التعدد الشكلي للجين 590- *IL-4* (C>T) في الأطفال العراقيين المصابين بداء السكري- النوع الأول

احسان عرفان حسين حازمة موسى خليل انور عبد ناصر

جامعة بغداد- كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم/قسم علوم الحياة

الملخص

شملت الدراسة على 50 عينة دم مأخوذة من اطفال تراوح معدل اعمارهم من 7- 12 سنة، وشملت الدراسة على 35 عينة دم لأطفال مصابين بداء السكري- النوع الأول(Type 1 Diabetes Mellitus (T1D، إذ كان متوسط اعمارهم 9.4±0.34 سنة، كما شملت الدراسة على 15 عينة دم لأطفال اصحاء والتي اعتبرت كعينات قياسية وكان متوسط اعمارهم 10.9±0.38 سنة. درس التعدد الشكلي لجين (C>T) 590- *IL-4* المتضخم باستعمال تقانة نظام الممانعة للتضخيم Amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) قد اظهرت النتائج نسباً عالية من الأليل C في عينة المصابين بالمقارنة مع الأليل T وظهر الأليل C كأليل مسبب مرتبط مع خطر الأصابة بالمرض، بينما سجل الأليل T نسبة اعلى من الأليل C في العينة القياسية، وظهر الأليل T كأليل وقائي من المرض. اظهر النمطان الوراثيان TT وCT كنمطين وراثيين مرتبطين مع الجزء الوقائي من خطر الأصابة بداء السكري- النوع الأول وظهر النمط الوراثي CC كنمط وراثي مرتبط مع خطر الأصابة بداء السكري- النوع الأول.

الكلمات المفتاحية: الحركي الخلوي الرابع IL-4، داء السكري- النوع الأول، (C>T) 590- *IL-4*، T1D

المقدمة

داء السكري- النوع الأول هو مرض مناعي ذاتي مزمن Chronic ويظهر لدى الأطفال الحساسين بصورة وراثية للمرض بالإضافة إلى المحفزات البيئية (Belle *et al.*, 2011). فرط الكلوكوز المزمن يكون مرتبطاً مع المرض لأوقات طويلة ناتجاً عنه قصور وظيفي في عمل اعضاء الجسم (American Diabetes Association,

(2004. ان داء السكري- النوع الاول من الأمراض التأيضية ويتميز بفرط السكري Hyperglycemia لدى الأطفال، ويؤثر سنوياً على 4 مليون طفل من شعوب العالم، مع نسبة وفيات بلغت 1338 الف طفل سنوياً من مجموع 370733 طفل مصاباً بداء السكري- النوع الأول (Harjutsalo *et al.*, 2008). الدراسات الحديثة تبين ان 490100 الف طفل تحت عمر 15 سنة يصاب بداء السكري- النوع الأول سنوياً، مع اكثر من 77800 الف طفل تحت عمر 15 سنة يتوقع ان يتطور لديهم المرض، ويرتفع المرض بين الأطفال اليافعين ويزداد في البلدان الأوربية والبلدان الشرقية والعربية، ويتطور المرض بشكل كبير في هذه المناطق ويتوقع ارتفاع الأصابات لديهم إلى 3% سنوياً، ويكون اقل تطوراً في المناطق الأخرى (Guariguata, 2011). داء السكري- النوع الأول له ارتباط قوي مع جينات HLA-class-I and II من خلال ارتباطه مع مستضدات خلايا Th Lymphocyte، وخلايا Th1 تعمل على قتل خلايا بيتا المنتجة لهرمون الأنسولين في البنكرياس، والتي تتوسطها العديد من الحركيات الخلوية Cytokines (Notkins, 2002). تلعب الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب دوراً مهماً في حث أو تفاقم داء السكري- النوع الأول، وان الحماية من هذا المرض تكون مرتبطة مع الحركيات الخلوية المضادة للألتهاب والمنتجة من خلايا Th2 والتي تنتج وسائط حركية خلوية مهمة مثل الأنترلوكين الرابع (IL-4) Interleukin-4 والأنترلوكين العاشر (Pauza *et al.*, 1999 ; Phillips *et al.*, 2001 ; Interleukin-10 (IL-10) Sharif *et al.*, 2002). اكتشف الحركي الخلوي IL-4 لأول مرة في عام 1982م، ويملك حجماً جزيئياً 15 كيلو دالتون ويتكون من 129 حامضاً أمينياً. المصدر الرئيس IL-4 هو خلايا Th2، وكذلك ينتج بواسطة خلايا NK cells، الخلايا البدينة Mast cells، خلايا الحمضة Esinophils وخلايا القعدة Basophils، ويستهدف IL-4 العديد من خلايا T cells وخلايا B cells (Akdis *et al.*, 2011). ان دور تعبير جين IL-4 يكون بالحماية من تطور داء السكري- النوع الأول (Mi, *et al.*, 2004)، إذ يعمل الحركي الخلوي IL-4 على ثبيط المناعة الخلوية Cellular immunity، لذلك يمنع من تحطم خلايا بيتا في البنكرياس مناعياً (Bid *et al.*, 2008). تلعب ظاهرة التعدد الشكلي المظهري لجين IL-4 دوراً في تنظيم تعبير الحركيات الخلوية، كما أن له اهمية كجزء وقائي أو مسبب لداء السكري- النوع الأول، فعلى سبيل المثال ان استبدال القاعدة

النايتروجينية C بالقاعدة النايتروجينية T في الموقع 590- للجين *IL-4* يسبب اختزالاً في تعبير جين *IL-4*، بينما النمط الوراثي TT يزيد من تنظيم انتاج هذا الحركي الخلوي (Kamali-Sarvestani *et al.*, 2005). يظهر الطراز الوراثي CT ارتباطاً مع الجزء الوقائي من خطر وتطور داء السكري- النوع الأول (Javor *et al.*, 2010) ، ويظهر التعدد الشكلي المظهري لجين 590- *IL-4* في مرضى داء السكري- النوع الأول وجود ارتباط قوي في تكرار الأليل T مع زيادة في تطور وخطر الأصابة (Eerligh *et al.*, 2004)، وان الجين المسؤول عن تشفير الحركي الخلوي IL-4 يقع على الذراع الطويل للكروموسوم رقم 5 في الموقع 5q31 (Ryan *et al.*, 2005). تهدف هذه الدراسة إلى معرفة التعدد الشكلي المظهري لجين (C>T) 590- *IL-4* باستعمال نظام الممانعة للتضاعف بتقانة Amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) بعد عزل الدنا DNA من دم العينات المدروسة للأطفال العرب في بغداد.

المواد وطرائق العمل

جمع عينات دم المرضى المصابين بداء السكري-النوع الأول والعينة القياسية

شملت الدراسة على 50 عينة دم مأخوذة من اطفال تراوح معدل اعمارهم من 7-12 سنة، وشملت الدراسة على 35 عينة دم (18 ذكراً و17 من الأناث)، لأطفال مصابين بداء السكري- النوع الأول، إذ كان متوسط اعمارهم 9.4±0.34 سنة، كما شملت الدراسة على 15 عينة دم (9 ذكور و6 من الأناث) لأطفال اصحاء ظاهرياً والتي اعتبرت كعينات قياسية وكان متوسط اعمارهم 10.9±0.38 سنة. جمعت العينات من مستشفيات الطفل المركزي ومركز مرضى السكري في بغداد-العراق للفترة من تموز من عام 2014 ولغاية تشرين الأول من نفس العام. جمع الدم في انابيب خاصة بجمع الدم بحجم 2.5 مليلتر حاوية على EDTA كمانع لتخثر الدم والتي استعملت في استخلاص الدنا DNA، وشخصت العينات من قبل المختصين في وحدة السكري في مستشفى الطفل المركزي وفي مركز مرضى السكري. نظمت استمارة خاصة جمعت فيها معلومات عن الأطفال المرضى والأصحاء. اجريت دراسة وراثية على عينات الدم المأخوذة من الأطفال المصابين والأصحاء (العينة القياسية).

عدة استخلاص الدنا DNA من الأطفال المرضى والأصحاء

استعملت العدة ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System والخاصة بعزل الدنا DNA والمصنعة من قبل شركة Promega الأميريكية وبحسب النشرة المرفقة. عين تركيز ونقاوة الدنا باستعمال جهاز Nanodrop باستخراج نسبة A_{260}/A_{280} وكان التركيز 100 نانوغرام/مايكرولتر ونقاوة الدنا 1.74. حفظت العينات بعد ذلك تحت حرارة 20- ^{o}م لحين الأستعمال.

خليط تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR mix

استعمل الخليط Go Taq® Green Master Mix (2X) في تجارب نظام الممانعة للتضاعف بتقانةARMS-PCR، وبحسب النشرة المرفقة من قبل شركة Promega الأميركية.

البوادئ Primers

صنعت ثلاث من البوادئ الخاصة في شركة Alpha DNA الكندية وبحسب الطلب في الكشف عن جين 874+ (C>T) 592- *IL-4* وبحسب المصدر [Alsaid *et .al.*, 2013] البادئ Specific T تسلسله النيكلوتيدي هو 5′-ACACTAAACTTGGGAGAACATTGTT-3′ والبادئ Specific C تسلسله النيكلوتيدي هو 5`-ACACTAAACTTGGGAGAACATTGTC-3`، بينما البادئ Reverse تسلسله النيكلوتيدي هو -5`-GAATTTGTTAGTAATGCAGTCCTCC 3`. اذيبت جميع البوادئ في أعلاه باستعمال الماء الخالي من انزيم النيوكليز Nuclease-Free water وبحسب النشرة المرفقة من قبل الشركة المصنعة.

معلمات الوزن الجزيئي للدنا DNA molecular weight markers

استعمل المعلم الجزيئي Molecular marker المصنع من قبل شركة Promega بحجم كلي 1500 زوج قاعدة وبدرجات 100 زوج قاعدة.

الكشف عن جين (C>T) 590- *IL-4*

استعملت في هذه الدراسة تقانة ARMS-PCR في الكشف عن جين 590- *IL-4* (C>T). حضر الخليط الأساسي Master Mix للبوادئ المستعملة وبحسب طريقة (Alsaid *et al.*, 2013)مع بعض التحوير. استعمل Go Taq® Green Master Mix

المزود من شركة Promega الأميركية بحجم 12.5 مايكرولتر وبتركيز 1X والبادئ Primer بحجم 1 مايكرولتر وبتركيز 1 مايكرومولر ولكل بادئ وقالب الدنا DNA template بحجم 2 مايكرولتر وبتركيز 100 نانوغرام وكان الحجم الكلي للتفاعل 25 مايكرولتر. استعمل البادئان Specific T و Reverse في الكشف عن الأليل T والبادئان Reverse Specific C للكشف عن الأليل C. وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف التفاعل. مرحلة مسخ القالب الأول Denature template تحت درجة حرارة 96 ^{o}م ولمدة 1 دقيقة والمسخ الأبتدائي الأول First initial denaturation بدرجة حرارة 95 ^{o}م لمدة 15 ثانية والتحام البادئ الأول First annealing بدرجة حرارة 65 ^{o}م ولمدة 50 ثانية والأستطالة الأولى First extension بدرجة حرارة 72 ^{o}م لمدة 40 ثانية وكانت مراحل المسخ الأبتدائي والتحام البادئ والأستطالة الأولى كانت لــ 10 دورات. والمسخ الأبتدائي الثاني Second initial denaturation بدرجة حرارة 95 ^{o}م لمدة 50 ثانية والتحام البادئ الثاني Second annealing بدرجة حرارة 55 ^{o}م ولمدة 50 ثانية والأستطالة الثانية Second extension بدرجة حرارة 72 ^{o}م لمدة 50 ثانية وكانت مراحل المسخ الأبتدائي والتحام البادئ والأستطالة الثانية كانت لــ 20 دورة. الأستطالة النهائية Final extension بدرجة حرارة 72 ^{o}م لمدة 7 دقائق. حملت نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البوادئ أعلاه لعينات الدنا للأطفال المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية في المكان المخصص لها في هلام الآكاروز بتركيز 2.5% (حضر هلام الآكاروز بأذابة 1غرام من الآكاروز في 40 مليلتر من دارئ Tris-borate buffer (TBE) بتركيز 1X. سخن الخليط عند درجة حرارة 60 ^{o}م باستعمال الصفيحة الساخنة Hot plate وحتى ذوبان الخليط وصب في حوض الترحيل المخصص). حمل الواصم الجزيئي الوراثي بحسب النشرة المرفقة معه الذي كان بحجم 1500 زوج قاعدة. اضيفت صبغة التحميل البروموفينول الأزرق الخاصة بالترحيل الكهربائي Bromophenol blue في كل عينة بحجم 3 مايكرولتر (حضرت صبغة التحميل بأذابة 25 مليغرام من صبغة البروموفينول الأزرق في 6.7 مليلتر من الماء المقطر. اضيف 25 مليغرام من صبغة Xylene cyanol FF و3.3 مليلتر من الكليسرول Glycerol ليصبح الحجم النهائي 10 مليلتر. حفضت الصبغة تحت درجة –

20 م° لغرض الأستخدام الطويل الأمد). رحلت العينات كهربائياً من القطب الأسود السالب باتجاه القطب الأحمر الموجب تحت جهد كهربائي 75 فولتاً ولمدة من 3–4 ساعات وباستعمال دارئ Tris-borate buffer (TBE) (حضر 10X من هذا الدارئ لغرض استعماله في عملية الترحيل الكهربائي وذلك بأذابة 108 غرام من مادة Tris base و55 غرام من حامض البوريك Boric acid و40 مليليتر من مادة Ethelene diamine tetra acetic acid (EDTA) بتركيز 0.5 مولاري. اضيف الماء المقطر المعقم وصولاً إلى لتر واحد مع تعديل الأس الهايدروجيني pH إلى 8). صبغ هلام الآكاروز بصبغة الأثيديوم برومايد Ethidium bromide (EtBr) لمدة 15 دقيقة (حضرت صبغة الأيثديوم برومايد من المحلول الخزين للصبغة الذي يكون بتركيز 10 مليغرام/مليلتر وحضرت بأذابتها في الماء المقطر للحصول على تركيز 0.5 مايكروغرام/مليلتر). شوهدت وصورت قطع الدنا المتضخمة بواسطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

التحليلات الأحصائية

حللت البيانات باستعمال اختبار فشر Fisher's تحت مستوى احتمالية P<0.05. كما حللت تكرارات الأنماط الوراثية واليلاتها والنسبة الحرجة Odds ratio (OR) وفترة الثقة Confidence Intervals (CI) باستعمال البرنامج Compare 2 Ver.3.04 والمصنع من قبل J. H. Abramson عام 2003–2013، وحللت النتائج باستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium وبحسب البرنامج الموجود في الموقع الألكتروني www.had2know.com.

النتائج والمناقشة

التعدد الشكلي لجين الحركي الخلوي 4 Interleukin-4 (*IL-4*)

درس التعدد الشكلي الوراثي Genetic polymorphism لجين *IL-4* في المرضى المصابين بداء السكري النوع- الأول ومقارنتها بعينات الأصحاء (العينات القياسية) باستعمال تقانة ARMS-PCR. اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لجين - *IL-4* 590(C>T) المتضخم بهذه التقانة إلى وجود اليلين هما T وC وإلى وجود ثلاثة أنماط وراثية هي TT، CT وCC في عينة المصابين بداء السكري–النوع الأول والعينة القياسية، فعند ظهور حزمة واحدة في المجال T وعدم وجودها في المجال C فيكون

النمط الوراثي هو TT وفي حالة ظهور حزمة في المجال C وعدم ظهورها في المجال T فيكون النمط الوراثي CC وعند ظهور حزمتين في كلا المجالين T وC فيكون النمط الوراثي CT، وكما في الشكلين 1 و2، على التوالي. اظهرت نتائج التوزيع التكراري للأليلين T وC للجين 590- *IL-4* وباستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium نتائج متغايرة مابين عينة المصابين بداء السكري– النوع الأول والعينة القياسية، إذ سجل الأليل T نسبة 15.7% في عينة المصابين بالمقارنة مع الأليل C الذي سجل نسبة 84.3%، بينما سجل الأليل T نسبة 56.7% في العينة القياسية بالمقارنة مع الأليل T الذي سجل نسبة 43.3% كما في الشكل (3). كما يظهر الجدول (1) أن التوزيع التكراري قد اختلف معنوياً بين عينة المصابين والعينة القياسية، وتبين النتائج بأن الأليل C اظهر تكراراً معنوياً لدى المصابين بنسبة اعلى من العينة القياسية باستعمال اختبار فشر Fisher's test، وكانت النسبة الحرجة Odds ratio (OR) هي 7.01 مع فترة ثقة Confidence Intervals (CI) تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين 2.70–18.23، وكانت نسبته كأليل مسبب Etiological faction (EF) ومرتبط مع خطر الأصابة بالمرض بلغت 0.723، بينما اظهر الأليل T تكراراً معنوياً لدى العينة القياسية بنسبة اعلى من عينة المصابين باستعمال اختبار فشر Fisher's test، وكانت النسبة الحرجة Odds ratio هي 0.14 مع فترة ثقة Confidence Intervals تحت نسبة 95% وقيمة تراوحت بين 0.05–0.37، وكانت نسبته كأليل وقائي من المرض Preventive faction (PF) بلغت 0.486. تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليها كل من (Eerligh *et al.*, 2004 ; Javor *et al.*, 2010) من حيث حصولهم على نتائج متوافقة مع نتائج الدراسة الحالية والتي تظهر أن نسبة الأليل C كانت اعلى لدى المصابين بداء السكري بالمقارنة مع العينة القياسية، بينما اظهر الأليل T نسبة اعلى لدى العينة القياسية. ان التكرار العالي للأليل C وبشكل معنوي لدى المصابين يبين مدى الدور الكبير الذي يلعبه هذا الأليل في تطور داء السكري– النوع الأول، ويبين أيرليه وجماعته (Eerligh *et al.*, 2004)، ان الأليل C لجين *IL-4* يظهر اتحاد مع جينات خلايا Th2 في التعدد الشكلي المظهري ويرتبط مع داء السكري– النوع الأول بواسطة الأليلات المتعددة، بينما انخفاض التكرار في نسبة الأليل T لدى المصابين وارتفاعه لدى العينة القياسية يبين مدى اهمية هذا الأليل كعامل وقائي من خطر الأصابة بهذا المرض. ولا تتفق هذه النتائج مع

نتائج (Johromi, 2000) وذلك لعدم حصوله على اية نتائج معنوية في تكرار الأليل C والأليل T في عينات المصابين والعينات القياسية.

اظهرت نتائج التحليل الوراثي لنتائج تقانة ARMS-PCR للجين *IL-4* -590 (C>T)، وباستعمال قانون التوازن هاردي-واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium ثلاثة أنماط وراثية لدى عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية وهي TT، CT وCC. بينت النتائج وجود تباين في تكرار الأنماط الوراثية ما بين عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية، إذ أظهر النمط الوراثي TT نسبة بلغت 20.0% لدى العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول التي كانت نسبتها 0.0%، وكان هناك اختلاف معنوي، إذ بلغت قيمته 0.023 تحت مستوى احتمالية P<0.05 عند استعمال اختبار فشر Fisher's test، كما كانت قيمة النسبة الحرجة OR تساوي 0.05 ومدة الثقة CI كانت قيمتها بين 0.00–0.99، وتبين هذه النتائج دور النمط الوراثي TT كنمط وراثي وقائي من خطر الأصابة بداء السكري- النوع الأول، إذ بلغت قيمته 0.20. اظهرت النتائج ايضاً نسبة اعلى للطراز الوراثي CT عند العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين وكانت النسب 73.3% و31.4%، وعلى التوالي. التحليل الأحصائي عند استعمال اختبار فشر Fisher's test قد بين بأن تكرار النمط الوراثي CT اظهر فروقاً معنوية لدى العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين وعند مستوى احتمالية P<0.05 وكانت قيمته 0.007، كما كانت قيمة النسبة الحرجة 0.17 وفترة الثقة اظهرت قيمة بين 0.04–0.62، وهذه النتائج تبين الدور الكبير الذي يلعبه النمط الوراثي CT كجانب وقائي من الأصابة بالمرض، وكانت نسبته كعامل وقائي 0.611، بينما ظهر النمط الوراثي CC كنمط وراثي مرتبط مع خطر الأصابة بداء السكري- النوع الأول بشكل كبير، إذ بلغت نسبته كعامل مسبب للمرض 0.663. وكانت نسبة النمط الوراثي CC في عينة المصابين اعلى من العينة القياسية، إذ بلغت 68.6% و6.7%، وعلى التوالي. كانت قيمة النسبة الحرجة عالية، إذ بلغت 30.55 مع فترة ثقة كانت قيمتها بين 3.81–245.08. التحليل الأحصائي عند استعمال أختبار فشرFisher's test قد بين بأن تكرار النمط الوراثي CC قد اظهر فروقاً معنوية لدى عينة المرضى بالمقارنة مع العينة القياسية وعند مستوى احتمالية P<0.05 وكانت قيمته 5.1×10^{-2}، كما هو مبين في الشكل (4) والجدول (2). من النتائج اعلاه

يتبين أن الطراز الوراثي متماثل الزيجة CC يرتبط مع خطر وتطور داء السكري- النوع الأول لدى عينة المصابين، وأن هناك طرازين وراثيين هما TT وCT يكونان مرتبطين مع الجزء الوقائي من خطر وتطور داء السكري- النوع الأول. تتفق هذه النتائج مع نتائج الباحثين (Javor *et al*., 2010)، إذ حصلوا على نسب عالية من الطرازين الوراثيين TT وCT في العينات القياسية بالمقارنة مع عينات المصابين، كما كان للطراز الوراثي TT نسبة اعلى لدى عينات المصابين بالمقارنة مع العينات القياسية، بينما لم تتفق النتائج مع ما حصل عليه كل من (Arababadi *et al*., 2009 ; Alsaid *et al*.,2013) وذلك لحصولهم على نتائج للطرز الوراثية TT وCT في عينات المرضى بنسبة اعلى من العينات القياسية، كما أظهر الطراز الوراثي CC في العينات القياسية نسباً اعلى من عينات المرضى. الدراسات الوراثية اظهرت ان تباين الجين *IL-4* من ناحية ارتباطه مع داء السكري- النوع الأول من عدمه وان احد اسباب هذا التباين قد يعود إلى التركيب الوراثي للجين *IL-4* في الأطفال العراقيين بالمقارنة مع اطفال الشعوب الأخرى، علماً بأنه لاتوجد دراسات وراثية على الأطفال العراقيين لغرض معرفة فيما إذا كان هناك تباين وراثي بين العراقيين العرب والشعوب الأخرى من مختلف القوميات. ان مدى خطر الأصابة بداء السكري – النوع الأول ربما يحدد بوجود جين *IL-4*، فالطرز الوراثية له والتي هي CC وCT لها علاقة بداء السكري- النوع الأول، وأن هذه العلاقة بين جين *IL-4* والمرض يعكس تأثيرات الحركي الخلوي IL-4 على التوازن ما بين فعالية خلايا Th1 وخلايا Th2 والخلايا التائية المنظمة، واخيراً فان خطر الأصابة بداء السكري- النوع الأول ربما يحدد بمدى تعبير الجين للحركي الخلوي *IL-4* (Teodorica *et al*., 2003)، وبين (Amirshahroki *et al*., 2008) بأن جين *IL-4* يعبر عن نفسه في المصابين بداء السكري- النوع الأول، كما اوضحوا بأن تعبير هذا الجين كان واضحاً من خلال وجود الحركي الخلوي IL-4 في الدورة الدموية للمرضى المصابين بداء السكري- النوع الأول، ووجد أن هناك زيادة في فعالية المناعة الخلوية وخاصة خلايا CD4 وCD8 في الأشخاص المصابين. وبين ستيك وجماعته (Steck *et al*,. 2005) من خلال دراستهم بأن دور جين *IL-4* في المصابين بداء السكري- النوع الأول يكون دوراً منظماً وحامياً من تطور المرض، وهذا اعتماداً على التعدد الشكلي المظهري للنيوكلوتيدة المفردة في الشخص المصاب. هذه النتائج جاءت لتؤكد نتائج الدراسة والتي اظهرت

وجود طرازين وراثيين هما TT وCT مرتبطين مع الجزء الوقائي من خطر الأصابة بالمرض من بين الطرز الوراثية الثلاث الناتجة بسبب التعدد الشكلي المظهري للجين *IL-4* -590.

المصادر

1. Belle, T. V., CoppIeters, K. and Herrath, M. V. (2011). Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. Amer. Physiol. Soc. 91: 79–118.
2. American Diabetes Association. (2004). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 31 supplement. 1.S10.
3. Harjutsalo, V., Sjoberg, L. and Tuomilehto, J. (2008). Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. Lancet. 371(9626):1777-1782.
4. Guariguata, L. (2011). Estimating the worldwide burden of type 1 diabetes. J. Diabetes. 56:6-8.
5. Notkins, A. L. (2002). Immunology and genetic factors in type1 diabetes. J. Biol. Chem. 277(46):43545-43548.
6. Pauza, M. E., Neal, H., Hagenbaugh, A., Cheroutre, H. and Lo, D. (1999). T-cell production of an inducible interleukin-10 transgene provides limited protection from autoimmune diabetes. Diabetes.48:1948–1953.
7. Phillips, J. M., Parish, N. M., Drage, M. and Cooke, A. (2001). Cutting edge: interactions through the IL-10 receptor regulate autoimmune diabetes. J. Immunol.167:6087–6091.
8. Sharif, S., Arreaza, G. A., Zucker, P. and Delovitch, T. L. (2002). Regulatory natural killer T cells protect against spontaneous and recurrent type 1 diabetes. Ann. NY Acad. Sci.958:77–88.
9. Akdis, M., Burgler, S., Crameri, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M. and Akdis, C. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases. Allergy Clinc. Immunol. J. 127:701-721.
10. Mi, Q., Ly, D., Zucker, P., McGarry, M., and Delovitch, T. (2004). Interleukin-4 but not interleukin-10 protect against spontaneous and recurrent type1 diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells. J. Diabetes. 53:1303-1310.

11. Bid, H. K., Konwar, R., Agrawal, C. G., Banerjee, M. (2008). Association of IL-4 and IL-1RN (receptor antagonist) gene variants and the risk of type 2 diabetes mellitus: A study in the north Indian population. Indian J. Med. Sci. 62:259-266.
12. Kamali-Sarvestani, E., Zolghadri, J., Gharesi-Fard, B. and Sarvari, J. (2005). Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. J. Reprod. Immunol. 65:171-8.
13. Javor, J., Ferencik, S., Bucova, M., Stuchlikova, M., Martinka, E., Barak, L,. Strbova, L., Grosse-Wilde, H. and Bue, M. (2010). Polymorphisms in the genes encoding TGF-β1, TNF-α, and IL-6 Show association with Type 1 diabetes mellitus in the Slovak population. J. Immunol. 58:385-393.
14. Eerligh, P., Koeleman, B., Dudbridge, F., Bruining, G., Roep, B. and Giphart, M.(2004). Functional genetic polymorphism in cytokines and metabolic genes as addition genetic markers for susceptibility to develop type1 diabetes. Genetic and Immunity. 5:36-40.
15. Ryan, A. W., Thornton, J. M., Brophy, K., Daly, J., Mcloughlin, R., Morain, C., Abuzakouy, M., Kennedy, N. and Mcmanus, R. (2005). Chromosome 5q candidate genes in coeliac disease: Genetic variation at IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17B and NR3C1.Tissue Antigens J. 65(2):150-155.
16. Alsaid, A., El-Missiry, M., Hatata, E., Tarabay, M. and Settin, A. (2013). Association of IL-4-590 C>T and IL-13-1112 C>T gene polymorphisms with the susceptibility to type 2 diabetes mellitus. Disease Markers. 35(4):343-247.
17. Jahromi, M., Millward, A. and Demaine, A. (2000). A CA repeat polymorphism of the IFN gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. J. Interferon Cytokine Res. 20:187–190.
18. Arababadi, M. K., Pourfathollah, A., Daneeshmandi, S., Hassanshi, G., Rezazadeh, E., Shamsizadeh, A., Rezaei, M. and Eigder, S. (2009). Evaluation of relation between IL-4 and IFN-γ polymorphism and type2 diabetes. Iranian J. 12(2):100-104.
19. Amirshahrokhi, K., Dehopour, A., Hajiati, J., Sotonden, M. and Ghozi-Khansari, M. (2008). Method one ameliorates multiple-low-dose streptozotocin-induced type 1 diabetes in maci. Tox. Appl. Pharmacol. 232:119-124.

20. Teodorica, L. B., Mirel, D., Valdes, A., Panelo, A., Pozzilli, P.and Erlich, H. (2003). Association and interaction of the IL4R, IL4, and IL13 Loci with Type 1 Diabetes among Filipinos. J. Hum. Genet. 72:1505–1514.
21. Steck, A., Bugawan, T., Valdes, A., Emery, L., Blair, A., Norris, J., Redondo, M., Babu, S., Erlich, H., Eisenbarthm, G. and Rewers,M. (2005). Association of non-HLA genes with type1 diabetes Autoimmunity. J. Diabetes. 54:2482-2486.

Polymorphism of *IL-4* -590 (C>T) gene in Iraqi children with Type 1 Diabetes Mellitus

Ihsan A. Hussein   Hazima M. AL-Abassi   Anwar Abed Nasser*

Department of Biology, College of Education for Pure Science - Ibn - Al-Haithim, University of Baghdad

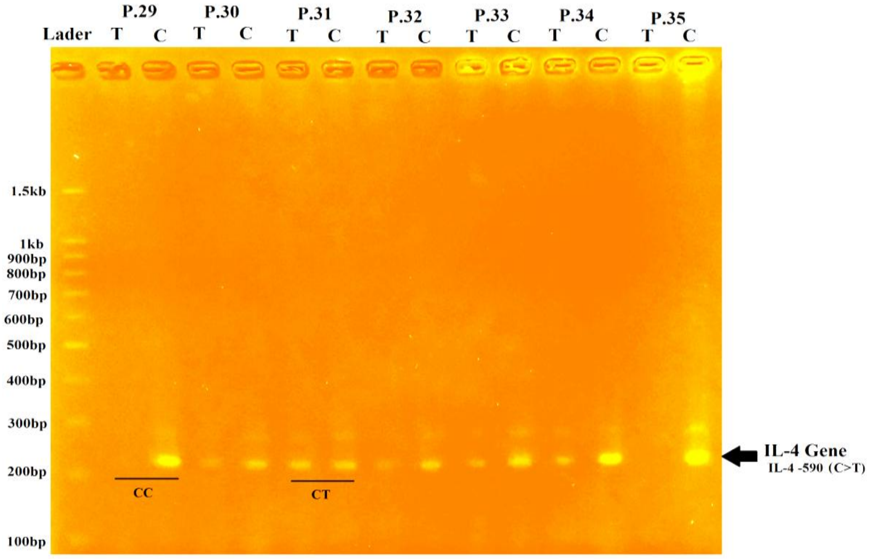
Abstract

This study included 50 blood serum samples that collected from children with age ranged between 7-12 years. Thirty five samples collected from children with Type 1 Diabetes Mellitus (T1D), and 15 blood serum samples collected from healthy children as a control sample. The polymorphism of *IL-4* -590 (C>T) gene, which amplified by using amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) was showed high percentage of C allele frequency in T1D patients sample in comparison with T allele frequency, and the C allele revealed as etiological faction with risk by having T1D disease, whereas the T allele showed high frequency from the C allele frequency in control sample, and the T allele revealed as preventive faction from infection by this disease. The TT and CT genotypes revealed as preventive faction from infection by T1D disease, whereas the CC genotype revealed as etiological faction with risk by having T1D disease.

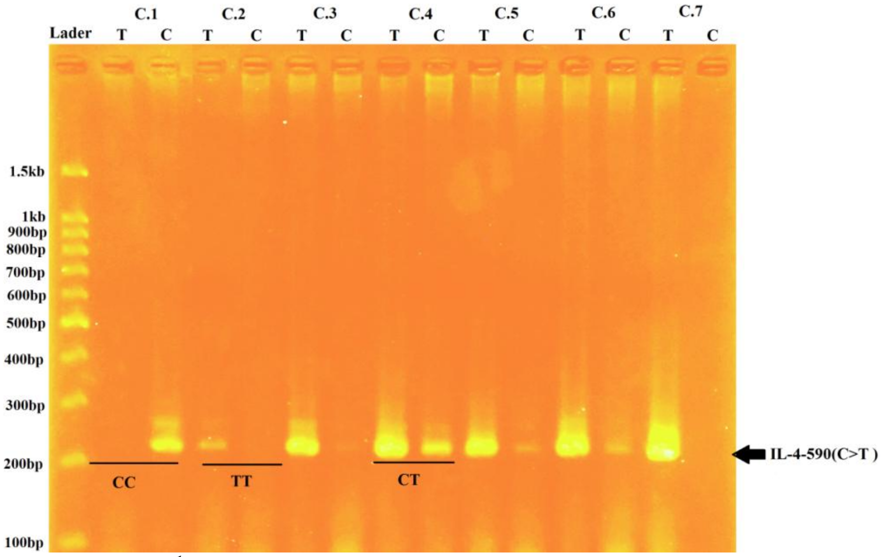
Keywords: Interleukin 4 (IL-4), Type 1 Diabetes Mellitus, *IL-4* -590 (C>T), T1D

---

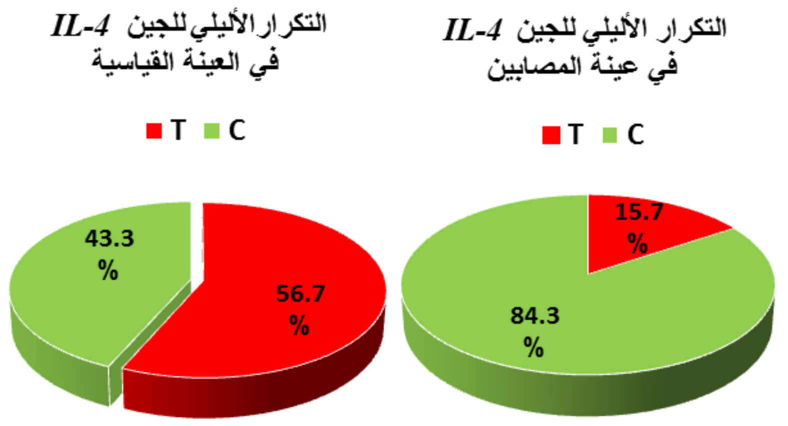
*= This work is a part of Ph.D thesis for the third researcher.



شكل (1): الترحيل الكهربائي لجين (C>T) 590 -*IL-4* مبيناً فيه الأليلين T وC في عينات المصابين بداء السكري- النوع الأول



شكل (2): الترحيل الكهربائي لجين (C>T) 590- *IL-4* مبيناً فيه الأليلين T وC في العينات القياسية

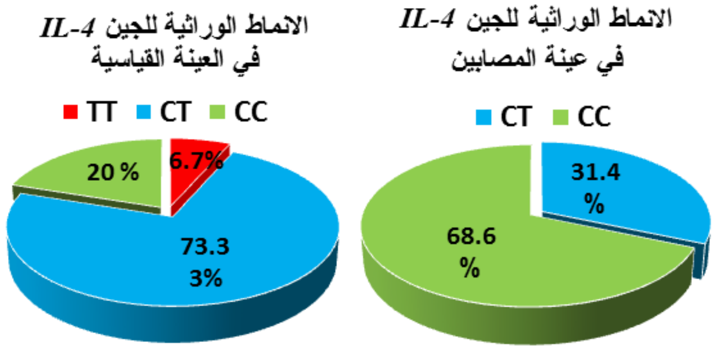


شكل (3): تكرارات الأليلين T و C في عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية

جدول (1): تكرارات الأليلين T و C للجين (C>T) 590- *IL-4* في عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية

الجين	الأليل	عينة المصابين العدد (%)	العينة القياسية العدد (%)	(95%CI) OR	P value
IL-4 -590 (C>T)	T	(%15.7)11	(%56.7)17	(0.37−0.05=CI) 0.14	$10^{-2}\times5.1$*
	P.F	0.486			
	C	(%84.3)59	(%43.3)13	(18.23−2.70=CI) 7.01	
	E.F	0.723			

OR= Odds ratio (النسبة الحرجة)، CI= Confidence Intervals (فترة الثقة)، P.F= Preventive faction (نسبة الجزء الوقائي)، E.F= Etiological faction (نسبة الجزء المسبب)، *= اختلاف معنوي عند مستوى احتمال اقل من P<0.05 وباستعمال اختبار فشر Fisher's test.



شكل (4): تكرارات الأنماط الوراثية للجين *IL-4* -590 (C>T) في عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية

جدول (2): الأنماط الوراثية للجين *IL-4* -590 (C>T) في عينات المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية

الجين	النمط الوراثي	عينة المصابين العدد (%)	العينة القياسية العدد (%)	(95%CI) OR	P value
IL-4 -590 (C>T)	TT	(%0.0)0	(%20)3	(0.99−0.00=CI) 0.50	*0.023
	P.F	0.20			
	CT	(%31.4)11	(%73.3)11	(0.62−0.04=CI) 0.17	*0.007
	P.F	0.611			
	CC	(%68.6)24	(%6.7)1	−3.81=CI) 30.55	10^{-2}×5.1*
	E.F	0.663			

OR = Odds ratio (النسبة الحرجة)، CI= Confidence Intervals (فترة الثقة)، P.F= Preventive faction (نسبة الجزء الوقائي)، E.F= Etiological faction (نسبة الجزء المسبب)، *= اختلاف معنوي عند مستوى احتمال اقل من P<0.05 وباستعمال اختبار فشر Fisher's test