Study of some molecular parameter for genetic variation of TNF-α and IL-2 to vitiligo patients in karbalaa Holy province

دراسة بعض المعايير الجزيئية للتغاير الجيني لـ TNF-α و IL-2 لمرضى البهاق في محافظة كربلاء المقدسة

علياء عزيز جبير د.هيام عبد الرضا كريم العواد د.علي حمود السعدي احسان خضير الطالقاني
جـــامعة كربـــلاء

*مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الأول

المستخلص

هدفت هذه الدراسة لتسليط الضوء على مرض البهاق واجراء دراسة مناعية وراثية ومعرفة التغير في مستويات بعض المتغيرات المناعية وبعض الهرمونات وبعض الجينات بطرق وراثية مختلفة لدى المصابين بمرض البهاق وكذلك معرفة العلاقة بين تلك المعايير ومدى تاثرها بتلك الجينات قيد الدراسة ، وقد تضمنت الدراسة الحالية 50 شخصا من مرضى البهاق ، فضلا عن 50 شخصا (أصحاء ظاهريا) بوصفهم مجموعة سيطرة للدراسة إذ تم جمع تلك العينات من مستشفى الحسيني التعليمي في محافظة كربلاء (وحدة الاستشارة الجلدية) خلال الفترة الزمنية من أيار 2015 ولغاية كانون الاول 2015.

اوضحت النتائج ان الوزن الجزيئي لجين *IL-2RA* هو 180pb بعد أستخدام تقنية البلمرة المتدرجة لدرجات حرارية مختلفة لتحديد درجة الحرارة المثلى لتضخيم القطع الهدف لجين IL-2RA اذ تراوحت درجات الحرارة مابين (55-61) درجة مئوية لخطوة الأستطالة anneling step فقد وجد ان أنسب درجة حرارة لتضخيم القطع هي 61 درجة مئوية مع أستخدام DNA Ladder كمؤشر أثناء الترحيل على هلام الأكاروز بتركيز 0.6 وعلى فولتية قدرها 70 فولت ولمدة ساعة كاملة . كما تبين ان النمط B هو الاكثر تردد مقارنة مع النمط A لكن كان تردده في المرضى اقل من مجموعة السيطرة بشكل معنوي بأستخدام تقنية RFLP-PCR Restriction Fragment Length Polymorphism. تم تضخيم قطع النيوكليوتيد لجين *TNF-α (308)* اذ بلغ وزنه الجزيئي (1000-100)pb باستخدام تقنية Amplification Refectory Mutation System ARMS-PCR ومن خلال استخدام تقنيةStudy with single strand conformation polymorphism SSCP-PCR وبعد الترحيل على وسط الاكريلمايد تم الحصول على النتائج اذ تبين ان نمط CC والذي يمثل الثلاث حزم هو الاكثر تردد في مرضى البهاق بينما كان النمط AA الذي يمثل الاربع حزم هو الاقل تردد لدى المرضى.

Abstract

This study aimed to shed light on vitiligo and conducting genetic immunological examination and knowledge of the change in the levels of certain immune variables and certain hormones and certain genes different genetic ways in people with vitiligo, as well as knowledge of the relationship between those standards and the extent of vulnerability of those genes under study, and the current study included 50 people from vitiligo patients, as well as 50 people (apparently healthy) as the control group for the study, as were collected those samples from the Husseini Teaching Hospital in the city of Karbala (unit skin counseling) during the time period from May 2015 until December 2015.

The results showed that the molecular weight of the gene IL-2RA is 180pb after using polymerase progressive degrees thermal different to determine the optimum temperature to inflate cutting target gene IL-2RA technology ranging temperatures between (61-55) C° to step elongation anneling step it has been found that the most appropriate temperature to amplify the pieces are 61 C° with the use of DNA Ladder as an indicator during the migration on gel Alokaros concentration of 0.6 and a voltage of 70 volts and a full hour. As it turns out that type B is the most frequency compared with type A but was blasted in patients less than the control group in a moral using RFLP-PCR Restriction Fragment Length Polymorphism technology. Been magnified cut nucleotide gene (308) TNF-α reaching molecular weight (1000-100) pb using Amplification Refectory technology Mutation System ARMS-PCR and through the use of technology Study with single strand conformation polymorphism SSCP-PCR and after migration to central Akrlmaid was obtained results it is found that the pattern BB, which represents the

three packages is the most frequency in patients with vitiligo while AA style that represents the four packages is the lowest frequency in patients

المقدمة Introduction

مرض البهاق هو مرض مناعي يتصف بفقدان وغياب الخلايا الصبغية بشكل متدرج واشارت العديد من الدراسات والابحاث الى الدور المناعة الذاتية في ظهوره (1) اذ بين البعض دور الاجسام المضادة للخلايا المناعية والبعض اشار الى دور الخلايا المناعية مما يدل على دور الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية في ظهور المرض وتطوره (2) . ان المشاهدات عن دور المناعة في ظهور المرض قاد العديد من الباحثين الى تفسير تلك الاسباب المناعية وارجاعها الى اسباب اخرى مرتبطة مع حدوث المرض اذ خطورة الاستجابة المناعية والمناعة الالتهابية مرتبطة الى التداخل بين العوامل البيئية وبعض التغايرات الحاصلة في الجينات المتخصصة والمسؤولة عن تعبير تلك المكونات المناعية وقد كشف من خلال الكثير من الدراسات الوراثية وبأستخدام تقنيات وراثية مختلفة عن وجود تغايرات وطفرات وراثية في العديد من تلك الجينات المسؤولة عن انتاج المكونات المناعية (3). اوضح (1) عن وجود تغاير وراثي في بعض المواقع (Locus) على الكروموسوم 17 لمرضى البهاق هذه المواقع مسؤولة عن تعبير مجموعة من الجزيئات البروتينية على الخلايا الاحادية (Mononuclar cells) في الدم والخلايا التائية Tcells والخلايا الحبيبية (Granulocytes) والخلايا الميلانية (Melanocytes) زيادة التعبير الجيني لتلك الجزيئات البروتينية على تلك الخلايا مسؤولة عن حدوث الموت المبرمج للخلايا بما فيها الخلايا الميلانية. فقد اشار (4) الى ان عامل TNF-α يلعب دورا اساسيا في الامراضية للعديد من الامراض المناعية منها مرض البهاق كأستجابة مناعية غير طبيعية ضد الخلايا الميلانية للجلد لمرضى البهاق اذ لوحظ ان TNF-α يمتلك مستويات عالية في المصل وقرح البهاق الظاهرة في الجلد والتي ظهرت بشكل فاقد للتصبغ اذ يلعب التغاير الوراثي لمنطقة المشغل (Promoter region) للجينات المسؤولة عن تشفير TNF-α دورا هاما في تنظيم التعبير الجيني لاطلاق هذا العامل كما وجد ان هذا التغايير الجيني في منطقة المشغل مرتبطة الى زيادة الترجمة والتعبير الجيني لعامل TNF-α وزيادة مستوياته لمرضى البهاق هذا الارتفاع يؤدي الى زيادة تقدم المرض وظهور البقع على الجلد نظرا للدور الذي يقوم به من حدوث الموت الخلوي للخلايا الميلانية. يتميز البهاق بكونه يمتلك عدة مواضع جينية حساسة وغير متجانسة وراثيا وتلك الجينات قد تشترك مع الجينات المرتبطة بالبناء الحيوي لصبغة الميلانين وكذلك النظام المضاد للأكسدة وتنظيم المناعة الذاتية (5). وتشير الدراسات الحديثة إلى أن العوامل الوراثية قد تلعب دورا رئيسيا في التسبب في مرض البهاق وذلك لأن هذا المرض مرتبط بتضرر عدد من الجينات المسؤولة عن ظهوره (6) . وهناك العديد من الجينات المرشحة المسببة لهذا المرض بما في ذلك *MHC*و *ACE* و *CAT* و *CTLA4* و *COMT* و *ESR* و *MBL2* و *PTPN22* و *HLA* و *NALP1* و *XBP1* و *FOXP1* و *TNF-α* و *IL-2RA* التي تشارك في تنظيم المناعة والتي تترافق مع مرض البهاق (7)

طرائق العمل Methods:

تم تحديد نوع الدراسة وهي دراسة حالات مرضية مقارنة بالسيطرة (Case control study) وشملت عينات الدراسة (50) شخص مصاب بمرض البهاق جمعت من الاستشارية الجلدية في مستشفى الحسين التعليمي في محافظة كربلاء خلال المدة الزمنية من شهر آيار 2015 ولغاية شهر كانون الاول 2015، إذ شملت مجموعة المرضى (50) مريضا مؤلفا من الذكور(42) والاناث (8) اضافة الى مجموعة السيطرة المؤلفة من (50) من الأشخاص الأصحاء ظاهريا مع ملاحظة خلوهم من أية أعراض مرضية اعتماداً على التشخيص السريري وسيرة حياتهم الصحية مع الأخذ بالحسبان التقارب في الفئات العمرية والجنس وقد تم جمع المعلومات من المرضى والتي شملت (العمر، الجنس ، التدخين ، التأريخ العائلي، صلة القرابة بين الوالدين، الاجتماعية للمريض واخيرا مدة الاصابة بالمرض) كما تم استبعاد بعض الحالات المرضية مثل مصابي الصدفية وذلك بسبب حدوث تداخل بين المرضين وظهور تأثير ذلك على المعايير المناعية والهرمونية . تم سحب 5 مل من عينة الدم بواسطة محقنه طبية من الدم الوريدي venous vein للأشخاص قيد الدراسة بعد تطهير الجلد بالكحول بنسبة 70% ثم قسمت عينات الدم الى قسمين 2 مل حفظت في انابيب EDTA tubes لغرض الدراسات الوراثية والقسم الاخر بمقدار 3 مل حفظت في انابيب gel لغرض الدراسات المناعية ، إذ تركت لمدة 1-2 ساعة تحت درجة حرارة الغرفة لغرض التخثر التام وحدوث التجلط أو الخثرة clot وتم فصل المصل باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة (3000 دورة لمدة 5 دقائق) ثم جمعت امصال وعينات الدم في أنابيب ابندروف بلاستيكية نظيفة ومعقمة وحفظ في الثلاجة بدرجة (10-)م^0 لحين الاستخدام. حفظت عينات الدم blood تحت درجة حرارة-) (10 م^0 لغرض الاختبارات الوراثية (8).

* تم تحليل النتائج إحصائيا ومقارنة المتوسطات باستعمال اختبار باتجاه واحدtest one way (A.N.O.V) وكذلك اختبار أقل فرق معنوي Least Significant Difference L.S.D. على مستوي احتمال 0.05 ،اختبار T –test ومعامل Person (9) .

دراسة التغايرات الوراثية لجينات الحركي الخلوي الثاني IL-2 وعامل التنخر الورمي TNF-α:

اجري تحديد الجينات الوراثية الخاصة بمرض البهاق كما تم تحديد البوادئ لغرض أجراء الكشف الجزيئي على الطفرات المدروسة وكما موضح في الجدول رقم (1) لغرض أجراء الكشف الجزيئي على الطفرات المدروسة (10) و (11) تم تجهيز جميع البوادئ من شركة (Bioneer).

جدول رقم (1) البوادئ التي تم استخدامها في الدراسة

اسم الجين	التتابع
IL2RA (rs1570538) forward	5-TCATGTGACATCTGGAGGGTTA-3
IL2RA Reverse	5-AAAATGAATTTCGTCAATTCGAG-3
TNF-α Forward	184 bp 5'-TCT CGG TTT CTT CTC CAT CG-3
TNF-α Reverse 1 G allele	5'-ATA GGT TTT GAG GGG CAT GG-3
TNF-α Reverse 2 A allele	5'-AAT AGG TTT TGA GGG GCA TGA-3

دراسة التغاير الجيني لجين IL-2RA باستخدام تقنية التباين في اطوال قطع التقييد Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

جدول (2) المواد والتراكيز التي استخدمت في تقنية RFLP- PCR بدرجة حرارة 37 ولمدة 15 دقيقة:

المادة	التركيز
Restriction Enzyme	1µl
1X NE Buffer	5 µl
DNA sample (PCR products)	10 µl
dH_2O	35 µl
Total Rnx Volume	50 µl
Incubation Temperature	$37C^0$
Incubation Time	15 min

*** دراسة التغاير الجيني بتقنية مسخ الشريط المفرد SSCP Study with singl strand conformation polymorphism technique**

استخدام صبغ هلام التحميل 95% الفورماميد، 20 مايكرون EDTA الرقم الهيدروجيني 8.0 ،0.05 ٪ برموفينول الأزرق ثم استخدام مادة هلامية غير ماسخة وهي بولي أكريلاميد لفصل الحمض النووي تغيير التشكل المقرر للـ DNA والناتج عن حدوث طفرة في التسلسل يمكن أن يسبب طفرة في الشريط المفرد للـ DNA والهجرة بشكل مختلف عن السيطرة ويمكن رؤية هذه الهجرة بشكل واضح على شكل بادئات .

1. اضيف 10 من PCR-product مع 10 مايكروليتر من صبغة 2X SSCP في انبوبة الخاصة بالـ microfuge tube pcr ثم الخلط جيدا.
2. وضعت الأنابيب في درجة حرارة 95 درجة مئوية في حمام حمام مائي ولمدة 7 دقائق ثم وضعت على الجليد لمدة حوالي 5 دقائق.
3. تحميل 10 ميكرولتر من العينات في الحفر من مادة الأكريلاميد اما ظروف الترحيل فهي مدونه في الجدول وبينت ادناه حسب المصدر (12) .

جدول (3) ظروف الترحيل

المادة	المواصفات
Buffer	1x TBE
Constant power	30 W
Buffer temperature	10°C
Run time	3.5 hours

جدول (4) مكونات الترحيل لتقنية SSCP-PCR

المادة	الحجم
40% acrylamide/bis (37.5:1)	8 ml
5x TBE	8 ml
100% glycerol	2.8 ml
TEMED	40µl
10% ammonium persulfate	400 µl
dH_2O	20.8 Ml

النتائج والمناقشة Results and Discussion

1. استخلاص الـ DNA الكرموسومي من الدم

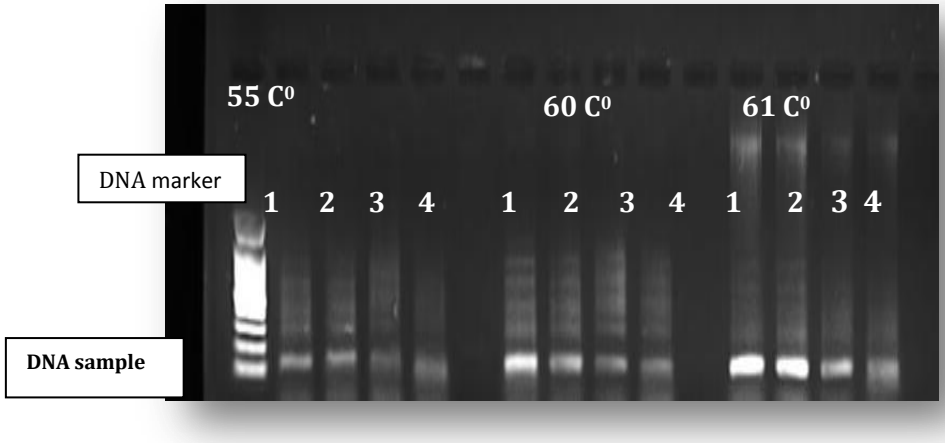
تم استخلاص الـ DNA من عينات الدم المدروسة والتي بلغت 50 مجموعة تجريبية و50 عينة مثلت مجموعة السيطرة، وتم أجراء الترحيل الكهربائي للتأكد من وجود حزم الـ DNA الكرموسومي على وسط هلام الاكاروز بتركيز 0.1 وعند فولتية 70 لمدة نصف ساعة وتمت مشاهدتها تحت جهاز الاشعة فوق البنفسجية بعد صبغها بالاثيديوم بروماید ، إذ أظهرت النتائج وجود حزم الـ DNA الكرموسومي في جميع العينات المدروسة للمجموعة التجريبية ومجموعة السيطرة كما في الشكل (1) و(2) وحسب خطوات شركة Favorgen Biotech .

شكل (1) استخلاص DNA من لعينات المرضى على هلام الاكاروز بتركيز 1% وعند فولتية 70 ولمدة نصف ساعة

شكل (2) استخلاص DNA من لعينات المرضى السيطرة هلام الاكاروز بتركيز 1% وعند فولتية 70 ولمدة نصف ساعة

تحديد درجة حرارة الانصهار والظروف المثالية لجين IL-2RA بتقنية التدرج البلمرة المتدرجة PCR-Gradient

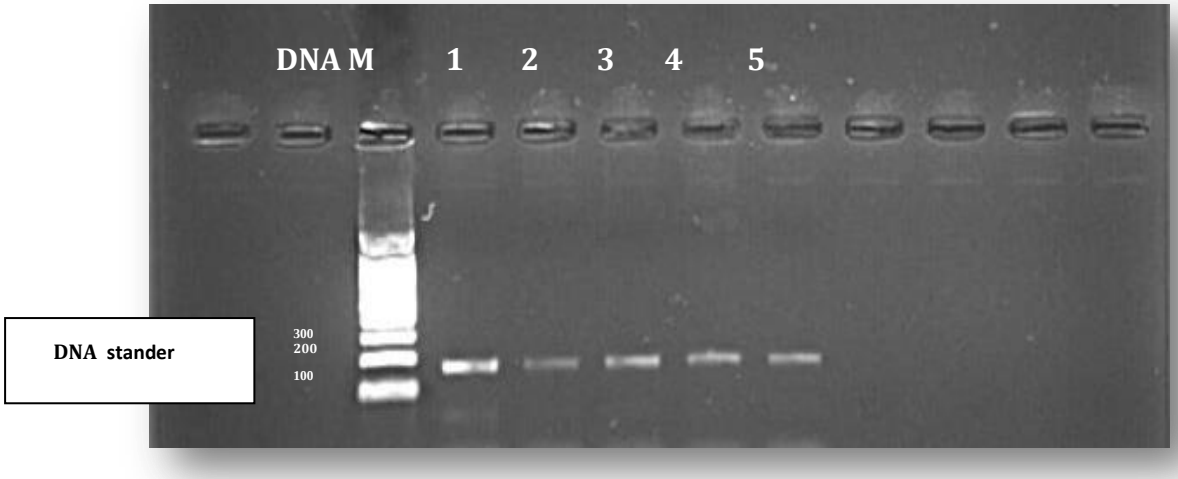
بعد استخدام تقنية البلمرة المتدرجة لدرجات حرارية مختلفة لتحديد درجة الحرارة المثلى لتضخيم القطع الهدف لجين IL-2RA فقد توصل نتائج البحث الى ان درجات الحرارة تراوحت مابين (55-61) درجة مئوية لخطوة الاستطالة anneling step فقد وجد ان انسب درجة حرارة لتضخيم القطع هي 61 درجة مئوية مع استخدام قطعة DNA القياسية DNA Marker كمؤشر اثناء الترحيل على جل الاكاروز بتركيز 0.6 وعلى فولتية قدرها 70 فولت ولمدة ساعة كاملة وقد ظهرت نتائج البلمرة كما في الشكل التالي :



شكل (3) البلمرة المتدرجة للجين IL-2RA gen with PCR- gradient على هلام الاكاروز بتركيز 0.1 وعند مستوى فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة وm يرمز لقطعة DNA القياسية

لوحظت نواتج بلمرة جين IL-2RA بتقنية PCR وتحديد الوزن الجزيئي تم تضخيم قطع النيوكليوتيد لجين IL-2RA عند درجة حرارة 61 في خطوة الاستطالة والتي تم تحديدها مسبقا بتقنية التدرج وباستخدام جهاز Thermo cycler PCR وتحت ظروف معينة اذ تم استخدام DNA بتركيز 2.5 µl اذ تم الحصول على قطع النيوكليوتيدات والتي ظهرت بعد الترحيل على جل الاكاروز بتركيز 0.6 وبفولتية 70 ولمدة ساعة كاملة اذ تم مشاهدات القطع بشكل واضح جميع العينات المدروسة تقريبا (المجموعة التجريبية وجموعة السيطرة) وبعد المقارنة مع DNA Marker القياسي وجد ان الوزن الجزيئي للبادئة الواحد لجين IL-2RA قد 180 pb وكما هو موضح في شكل للمجموعة التجريبية (4) ومجموعة السيطرة (5) :

شكل (4) نواتج عملية البلمرة IL-2RA gene PCR- product للمرضى الترحيل على هلام الاكاروز بتركيز 0.6 وعند فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة



شكل (5) نواتج عملية البلمرة IL-2RA gene PCR- product للسيطرة الترحيل على هلام الاكاروز بتركيز 0.6 وعند فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة

تم الكشف عن التغاير الوراثي لجين IL-2RA وتردده بتقنية تحديد التغاير الوراثي لقطع النكليوتيد باستخدام الانزيم القاطع (IL-2RA genotype polymorphisim with RFLP-PCR) اذ تم الحصول على نتائج التضخيم من تقنية IL-2RA genotype with RFLP-PCR وقد تبين ان الوزن الجزيئي لجين IL-2RA هو 180pb كما في شكل (6) و(7) اما نتائج التغايير الجيني فقد ظهرت ان نمط BB هو الاكثر عدد ونسبة اذ بلغ عدده ونسبته لدى المرضى 37(74%) في حين بلغ عدده ونسبته لدى السيطرة 31(62%) في حين عدد ونسبة النمط AB هو الاقل اذ بلغ لدى المرضى 13(26%) ولدى السيطرة 18(36%) هذا وقد كانت قيمة مربع كاي للنمط BB 39.417 عند مستوى احتمالية (0.0001) بينما كانت قيمة Odds (4.643) اما قيمة مربع كاي للنمط AB هي 6.729 عند مستوى احتمالية 0.0095 وبلغ قيمة Odds 987.411 اما فترة الثقة فقد تراوحت بين 10.884- 1.198 اما مربع كاي للنمط AB فقد بلغت 6.729 عند مستوى احتمالية (0.0095) اما قيمة Odds فقد كانت 987.411 بينما تراوحت فترة الثقة بين 0.880 – 3.347 كما تبين النتائج الظاهرة في جدول اعلاه ان النمط B هو الاكثر تردد اذ بلغ لدى المرضى 0.89 مقارنة مع النمط A (0.15) كما في جدول (5) :

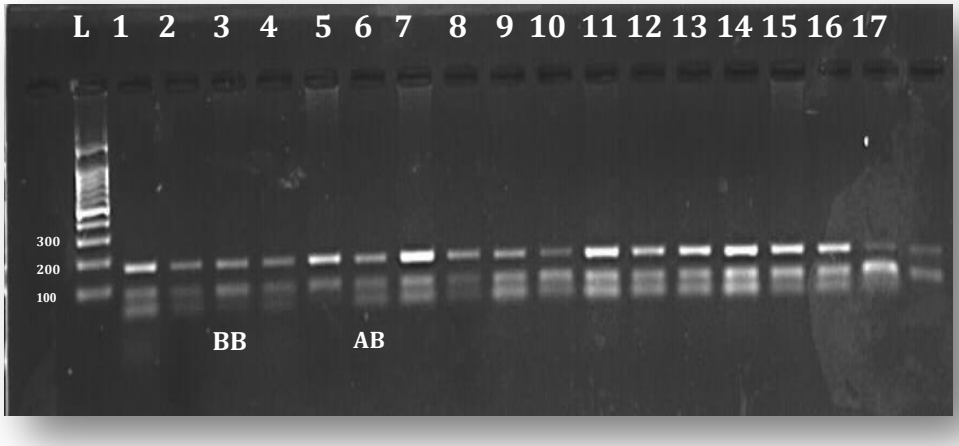
جدول (5) التغايير الجيني لجين IL-RA بأستخدام تقنية PCR- RFLP

C.I 95%	Odds ratio	P vale	X^2	المجموعات		IL-RA genotypes
				السيطرة(%)	المرضى(%)	
3.347 – 0.880	987.411	*0.0095	6.729	(%36)18	(%26)13	AB
1.198 -10.884	4.643	*0.0001	39.417	(%62)31	(%74)37	BB
مجموعة مقارنة				(%2)1	0	AA
Allelic frequency						
				0.67	0.15	A
				0.33	0.89	B

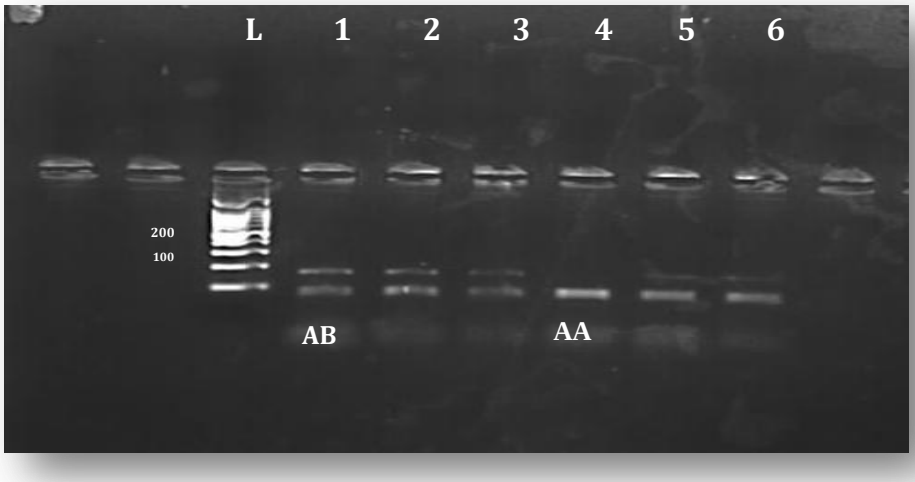
*. Correlation is significant at the 0.05 level

توصلت هذه الدراسة الى نتيجة ان الجين IL-2RA شديد الارتباط بمرض البهاق وهو احد اسباب حدوثه نظرا عن التغايير الوراثي الذي تم الكشف عنه بتقنية PCR-RFLP في الاليلات الخاصة بهذا المرض وقد تم التوصل الى نتيجة ان هذا الجين يمتلك ثلاث انماط مختلفة ويمتلك اليلين متغايرين ووجد ان الاليل B هو الاكثر تردد ضمن مجموعة المرضى الذين تم اختيارهم لذلك فقد عد هو الاليل المسؤول عن الامراضية اذ له العلاقة بأنتاج وتعبير IL-2 اتفقت هذه النتائج مع (13) اذ تناول هذه الدراسات نفس التتابع قيد الدراسة وقد برهنت هذه الدراسات ان جين *IL-2RA* gene قليل الارتباط والتأثير عن الاصابة بمرض السكري وتصلب الشرايين لكنه شديد الارتباط مع امراض مناعية اخرى مثل البهاق اذ عد هذا الجين هو احد الجينات الخطيرة والمسؤلة عن مجموعة من الامراض المناعية ومنها مرض البهاق ومرض اديسون. يتميز جين IL-2RA هو من الجينات شديدة الالفة والارتباط مع الجهاز المناعي والاستجابة المناعية كما يعد هذا الجين من الجينات الحساسة (Susceptible gene) والذي يرتبط بالامراضية بالعديد من الامراض المناعية مثل مرض السكري (نوع اول) المناعي (Diabetus mellitus type-1-) ومرض تصلب الشرايين Atrio sclerosis ومرض التيفوئيد Typhoide ومرض الذئبة الحمراء (Systematic lupus thematus) وكذلك مرض البهاق (Vitilgo) ويعد جين *IL-2RA* gene بالنسبة الى مرض البهاق من الجينات المرتبطة candidat gene اذ وهو احد الاسباب المرتبطة بالامراضية (14) .

نظرا لارتباط الجين بمجموعة من الامراض المناعية لذلك فقد اقترح ان هذا الجينات هو احد الجينات المشتركة share gene التي تشترك في مسارات حيوية مختلفة لحدوث مجموعة من الامراض وهذه الاقتراحات تدعم بواسطة مجموعة من البحوث التي تقوم على اساس وجود جينات ترتبط بامراضية اكثر من مرض مناعي (13). تناولت البحوث دراسة جين *IL-2RA* gene وقد حددت مجموعة من المناطق SNPs لدراسة التغايير الوراثي واحدة من تلك المناطق هي (rs1570538) الواقعة على جين *IL-2RA* gene وجد ان هذه المنطقة تمتلك تتابع متغايير من النيكليوتيدات لدى مرضى البهاق والسكر نوع اول ومرضى تصلب الشرايين المناعي اذ تم تضخيم ذللك التتابع باستخدام تقنية PCR وبطريقة PCR-RLP من خلال استخدام الانزيم القاطع (MWIO enzyme) هذا الانزيم له القدرة على حدوث القطع تحت ظروف معينة ، اذ وجد ان التتابع (rs1570538) يقع عند منطقة 3-Untranslated region (3-UTR) لجين *IL-2RA* gene (15) .اشار (16) ان خطورة التغايير في جين *IL-2RA* gene تكمن في كونه المسؤول عن زيادة التعبير الجيني للحركي الخلوي الثاني IL-2 ومستقبلاته في المصل والانسجة وبما انه عامل التهابي فله تأثير كبير على تطور المرض وكذلك يمتلك هذا السايتوكين تأثير على الاستجابة المناعية لأنه عامل نمو ومنشط للخلايا التائية لبعض المكونات المناعية الاخرى مثل تمايز الخلايا التائية T-cells Proliferation وتنظيم عمل الخلايا المساعدة نوع اول Th-1 regulation .



شكل (6)IL-2RA pcr- RFLP للمرضى على هلام الاكاروز بتركيز 0.2 وعند فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة



شكل (7)IL-2RA pcr- RFLP للسيطرة على هلام الاكاروز بتركيز 0.2 وعند فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة

تم الكشف عن التغاير الوراثي لجين TNF-α بتقنية تبدلات الشريط المفرد ذات التغاير الوراثي TNF-α genotype polymorphisim with SSCP-PCR اذ تم الحصول على النتائج الظاهرة في جدول اذ تبين ان نمط CC والذي يمثل الثلاث حزم هو الاكثر تردد في مرضى البهاق اذ بلغ 30(60%) مقارنة مع مجموعة الاصحاء والتي بلغ لديها 35(70%) بينما كان النمط AA الذي يمثل الاربع حزم هو الاقل تردد اذ بلغ لدى المرضى 20 (40%) ولدى مجموعة السيطرة 15 (30%) هذا وقد سجل مربع كاي قيمة (1.099) وتحت مستوى احتمالية (0.295) بينما كانت قيمة Odds (1.555) وتحت مستوى ثقة تراوح بين اعلى وادنى قيمة (3. 561 – 0. 679) كما في جدول (6)

جدول (6) التغايير الجيني لجين TNF-α SSCP بأستخدام تقنية PCR- SSCP

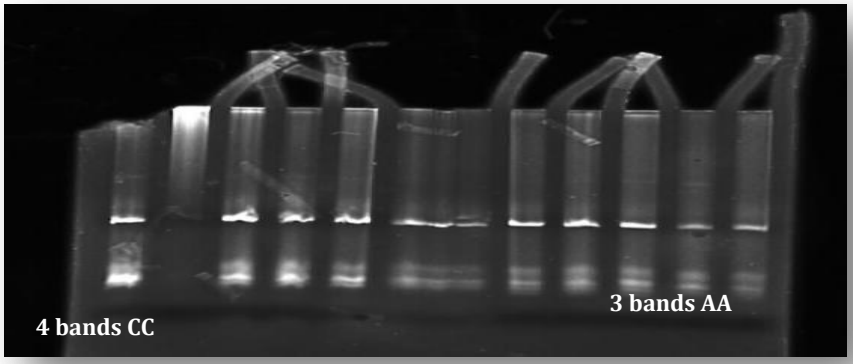
TNF-α Pattern	المجموعة		X^2	P-value	Odds ratio	C.I 95%
	المرضى(%)	السيطرة(%)				
3 bands (A)	(%60)30	(%70)35	1.099	0.295	1.555	3. 561 – 0. 679
4 bands (B)	(%40) 20	15(%30)				

*. Correlation is significant at the 0.05 level

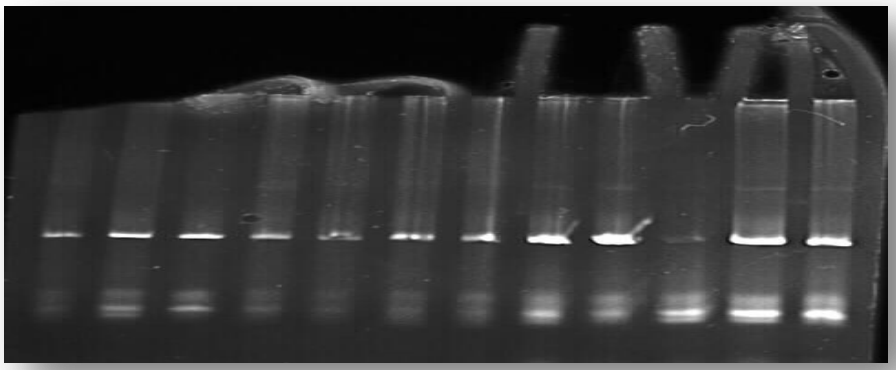
تشير النتائج في الجدول اعلاه ان النمط A (عدد الاحزمة 3) هو الاكثر تردد مقارنة مع النمط B (عدد الاحزمة 4) لكن تردده في المرضى اقل من مجموعة السيطرة .تم دراسة جين TNF-α كونه من الجينات المهمة ووثيقة الصلة بمرض البهاق وقد تم التوصل من خلال نتائج البحث التي تم الحصول عليها لدراسة التغايير الجيني لجين *TNF-α* gene من خلال استخدام طريقتين عبر تقنية PCR وهي طريقة (PCR-ARMS) وطريقة (PCR-SSCP) ومن خلال كلا التقنيتين تم الكشف عن وجد تغايير جيني في الاليلات التابعة لجين *TNF-α* gene ففي تقنية PCR-ARMS وجد ان نمط AG هو الاكثر وفرة وبشكل معنوي لدى مرضى البهاق مقارنة مع السيطرة كما وجد ان اليل A هو الاكثر تردد في المجتمع قيد الدراسة مقارنة مع الاليل G .

اما استخدام التقنية الاخرى وهي تقنية PCR-SSCP وهي التقنية الاكثر دقة اذ بينت تباين في عدد الاحزمة الظاهرة وهذا التبايين يكشف عن التغايير الوراثي لجين *TNF-α* gene لمرضى البهاق . اتفقت هذه النتائج مع توصل اليه (17) من خلال دراسته على التغايير الوراثي لجين لمرضى البهاق في السعودية TNF-α وقد كشف عن وجود تغايير وراثي لهذا الجين وبين ان النمط AG هو الاكثر سيادة وهوالمسؤول عن امراضية مرض البهاق ، بينما اشار (18) في نتائجه ان جين *TNF-α* gene له تأثير غير معنوي على المرض . يعد مرض البهاق مرض جلدي مكتسب ويتصف بكونه يعتمد على مجموعة من الجينات الحساسة المختلفة (Susceptible loci and genetic) وعلى الرغم من عدم تحديد الاسباب وراء حدوثة بشكل دقيق لحد الان لكن تم اقتراح ان واحد من الاسباب التي تكمن وراء حدوثه هو ارتفاع مستويات عامل التنخر الورمي الذي يسبب الموت المبرمج للخلايا الميلانية لذلك تم دراسة الجينات المتعلقة بالتعبير الجيني وزيادة انتاج عامل التنخر الورمي TNF-α لمعرفة التغايير الوراثي لهذا الجين ومقارنته بين المرضى والاصحاء وباستخدام تقنيات وراثية متنوعة (17).

كشفت الدراسات الوراثية مؤخرا عن تفسير امراضية البهاق من الناحية الوراثية من خلال وجود تغايرات في تتابع النيوكليوتيدات في بعضرالمواقع الحساسة (Susceptible loci) لجين *TNF-α* gene هذه التغايرات مسؤلة عن تغيير الاستجابة المناعية للجهاز المناعي النوعي والمتكيف في الجلد هذه الاستجابة تثير استجابة مناعية ضد الخلايا الميلانية تتولد من هذه الاستجابات المناعية التهابات تنتهي بفقدان الخلايا الميلانية وفقدان التصبغ في الجلد (18) ان احد السايتوكينات المتأثرة بهذه الاستجابة هوTNF-α اذ ترتفع مستوياته بشكل كبير والذي يلعب دورا هاما في ازالة التصبغ وظهور مرض البهاق (19). ابرز (18) الدور الهام لعامل التنخر الورمي ودوره في حدوث الامراضية وفقدات التصبغ للخلايا الميلانية ،في حين اشار (20) الى ان الجين المسيطر على اطلاق عامل التنخر الورمي يقع ضمن منطقة (Major histacompatibility) ضمن الكروموسوم السادس ويعد هذا الجين وثيق الارتباط من الناحية الوظيفية بجينات اخرى وهي جينات *HLA* gene بصنفيها الاول *HLA-1* gene والثاني *HLA-2* gene ، كما بين وجود تغايرات في ذلك التتابع ضمن منطقة المشغل (rs1800629) 308 promoter . يعد هذا الموقع شديد التاثر والالفة للارتباط مع عامل الترجمة المحفز للبروتين الثاني (21) . هذا التغاير يؤدي الى ابراز الاليل A اكثر من الاليل الاخر G كما يؤدي الى زيادة الاطلاق لعامل التنخر الورمي وزيادة مستوياته في المصل وهذه الزيادة ترتبط معها امراضية العديد من الالتهابات والامراض المناعية الاخرى (22). توصل (17) الى ان النمط AG هو عامل خطورة شديد ارتباط والتأثير على مرض البهاق مقارنة مع النمط AA و GG كما يعد اليل A هو الاكثر والاليل المحفز للمرض اما الاليل G هو المقاوم للمرض كما برهن ان الاليل A هو الاكثر تعبيرا لعامل التنخر الورمي مقارنة مع اللاليل G لذلك فأن الخطورة تكمن في هذا الاليل لحدوث البهاق وحدوث امراض مناعية اخرى.



شكل (8) TNF-α(308) gen with PCR-SSCP لمجموعة المرضى الترحيل لمدة ساعتين على وسط الاكرليمايد عند مستوى فولتية 70



شكل (8)(9) TNF-α(308) gen with PCR-SSCP لمجموعة السيطرة الترحيل لمدة ساعتين على وسط الاكرليمايد عند مستوى فولتية 70

المصادر

1- Deo, S.S ; Bahgat, A.R. and Shah R.N. (2011). Genetic variation in NALP1 MRNA expression in human vitiligo . *Indian J. Dermatology* . 56(3):266-271.

2-Van- den ,J.G. ; Konijnenberg ,D. Dellemijn , T.A. and Bos , J.D. (2009). Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients .*J. invest Dermatol* .129-32.

3- Jin , Y. ; Mailloux , C.M. ;Gowan , K. and Riccardi , S.L. (2007). NALP1 in vitiligo-association multiple autoimmune disease . Engl J. Med .356:1216-25.

4- Laddha, N.C.; Dwivedi, M. Mansuri, M. S. ; Amina R. ; Ansarullah G.; Ramachandran, A. V. ; Dalai, S. & Begum, R.(2013). Vitiligo : interplay between oxidative stress and immune system. *John Wiley & Sons A/S, Experimental Dermatology* . P. 1-5.

5- Spritz ,R A. (2008). Curr Dir Autoimmunity . 10: 244–257.

6- Birlea, S. A.; Ahmad, F. J. & Uddin, R. M. (2013). *J Invest Dermatol*. 10:1038-501.

7- Spritz R A. (2010). Genome Med. 2: 78.

8- Lewis, S.M. ; Bain, B.J. & Bates, I. (2001) . Dacie and Lewis practical hematology. 19th ed. *Churchill livingstone*. 1-5.

9-الراوي ، خاشع محمود و خلف الله عبد العزيز(1980) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل ، العراق .

10- Alcina, A.; Fedetz, M.; Ndagire, D.; ´ndez, O. F.; Leyva, L.; Guerrero, M.; Abad-Grau, M.M.; Arnal, C.; Delgado, C.; Lucas, M.; Izquierdo, G.& Matesanz, F.(2009). IL2RA/CD25 Gene Polymorphisms: Uneven Association with

11- Al-Harthi, F.; Zouman, A.; Arfin, M.; Tariq, M. & Al-Asmari, A. (2013). Tumor necrosis factor-α and -β genetic polymorphisms as a risk factor in Saudi patients with vitiligo. *Genetics and Molecular Research*. 12(3): 2196-2204 .

12- Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophories as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natd. Acad. Sci. USA. 86*: 2766-2770.

13- Lowe, C.E. ; Cooper, J.D. ; Brusko, T. ; Walker, N.M. ; Smyth, D.J. (2007). Largescale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet* 39: 1074–1082.
Leykon, J.F. ; Vays, P.G. (2000). The basis of endocrinology Trans. from English. *J. Medicine.* 504 .

14- Barcellos, L.F.; Kamdar, B.B.; Ramsay; P.P.; DeLoa, C.& Lincoln, R.R. (2006). Clustering of autoimmune diseases in families with a high-risk for multiple sclerosis: a descriptive study. *Lancet Neurol* . 5: 924–931.

15- Alcina, A.; Fedetz, M.; Ndagire, D.; ´ndez, O. F.; Leyva, L.; Guerrero, M.; Abad-Grau, M.M.; Arnal, C.; Delgado, C.; Lucas, M.; Izquierdo, G.& Matesanz, F.(2009). IL2RA/CD25 Gene Polymorphisms: Uneven Association with Multiple Sclerosis (MS) and Type 1 Diabetes (T1D) . *PLoS ONE* . 4 (1): 4137.

16- Murayama, A. ; Sakura, K. ; Nakama, M. ; Yasuzawa-Tanaka, K. & Fujita, E. (2006) . Specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. *EMBO J* .25: 1081–1092.

17- Al-Harthi, F.; Zouman, A.; Arfin, M.; Tariq, M. & Al-Asmari, A. (2013). Tumor necrosis factor-α and -β genetic polymorphisms as a risk factor in Saudi patients with vitiligo. *Genetics and Molecular Research*. 12(3): 2196-2204 .

18- Taieb, A. (2012). Vitiligo as an inflammatory skin disorder: a therapeutic perspective. *Pigment Cell Melanoma Res*. 25: 9-13.

19- Yazici, A.C. ; Erdal, M.E. ; Kaya, T.I. ; Ikizoglu, G. ;Savasolgu, K. ; Camdeviren, H. ; Tursen , U. (2006). Lack of association with TNF-α- 308 promoter polymorphisim in patients with vitiligo. *Arch Dermatol Rws.* 298: 46-49.

20- Sharma, R. ; Sharma, C.L. & Mahajan, A. (2008). Biological agents targeting beyond TNF-alpha. *Indian J. Crit. Care Med.*

21- Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, et al. (1996). Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factoralpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and it's influence on the regulation of TNF-alpha production. *Neurosci. Lett*. 215: 75-78.

22- Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, et al. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 3195-3199.