNF $\alpha$ 2:5'-CACACTCCCCATCCTCCCTGATC-3'	۱۱۷bp	NcoI (-)	۲۵
TNF $\alpha$ -244 G $\rightarrow$ A	TNF $\alpha$ 1: " " TNF $\alpha$ 2: " "	۱۱۷bp	HPyF31 (+)	۲۶
TNF $\alpha$ -238 G $\rightarrow$ A	TNF $\alpha$ 1: " " TNF $\alpha$ 2: " "	۱۱۷bp	BSpPI(-)	۲۷

sample-kolmogorov-smirnov استفاده شد و فراوانی هیچ یک از چندشکلی‌ها در افراد سالم و بیمار رابطه معنی‌داری را با سلامت نشان ندادند ( $p > 0.05$ ).



**شکل ۱-** هضم آنزیمی توسط آنزیم NcoI.

خط‌های ۳ و ۶ دارای ژنوتیپ AG هستند، در این نمونه‌ها آنزیم یک جایگاه برش دارد و ۳ نوار با اندازه‌های ۱۱۷، ۹۴ و ۲۳ جفت بازی قابل انتظار است، ولی به دلیل کوچکی قطعه ۲۳ جفت بازی بر روی ژل مشاهده نمی‌شود. چاهک‌های ۴ و ۵ نمونه‌هایی با ژنوتیپ GG را نشان می‌دهند، که پس از هضم آنزیمی دو قطعه ۹۴ و ۲۳ جفت بازی ایجاد می‌کنند و روی ژل قطعه ۹۴bp مشاهده می‌شود. خط ۱ نمونه هضم نشده را نشان می‌دهد. خط ۲ مربوط به نشانگر DNA ۵۰ bp می‌باشد.

شد (جدول ۱). برای انجام هضم آنزیمی ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را با ۱ U از آنزیم محدود کننده و ۱/۵ میکرولیتر از بافر مربوط به آن مخلوط کرده و با آب دو بار تقطیر حجم کلی را به ۲۵ میکرو لیتر رسانده و آن را به مدت ۳ ساعت در دمای مناسب نگه داشته و بعد از این مدت برای مشاهده باندهای ایجاد شده در اثر هضم آنزیمی، نمونه‌ها را بر روی ژل آکریل امید ۱۲ درصد الکتروفورز کرده و سپس با استفاده از روش رنگ‌آمیزی نیترا ت نقره رنگ آمیزی انجام گرفت.

در مرحله بعد برای مقایسه فراوانی هر یک از چند شکلی‌ها در بین افراد سالم و بیمار از آزمون two sample-kolmogorov-smirnov استفاده شد.

## یافته‌ها

در این مطالعه فراوانی ۳ چند شکلی  $AG \rightarrow A$ -۳۰۸،  $AG \rightarrow A$ -۲۴۴ و  $AG \rightarrow A$ -۲۳۸ در ناحیه پروموتوری ژن TNF  $\alpha$ ، در ۱۷۴ نمونه جمع آوری شده از استان‌های کرمان و هرمزگان با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. از ۱۷۴ نمونه بررسی شده برای ناحیه ۳۰۸- ژن TNF $\alpha$  (شکل ۱)، ۷۰/۶۸ درصد از نمونه‌ها دارای ژنوتیپ GG و ۳۱/۲۹ درصد از نمونه‌ها دارای ژنوتیپ AG بودند و هیچ کدام از نمونه‌ها ژنوتیپ AA را نشان ندادند. در بررسی ناحیه ۲۳۸- این ژن (شکل ۳)، ۹۳/۱ درصد از نمونه‌های سالم ژنوتیپ GG و ۶/۳۲ درصد ژنوتیپ AG و ۰/۵۷ درصد نمونه‌ها ژنوتیپ GG را نشان دادند. در ناحیه ۲۴۴- (شکل ۲) این ژن، ۹۴/۸۲ درصد نمونه‌های سالم، دارای ژنوتیپ GG و ۵/۱۷ درصد دارای ژنوتیپ AG بودند و هیچ یک از نمونه‌ها ژنوتیپ AA را نشان ندادند. ۱۰۰ درصد نمونه‌های بیمار در این ۳ جایگاه ژنوتیپ GG را نشان دادند.

برای یافتن رابطه‌ای بین فراوانی هر یک از این چندشکلی‌ها در افراد سالم و بیمار و استعداد ابتلا به بیماری از آزمون two

## بحث

مالاریا یک بیماری عفونی است که توسط انگل پروتوزوئری ایجاد می‌شود. تقریباً نیمی از جمعیت جهان در بیش از یک صد کشور در معرض این بیماری بوده و سالانه حدود ۲۴۷ میلیون نفر به آن مبتلا می‌شوند. بیماری مالاریا از قدیم در ایران نیز وجود داشته است.

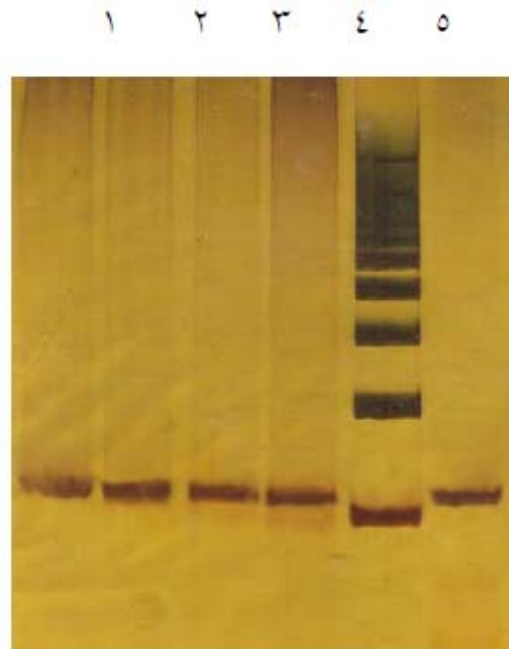
به نظر می‌رسد که مالاریا تاثیر انتخابی زیادی بر روی ژنوم انسان داشته است. این مسئله را از روی شیوع بالای برخی صفات در مناطق مالاریا خیز می‌توان فهمید (۱۲). از جمله این صفات می‌توان کم خونی داسی شکل، تالاسمی، کمبود آنزیم G6PD، آنتی‌ژن دافی و چندشکلی‌هایی در ژن‌های NOS2، MBL و TNF $\alpha$  را نام برد (۶، ۱۸-۱۳).

فراوانی ژن کم‌خونی داسی شکل و تالاسمی در آفریقا، مدیترانه و خاورمیانه بیشتر است و این مناطق با مناطقی که دارای شیوع بالای مالاریا هستند هم‌خوانی دارد (۶، ۱۹، ۲۰).

در این مطالعه به بررسی فراوانی چند شکلی‌های TNF $\alpha$ -238G $\rightarrow$ A و TNF $\alpha$ -308G $\rightarrow$ A، 244G $\rightarrow$ A که احتمالاً با ایجاد مقاومت نسبت به ابتلا به مالاریا و یا شدت ابتلا به مالاریا در ارتباطند، پرداخته شد. برای این مطالعه دو استان هرمزگان و کرمان که حتی با وجود اجرای راهکارهای پیشگیرانه و درمانی هم چنان موارد مالاریا در آنها گزارش می‌شود (۹) انتخاب شدند و مطالعه بر روی ۱۷۴ فرد سالم و بیمار (۱۵۴ فرد سالم و ۲۰ بیمار)، انجام گرفت. در این بررسی از روش PCR-RFLP استفاده شد. ابتدا DNA ژنومی نمونه‌ها استخراج شد و با استفاده از آغازگرهای مناسب و استفاده از فن PCR قطعه مورد نظر تکثیر شد. در مرحله بعد برای ردیابی هریک از چند شکلی‌ها از یک آنزیم برشگر ویژه استفاده شد.

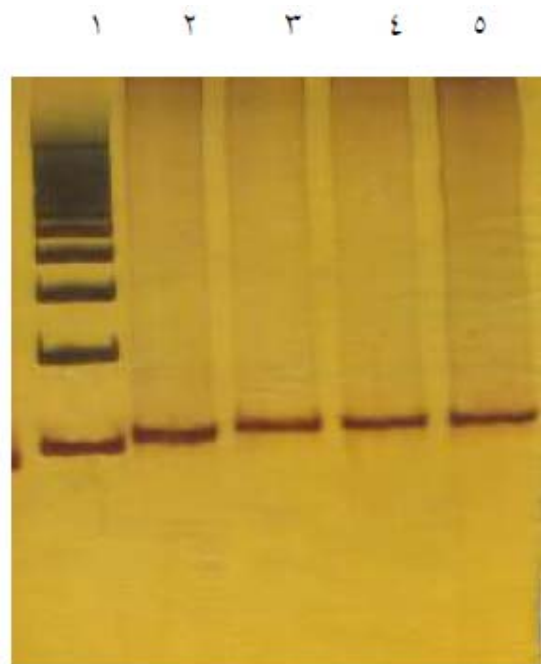
برخی مطالعات نشان داده‌اند که با افزایش فعالیت ژن TNF $\alpha$ ، خطر ابتلا به مالاریای مغزی و مرگ در اثر مالاریا افزایش می‌یابد (۲۱، ۲۲). با جانشینی باز A به جای باز G در این سه جایگاه، فعالیت این ژن افزایش می‌یابد (۲۶-۲۳).

بیشتر نمونه‌های سالم ما در این سه جایگاه دارای ژنوتیپ GG بودند. نمونه‌های بیماری که جمع آوری شده بودند، مربوط به افرادی بودند که مبتلا به مالاریا شده بودند ولی هیچ یک عوارض نورولوژیکی مربوط به مالاریا را نشان ندادند و به مالاریا مغزی و مرگ دچار نشده بودند و همه این نمونه‌ها ژنوتیپ GG را نشان دادند. با توجه به نتایج آزمون two



شکل ۲- هضم آنزیمی توسط آنزیم HPyF3 II.

نمونه‌های خط‌های ۳، ۲، ۱ دارای ژنوتیپ GG هستند، در این نمونه‌ها آنزیم جایگاه برش ندارد و تنها قطعه ۱۱۷bp مشاهده می‌شود. خط ۵ قطعه ۱۱۷bp هضم نشده را نشان می‌دهد. خط ۴ یک نشانگر DNA ۱۰۰bp را نشان می‌دهد.



شکل ۳- هضم آنزیمی توسط آنزیم BspPI.

خط‌های ۳ و ۴ نمونه‌هایی با ژنوتیپ GG را نشان می‌دهند، این نمونه‌های جایگاه برشی برای این آنزیم ندارند و تنها یک قطعه ۱۱۷bp مشاهده می‌شود. خط ۲ نمونه‌ای با ژنوتیپ AA را نشان می‌دهد که در این نمونه یک جایگاه برش برای آنزیم وجود دارد و دو قطعه ۱۲ و ۱۰۵ bp به وجود می‌آید، ولی قطعه ۱۲bp به دلیل کوچکی بر روی ژل مشاهده نمی‌شود. خط ۵ یک قطعه ۱۱۷bp هضم نشده را نشان می‌دهد. خط ۱ یک نشانگر DNA ۱۰۰bp را نشان می‌دهد.

حاد با مرگ و یا عوارض نورولوژیکی و مالاریا مغزی در ارتباط است (۲۰). مطالعه دیگری بر روی افراد بالغ سربلنکایی نشان داد که هتروزیگوت بودن این آلل با خطر ابتلا به مالاریای حاد در ارتباط است (۲۸). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که چندشکل‌های TNF-1031 ، TNF-308 ، TNF851 و TNF1304 با عفونت خفیف مالاریا در ارتباطند (۲۲).

یافته‌های ما نشان داد که ژنوتیپ GG در این سه ناحیه، در بین افراد ساکن دو استان کرمان و هرمزگان بیشترین فراوانی را دارد.

### تشکر و قدردانی

از تمامی همکاران گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

sample-kolmogorov-smiranov ، هیچ یک از این چندشکل‌ها ارتباطی را با استعداد ابتلا به مالاریا نشان ندادند. مطالعه‌ای بر روی کودکان اوگاندا نیز هیچ رابطه‌ای را بین چند شکلی‌های ۳۰۸- ، ۲۳۸- و ۳۷۶- در ناحیه پروموتری ژن TNF $\alpha$  و ایجاد مقاومت در برابر ابتلا به مالاریا نشان نداد (۲۷).

مطالعه دیگری نشان داد که توزیع فراوانی آلل‌های مختلف TNF $\alpha$ -238 و TNF $\alpha$ -308 ارتباطی با شیوع مالاریای بدون علامت ندارد. در این مطالعه از بین این سه چندشکل در ژن TNF $\alpha$ ، تنها آلل TNF $\alpha$ -238 در بین آفریقایی‌های زیر صحرا نسبت به آفریقایی‌های آمریکایی فراوانی بیشتری را نشان داد و آلل TNF $\alpha$ -238A با ایجاد مقاومت نسبت به مالاریای بالینی و مالاریای مغزی در ارتباط بود (۵).

مطالعه دیگری مشخص کرد که هموزیگوت بودن برای آلل TNF $\alpha$ -238A در کودکان گامبیایی، هنگام ابتلا به مالاریای

### REFERENCES

- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-501.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984; 312: 724-29.
- Mc Guire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 6: 508-10.
- Ubalee R, Tsukahara T, Kikuchi M, Lum J.K, Dzodzomenyo M, Kaneko A, et al. Associations between frequencies of a susceptible TNF $\alpha$  promoter allele and protective  $\alpha$ -thalassaemias and malaria parasite incidence in Vanuatu. *Trop Med Int Heal* 2005; 10: 544-49.
- Fortin A, Stevenson MM, Gros P. Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature. *Human Molecular Genetics* 2002; 20: 2469-78.
- Nagel RL, Roth EF. Malaria and red cell defects. *Blood* 1989; 74: 1213-22.
- Geographical Distribution of sickle cell disease. Available from: [http://encarta.msn.com/malaria\\_461573602/geographic-distribution-of-the-sickle-cell-mutation.html](http://encarta.msn.com/malaria_461573602/geographic-distribution-of-the-sickle-cell-mutation.html)
- Mombo LE, Ntouni F, Bisseye C, Ossari S, Lu Ch, Nagel R, Krishnamorthy R. Human genetic polymorphism and asymptomatic Plasmodium Falciparum malaria in Gabonese schoolchildren. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 186-90.
- Stirnadel H.A, tackle M, Felger I, Smith T, Tanner M, Beck HP. Malaria infection and morbidity in infants in relation to genetic polymorphism in tanzania. *Trop Med Int Heal* 1999; 4: 187-93.
- D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994; 39: 150-54.
- Levesque MC, Hobbs MR, Anstey NM, Vaughn TN, Chancellor JA, Pole A, et al. Nitric oxide synthase type 2 promoter polymorphisms, Nitric oxide production, and disease severity in Tanzanian children with malaria. *J Inf Dis* 1999; 180: 1994-2002.
- High prevalence of malaria in Sistan- va- Baloochestan province of Iran. Available from: <http://www.jamejamonline.ir/newstext.aspx?newsnum=100913246623> [In Persian]
- Kwiatkowski D. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 171-90.
- Boldt ABW, Messias-Reason IJ, Bertrand L, Issifou S, Alves ML, Kremsner P, et al. Haplotype specific-sequencing reveals MBL2 association with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection. *Malaria J* 2009; 8: 97.

15. Holmberg V, Schuster F, Dietz E, Sagarriga Visconti JC, Anemana S, et al. Mannose-binding lectin variant associated with severe malaria in young African children. *Microb Infect* 2008; 10: 342-48.
16. Verrelli BC, McDonald JH, Argyropoulos G, Destro-Bisol G, Froment A, Drousiotou A, et al. Evidence for balancing selection from nucleotide sequence analyses of human G6PD. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 1112-28.
17. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 564-94.
18. Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, et al. Nitric oxide synthase2 (Lambarene) (G- 954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis* 2001; 184: 330-36.
19. Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, Alexander ND, Kortok M, Snow R, et al. Sickle cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. *J Infect Dis* 2005; 192: 178-86.
20. BottiniFG, Falsi AM, Mortera J, Bottini E. The relations between G-6-PD deficiency, thalassemia and malaria. Further analysis of data from sardinia and the Povalley. *Cell Mol J* 1980; 36: 541-43.
21. Flori L, Delahaye NF, Iraqi FA, Hernandez-valladare M, Fumoux F, Rihet P. TNF as a malaria candidate gene: polymorphism-screening and family-based association analysis of mild malaria attack and parasitemia in Burkina Faso. *Gen Immun* 2005; 6: 472-80.
22. Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK, et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malaria J* 2008; 10: 2875-77.
23. Flori L, Sawadogo S, Esnault Ch, Delahaye NF, Fumoux F, Rihet P. Linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in families living in borkinafaso. *Hum Mol Genet* 2002; 12: 4.
24. Zimmerman PA, Guderian RH, Nutman TB.. A new TNFA promoter allele identified in south American Blacks. *Immunogenetics* 1996; 44: 485-86.
25. Park KS, Kim MY, Mok JW. NcoI restriction fragment length polymorphism at -308 of the tumor necrosis factor alpha promoter region in Korean. *Jpn J Human Genet* 1997; 42: 241-47.
26. Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005; 434: 214-17.
27. Parikh S, Dorsey G, Rosenthal P. Host polymorphisms and the incidence of Malaria in Ugandan children. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 750-53.
28. Wattavidanage J, Carter R, Perera KLRL, Munasingha A, Bandara S, McGuinness D, et al. TNFa2 marks high risk of severe disease during *Plasmodium falciparum* malaria and other infections in Sri Lankans. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 350-55.