جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد
كلية التربية للعلوم الصرفة – ابن الهيثم

دراسة مناعية ووراثية لداء السكري- النوع الأول في عينة من المرضى العراقيين

أطروحة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – ابن الهيثم / جامعة بغداد وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة/علم الحيوان/علم الوراثة المناعية

من قبل

أنور عبد ناصر

ماجستير علوم الحياة / وراثة خلوية – كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة الأنبار

2009

باشراف

أ.م.د. احسان عرفان حسين و أ.م.د. حازمة موسى خليل

جماد الثاني 1437هـ نيسان 2016م

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَمَا يَعْلَمُ تَأْوِيلَهُ إِلاَّ اللّهُ وَالرَّاسِخُونَ فِي الْعِلْمِ يَقُولُونَ آمَنَّا بِهِ كُلٌّ مِّنْ عِندِ رَبِّنَا وَمَا يَذَّكَّرُ إِلاَّ أُوْلُواْ الأَلْبَابِ﴾

صدق الله العظيم

(آل عمران :الآية ٧)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الاهداء

إلى سيد البشرية رسول الرحمة المهداة سيدنا محمد
(صلى الله عليه وسلم)
وآله الطيبين الطاهرين .... وأصحابه الميامين
(رضي الله عنهم وأرضاهم)
إلى وطني بكل مافيه.....
إلى من سهرا الليالي وأغرقاني بعطفهم وحنانهم ..... أمي (أطال الله عمرها)... وابي (رحمهُ الله)
إلى الذي جاد بنفسه من أجل العراق ... أخي الشهيد عقيل (رحمهُ الله)
إلى سندي في حياتي ... زوجتي العزيزة
إلى أولادي الأعزاء
إلى أخوتي الدكتور كمال وجمال وأختي الوحيدة ايمان
إلى أساتذتي الأعزاء الدكتور احسان عرفان والدكتورة حازمة موسى والدكتور عبد مسربت وجميع أساتذتي الأفاضل ... وإلى كل من علمني
إلى أصدقائي وزملائي... ومن أحب
أُهدي ثمرة جهدي

أنور

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

شكـر وتقـدير

الحمـد لله الـذي خلـق الإنسـان وعلمـه البيـان وافضـل الصـلاة والسـلام علـى سـيد الخلـق رسـول الرحمـة والإنسـانية محمـد الهـادي الأمـين الـذي ادى الأمانـة وبلـغ الرسـالة وجعلـه الله سـبحانه وتعـالى هاديـاً وبشـيراً ونـذيراً للبشـرية جمعـاء وعلـى آل بيتـه الطيبـين الطـاهرين وأصـحابه الميـامين رضـوان الله علـيهم أجمعـين. يسـعدني وأنـا أضـع البصـمات الأخيـرة مـن أطروحتـي بـأن أتقـدم بالشـكر الجزيـل والأمتنـان إلـى اسـاتذتي المشـرفين علـى الأطروحـة كـل مـن الأسـتاذ المسـاعد الـدكتور احسـان عرفـان حسـين والأسـتاذ المسـاعد الـدكتورة حازمـة موسـى خليـل لجهـودهم النبيلـة وملاحظـاتهم القيمـة لانجـاز الأطروحـة بالشـكل السـليم متمنيـاً لهـم كـل التوفيـق ودوام الصـحة وجـزاهم الله عنـي خيـر الجـزاء، كمـا أتقـدم بالشـكر الجزيـل إلـى الأسـتاذ الـدكتور علـي حسـن ادحيـة لتزويـدي بالمعلومـات القيمـة فـي مـدة دراسـة الكورسـات التخصصـية ومتابعتـه لعملـي مـن خـلال الاستشـارة فـي العديـد مـن المواقـف, كمـا اتقـدم بالشـكر الجزيـل إلـى السـيد رئـيس قسـم علـوم الحيـاة وأسـاتذتي الأفاضـل وإلـى عمـادة كليـة التربيـة للعلـوم الصـرفة–ابـن الهيـثم لاسـيما السـيد العميـد المحتـرم وكـل الـذين سـبقوني بالمعرفـة فمـدوا لـي يـد العـون ادامهـم الله ومـنّ علـيهم بـالتوفيق والنجـاح. كـم اتقـدم بالشـكر إلـى زملائـي فـي الدراسـة وعرفانـا منـي بالجميـل اتقـدم بالشـكر والتقـدير الـى الاخـوات شـيماء صـباح مهـدي، سـلوى علـي وهنـد قصـي لتعـاونهم وتقـديم المسـاعدة فـي مـدة الدراسـة العمليـة وإلـى الأخ حسـين حميـد لتعاونـه فـي اجـراء التحلـيلات الأحصـائية, كمـا اتقـدم بشـكري إلـى سـارة محمـود لمسـاعدتها لـي فـي جمـع العينـات وأخيـراً شـكري وتقـديري الـى عـائلتي لاسـيما زوجتـي الـدكتورة الصـيدلانية بـروج عبـد مسـربت لتعاونهـا فـي تقـديم العديـد مـن الأستشـارات الطبيـة المرتبطـة مـع دراسـتي وكـذلك فـي مجـال الترجمة فجزاهم الله خير الجزاء.

أنور

www.manaraa.com

الخلاصة

شملت الدراسة على 50 عينة دم مأخوذة من اطفال تراوح متوسط اعمارهم من 7–12 سنة, كان منها 35 (18 ذكور, 17 اناث) عينة دم لأطفال مصابين بداء السكري– النوع الاول Type 1 Diabetes Mellitus (T1D), وعلى 15 (9 ذكور, 6 اناث) عينة دم لأطفال اصحاء التي عدت كعينة قياسية. قدر تركيز بعض الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب في مصل العينات المدروسة التي شملت IFN-γ و IL-17 , وبعض الحركيات الخلوية مضادة للالتهاب وشملت IL-4، IL-10 و TGF-β1, وباستعمال تقانة الأليزا ELISA. اظهرت النتائج تراكيز عالية من الحركي الخلوي IFN-γ في مصل المصابين بداء السكري– النوع الاول، إذ بلغ تركيزه 1.575 بيكوغرام/مليلتر بالمقارنة مع 0.921 بيكوغرام/مليلتر لدى العينة القياسية. اظهرت نتائج التحليل الاحصائي باستعمال اختبار Mann-Whitney U وجود فروق معنوية في هذا الحركي الخلوي بين الأطفال المصابين والعينة القياسية وتحت مستوى احتمالية $P<0.05$. اظهرت النتائج ايضاً انخفاضاً في تركيز الحركي الخلوي IL-17A في مصل المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية, إذ بلغ التركيز في مصل دم المصابين 0.010 بيكوغرام/مليلتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.029 بيكوغرام/مليلتر. اظهرت النتائج انخفاضاً في تركيز الحركي الخلوي IL-4 في مصل المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية, إذ بلغ التركيز في مصل دم المصابين 0.015 بيكوغرام/مليلتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.021 بيكوغرام/مليلتر, كما اظهرت النتائج انخفاضاً في تركيز الحركي الخلوي IL-10 في مصل دم المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية, إذ بلغ متوسط التركيز في مصل دم المصابين 0.068 بيكوغرام/مليلتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.111 بيكوغرام/مليلتر. بينت النتائج ارتفاعاً ملحوظاً في تركيز الحركي الخلوي TGF-β1 في مصل المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية, إذ بلغ متوسط التركيز في مصل دم المصابين 1.659 بيكوغرام/مليلتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.444 بيكوغرام/مليلتر. اظهره نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية في تركيز TGF-β1 بين كلا العينتين وتحت مستوى احتمالية $P<0.05$.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اشارت نتائج قيم معامل الأرتباط باستعمال تحليل Pearson Correlation بين الحركيات الخلوية المدروسة الى وجود فروق معنوية في بعض الحركيات الخلوية, بينما لم تظهر وجود أية فروق معنوية في الحركيات الخلوية الأخرى.

اظهر التعدد الشكلي لجين *IFN-γ* T/A +874 المتضخم باستعمال تقانة نظام الممانعة للتضخيم Amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) نسبة اعلى من تكرار الأليل *t* في عينة المصابين بالمقارنة مع تكرار الأليل a، بينما سجل الأليل t نسبة اعلى من الأليل a في العينة القياسية. ظهر الأليل a كأليل مسبب Etiological faction (EF) بلغت قيمته 0.451, ومرتبط مع المرض في عينة المصابين، بينما ظهر الأليل t كأليل وقائي من المرض Preventive faction (PF) وبلغت قيمته 0.299. اظهرت نتائج التحليل الاحصائي للنمط الوراثي TT نسبة اعلى لدى العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول, وظهر هذا النمط كنمط وراثي وقائي من خطر الإصابة بداء السكري, وظهر النمطان الوراثيان TA وAA كنمطين وراثيين مرتبطين مع خطر الإصابة بداء السكري. اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي وجود الجينين *IL-17A* و*IL-17-F* في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينات القياسية, ولعدم توفر الانزيمات القاطعة والوقت الكافي لم تتم دراسة التعدد الشكلي لهذه الجينات. اظهر التعدد الشكلي لجين (C>T) 590- *IL-4* المتضخم باستعمال تقانة ARMS-PCR نسبة اعلى من الأليل c في عينة المصابين بالمقارنة مع الأليل t وظهر الأليل c كأليل مسبب مرتبط مع خطر الإصابة بالمرض، بينما سجل الأليل t نسبة اعلى من الأليل c في العينة القياسية، وظهر الأليل *t* كأليل وقائي من المرض. اظهر النمطان الوراثيان TT وTC كنمطين مرتبطين مع الجزء الوقائي من خطر الإصابة بداء السكري– النوع الاول وظهر النمط الوراثي CC كنمط وراثي مرتبط مع خطر الإصابة بداء السكري– النوع الاول. كشف عن محث الجين *IL-10* في الموقعين 592– و– 1082 في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية، واظهرت النتائج وجود هذين الموقعين في محث الجين *IL-10* في جميع العينات المدروسة. اظهرت نتائج التعدد الشكلي للجين *TGF-β1* في الموقع Codon 10: +869*C/T بان الأليل t كأليل مسببٍ ومرتبطٍ مع المرض, بينما اظهر

www.manaraa.com

الأليل c كأليل وقائي من خطر الإصابة بالمرض. وظهر النمطان الوراثيان TT وCC كانماط وراثية مسببة ومرتبطة مع خطر الإصابة بداء السكري, بينما ظهر النمط الوراثي CT كنمط وراثي مرتبط مع الجزء الوقائي من المرض. بينت نتائج التعدد الشكلي للجين *TGF-β1* في الموقع Codon 25: +915*G/C بان الأليل g ظهر كأليل مسبب ومرتبط مع خطر الإصابة, بينما ظهر الأليل c كأليل وقائي من المرض. ظهر النمط GG كنمط وراثي مرتبط مع خطر الإصابة بداء السكري– النوع الاول, بينما لم يظهر النمطان الوراثيان GC وCC اي ارتباط معنوي مع المصابين بداء السكري– النوع الاول, وكان نمطان مرتبطين مع الجزء الوقائي من خطر الإصابة بالمرض. نتائج التسلسل التتابعي لمحث الجين *IL-10* في الموقعين الطافرين 592– و1082– قد سجلت العديد من الطفرات الجينية من نوع الإضافة، الحذف والاستبدال مع نسبة عالية من النوع الأخير من الطفرات الجينية في جميع العينات المدروسة ولكلا الموقعين.

www.manaraa.com

قائمة المحتويات

الفقرة	الموضوع	الصفحة
	الفصل الاول	
1	**المقدمة**	9-1
	الفصل الثاني	
2	**استعراض المراجع**	60-10
1-2	تعريف داء السكري وتشخيصه	10
2-2	تصنيف داء السكري	12
3-2	وبائية داء السكري- النوع الاول Epidemiology of T1D	14
4-2	المسبب المرضي، علاج وامراضية داء السكري- النوع الاول	16
5-2	المناعة ومرض داء السكري Immunity and diabetes mellitus	19
1-5-2	دور المناعة الخلطية في داء السكري- النوع الاولى	19
1-1-5-2	الأجسام المضادة الذاتية Autoantibody	19
2-1-5-2	الأجسام المضادة الذاتية ضد الانسولين	21
3-1-5-2	الأجسام المضادة الذاتية لخلية الجزيرة الساتوبلازمية	22
4-1-5-2	الأجسام المضادة الذاتية ضد انزيم الديكاربوليز	22
5-1-5-2	الأجسام المضادة لمستضد الجزيرة	23
6-1-5-2	مستضد بروتين تايروسين فوسفاتيز	24
7-1-5-2	مستضد الزنك الناقل Zinc transporter 8 (ZnT8)	24
2-5-2	المناعة الخلوية في مرضى السكري- النوع الاول	25
6-2	دور الحركيات الخلوية في داء السكري- النوع الاول	29
7-2	الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب في داء السكري- النوع الاول	31
1-7-2	الحركي الخلوي Interlukin-17 (IL-17)	32
2-7-2	الانترفيرون- كاما Interferon-gamma (IFN-γ)	34
8-2	الحركيات الخلوية مضادة للالتهاب في داء السكري- النوع الاول	38
1-8-2	الحركي الخلوي Interleukin-4 (IL-4)	38

www.manaraa.com

2-8-2	الحركي الخلوي Interlukines-10 (IL-10)	40
3-8-2	عامل النمو المحول- بيتا 1 Transforming growth factor-beta (TGF-β1)	42
9-2	الوراثة ومرض داء السكري Genetic and diabetes mellitus	45
1-9-2	وراثة داء السكري- النوع الاول Genetics of Type I Diabetes	45
2-9-2	دور HLA في وراثة داء السكري- النوع الاول	46
3-9-2	جين الحركي الخلوي *IL-4* Interleukin-4 gene	48
4-9-2	جين الحركي الخلوي *IL-10* Interlukines-10 gene	51
5-9-2	جين الحركي الخلوي *IL-17* Interlukin-17 gene	52
6-9-2	جين عامل النمو المحول- بيتا1	53
7-9-2	جين انترفيرون كاما *(IFN-γ)* Interferon-gamma gene	56
10-2	تقانة نظام الممانعة للتضخيم	59
الفصل الثالث		
3	**المواد وطرائق العمل**	92-61
1-3	الأجهزة	61
2-3	المواد والمحاليل المستعملة	62
1-2-3	عينات دم المرضى المصابين بداء السكري-النوع الاول	62
2-2-3	عدد تشخيص الحركيات الخلوية Interleukins kits	62
3-2-3	عدة استخلاص الدنا DNA من الأطفال المرضى والأصحاء	63
4-2-3	الصبغات Dyes	63
1-4-2-3	صبغة تحميل البروموفينول الأزرق للترحيل الكهربائي	63
2-4-2-3	صبغة الأيثيديوم بروماید Ethidium bromide (EtBr)	63
5-2-3	محلول دارئ Tris-Borate-EDTA buffer (TBE)	64
6-2-3	حامض الكبريتيك Sulfuric acid (H_2SO_4)	64
7-2-3	حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric acid (HCl)	64
8-2-3	محلول هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide (NaOH)	64

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

9-2-3	محلول الأمونيوم بيرسيلفيت Ammonium persulphate (APS) تركيز 10%	65
10-2-3	دارئ التحميل Loading buffer في الكشف عن جين IL-17	65
11-2-3	هلام الآكاروز Agarose gel	65
12-2-3	محلول الأكريلمايد:المثيلينبس أكريلمايد الخزين	65
13-2-3	هلام متعدد الأكريلمايد لعزل الدنا Polyacrylamide gel for DNA	66
14-2-3	خليط تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR mix	66
15-2-3	البادئات Primers	66
1-15-2-3	البادئات المستعملة في الكشف عن جين الطافر *IL-4* -590 (C>T)	66
2-15-2-3	البادئات المستعملة في الكشف عن المحث Promoter للجينين الطافرين	67
3-15-2-3	البادئات المستعملة في الكشف عن جيني *IL-17A* و *IL-17F*	67
4-15-2-3	البادئات المستعملة في الكشف عن الجينين الطافرين	68
5-15-2-3	البادئات المستعملة في الكشف عن الجين الطافر *IFN-γ* T/A +874	69
16-2-3	واصمات الوزن الجزيئي للدنا DNA molecular weight markers	69
17-2-3	عدة تنقية الدنا الناتج من تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	70
18-2-3	مادة BigDye terminator V3.1	70
19-2-3	عدة تنقية BigDye XTerminator Purification kit	70
3-3	طرائق العمل Methods	71
1-3-3	تعيين تركيز بروتينات الحركيات الخلوية IL-4، IL-10، IL-17، TGF-β و IFN-γ باستعمال جهاز ELISA	71
1-1-3-3	عزل المصل من العينات المدروسة	71
2-1-3-3	قياس مستويات الحركيات الخلوية في مصل المرضى	71
3-1-3-3	طريقة عمل العدة Kit	73
4-1-3-3	حساب تراكيز الحركيات الخلوية في أمصال دم المصابين والعينة القياسية	78
2-3-3	استخلاص الدنا الكلي من دم عينات المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول	81
3-3-3	الكشف عن الجين الطافر *IL-4* -590 (C>T)	83

www.manaraa.com

4-3-3	الكشف عن المحث Promoter للجينين الطافرين 592- *IL-10* و *IL-10* -1082	84
5-3-3	الكشف عن جيني *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) و *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C)	85
6-3-3	الكشف عن الجين الطافر *IFN-γ* +874 T/A	86
7-3-3	الكشف عن جيني *IL-17A* و *IL-17F*	88
8-3-3	التسلسل التتابعي للدنا DNA sequencing لمحث الجينين الطافرين *IL-10* -592 و *IL-10* -1082	90
9-3-3	التحليلات الاحصائية	91
الفصل الرابع		
4	**النتائج والمناقشة**	93-160
1-4	العينات المدروسة للمصابين بداء السكري- النوع الاول	93
2-4	الجانب المناعي	93
1-2-4	مستوى تركيز الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب في مصل دم العينات المدروسة	94
1-1-2-4	تركيز الانترفيرون- كاما (IFN-γ) Interferon-gamma	94
2-1-2-4	مستوى تركيز الحركي الخلوي (IL-17A) Interleukin-17A	97
2-2-4	مستوى تركيز الحركيات الخلوية مضادة للألتهاب في المصل للعينات المدروسة	99
1-2-2-4	تركيز الحركي الخلوي (IL-4) Interleukin-4	99
2-2-2-4	تركيز الحركي الخلوي (IL-10) Interleukin-10	101
3-2-2-4	مستوى تركيز عامل النمو المحول بيتا TGF-β1	103
3-2-4	معامل الأرتباط بين الحركيات الخلوية المدروسة في جميع العينات	106
4-2-4	العلاقة بين مدة الإصابة للأطفال المصابين بداء السكري-النوع الاول وتراكيز الحركيات الخلوية المدروسة	108
3-4	الجانب الوراثي	110
1-3-4	التعدد الشكلي لجينات الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب في مصل دم العينات المدروسة	111
1-1-3-4	التعدد الشكلي لجين الانترفيرون- كاما (*IFN-γ*) Interferon-gamma	111

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2-1-3-4	الكشف عن الجينين *IL-17A* و*IL-17-F*	119
2-3-4	التعدد الشكلي لجينات الحركيات الخلوية مضادة الالتهاب في مصل دم	122
1-2-3-4	التعدد الشكلي للجين الطافر *IL-4* -590 (C>T)	122
2-2-3-4	الكشف عن محث الجينين الطافرين *IL-10* -592 و*IL-10* -1082	130
3-2-3-4	الكشف عن الطفرتين Codon 10: +869*C/T و Codon 25: +915*G/C في الجين *TGF-β1*	134
3-3-4	التسلسل التتابعي لمحث الجين الطافر *IL-10* في الموقعين 592- و-1082	148
1-3-3-4	المقارنة بين التسلسل التتابعي لمحث الجين الطافر في الموقع 592- مع التسلسل القياسي Refseq للمحث نفسه في عينة المصابين والعينة القياسية	149
2-3-3-4	المقارنة بين التسلسل التتابعي لمحث الجين الطافر في الموقع 1082- مع التسلسل القياسي Refseq للمحث نفسه في عينة المصابين والعينة القياسية	154
	الأستنتاجات	161-160
	التوصيات	162
	المصادر REFERENCES	190-163
	الملاحق	201-191
	البحوث المستلة من الرسالة والمقبولة للنشر	202
	Summary	i-iii

www.manaraa.com

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	الأجهزة العلمية المستعملة في هذه الدراسة	61
2	تركيز IFN-γ في مصل العينات المدروسة	94
3	تركيز IL-17A في مصل العينات المدروسة	97
4	تركيز IL-4 في مصل العينات المدروسة	99
5	تركيز IL-10 في مصل العينات المدروسة	101
6	تركيز TGF-β1 في مصل العينات المدروسة	104
7	معامل الأرتباط بين الحركيات الخلوية المدروسة في جميع العينات	106
8	العلاقة بين مدة الإصابة للأطفال المصابين وتراكيز الحركيات الخلوية	109
9	تكرارات الأليلين T وA للجين الطافر *IFN-γ*T/A +874 في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	114
10	الانماط الوراثية للجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	117
11	تكرارات الأليلين T وC للجين الطافر *IL-4* -590 (C>T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	125
12	الانماط الوراثية للجين الطافر *IL-4*-590 (C>T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	128
13	تكرارات الأليلين T وC للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	136
14	الانماط الوراثية للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	139
15	تكرارات الأليلين C وG للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	142
16	الانماط الوراثية للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	145

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

17	تراكيز الحركي الخلوي IL-10 في عينات المصابين والعينات القياسية التي أختيرت في دراسة التسلسل التتابعي للجين الطافر IL-10 في الموقعين – 592 و1082–	148
18	النسبة المئوية لتكرار طفرات الاستبدال في محث الجين 592- *IL-10* لعينات المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينات القياسية	151
19	النسبة المئوية لتكرار طفرات الاستبدال في محث الجين 1082- *IL-10* لعينات المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينات القياسية	155

www.manaraa.com

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1	الميكانيكية التي تتوسطها المناعة الذاتية في تحطم خلايا بيتا في البنكرياس	27
2	دور خلايا Th1، Th2 و Th17 في المصدر، الانتاج والوظيفة لبعض الحركيات الخلوية	30
3	دور الحركيات الخلوية المدروسة في تحطم خلايا بيتا التي توسطها الخلايا المناعية	31
4	دور TGF-β في داء السكري– النوع الاول	43
5	موقع الجين *IL-4* على الكروموسوم رقم 5	48
6	موقع الجين *IL-10* على الكروموسوم رقم 1	51
7	موقع الجين *IL-17A* على الكروموسوم رقم 6	53
8	موقع جين عامل النمو المحول– بيتا1 *TGF-β1* على الكروموسوم رقم 16	54
9	موقع الجين انترفيرون كاما (*IFN-γ*) Interferon-gamma على الكروموسوم رقم 12	57
10	مراحل تقانة ARMS-PCR	60
11	المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز IL-4	78
12	المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز IL-10	79
13	المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز IL-17A	79
14	المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز IFN-γ	80
15	المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز TGF-β	80
16	متوسط تركيز IFN-γ في مصل العينات المدروسة	95
17	متوسط تركيز IL-17A في مصل العينات المدروسة	98
18	متوسط تركيز IL-4 في مصل العينات المدروسة	100
19	متوسط تركيز IL-10 في مصل العينات المدروسة	102
20	متوسط تركيز TGF-β1 في مصل العينات المدروسة	104

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

21	الترحيل الكهربائي للجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 مبيناً فيه الأليلين T و A في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول	112
22	الترحيل الكهربائي للجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 مبيناً فيه الأليلين T و A في العينة القياسية	112
23	تكرارات الأليلين T و A في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	114
24	تكرارات الانماط الوراثية للجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	117
25	الترحيل الكهربائي للجينين *IL-17A* و*IL-17-F* في بعض المصابين بداء السكري–النوع الاول	120
26	الترحيل الكهربائي للجينين *IL-17A* و*IL-17-F* في بعض العينات القياسية	120
27	الترحيل الكهربائي للجين الطافر *IL-4*- 590 (C>T) مبيناً فيه الأليلين T و C في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول	123
28	الترحيل الكهربائي للجين الطافر *IL-4* -590 (C>T) مبيناً فيه الأليلين T و A في العينة القياسية	123
29	تكرارات الأليلين T و C في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	125
30	تكرارات الانماط الوراثية للجين الطافر *IL-4* -590 (C>T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	128
31	الترحيل الكهربائي لمحث الجين الطافر *IL-10* -1082 في المصابين بداء السكري–النوع الاول	130
32	الترحيل الكهربائي لمحث الجين الطافر *IL-10* -1082 في العينة القياسية	131
33	الترحيل الكهربائي لمحث الجين الطافر *IL-10* -592 في المصابين بداء السكري–النوع الاول	132
34	الترحيل الكهربائي لمحث الجين الطافر *IL-10* -592 في العينة القياسية	132
35	الترحيل الكهربائي للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) مبيناً فيه الأليلين T و C في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول	134

www.manaraa.com

36	الترحيل الكهربائي للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) مبيناً فيه الأليلين T و C في العينة القياسية	135
37	تكرارات الأليلين T و C للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	136
38	تكرارات الانماط الوراثية للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	138
39	الترحيل الكهربائي للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) مبيناً فيه الأليلين C و G في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول	140
40	الترحيل الكهربائي للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) مبيناً فيه الأليلين C و G في العينة القياسية	141
41	تكرارات الأليلين C و G للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	142
42	تكرارات الانماط الوراثية للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	144
43	اصطفاف Alignment القواعد النتروجينية في محث الجين *IL-10* -592 في عينات المصابين بداء السكري– النوع الاول والتسلسل النيكلوتيدي القياسي	152
44	اصطفاف Alignment القواعد النتروجينية في محث الجين *IL-10* -592 في العينات القياسية والتسلسل النيكلوتيدي القياسي	153
45	اصطفاف Alignment القواعد النتروجينية في محث الجين *IL-10* -1082 في عينات المصابين بداء السكري– النوع الاول والتسلسل النيكلوتيدي القياسي	156
46	اصطفاف Alignment القواعد النتروجينية في محث الجين *IL-10* -1082 في العينات القياسية والتسلسل النيكلوتيدي القياسي	157

www.manaraa.com

قائمة الملاحق

رقم الصورة	العنوان	الصفحة
1	استمارة المعلومات الخاصة بجمع المعلومات عن عينة الأطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية	191
2	رموز النيكلوتيدات الخاصة بالأتحاد الدولي للكيمياء البحتة والتطبيقية IUPAC والمستعملة في دراسات التسلسل التتابعي للدنا	192
3	أهم الطفرات الجينية الموجودة في محث الجين الطافر *IL-10* –592 لعينات المصابين بداء السكري– النوع الاول	193
4	أهم الطفرات الجينية الموجودة في محث الجين الطافر *IL-10* –592 للعينات القياسية*	195
5	أهم الطفرات الجينية الموجودة في محث الجين الطافر *IL-10* –1082 لعينات المصابين بداء السكري– النوع الاول	197
6	أهم الطفرات الجينية الموجودة في محث الجين الطافر *IL-10* –1082 للعينات القياسية	199

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

قائمة المختصرات

Ammonium persulphate	APS
Amplification refractory mutation system	ARMS
Antigen Presenting Cells	APCs
Binding buffer antibody	BBA
Bovine serum albumin	BSA
Cell lysis buffer	CLB
Cluster of Differentiation	CD
Cytotoxic T lymphocytes	CTLs
Dendritic cells	DCs
Diabetes Mellitus	DM
Diabetes Nephropathy	DN
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	ELISA
Ethylene diamine tetra acetic acid	EDTA
Etiological faction	EF
Fragment Crystallizable	FC
Insulin antibody	IA
Insulin Auto-antibody	IAA
Insulin dependent diabetes mellitus	IDDM
Interferon-Beta	IFN-β
Interferon-Gamma	IFN-γ
Interleukin	IL
International Union of Pure and Applied Chemistry	IUPAC
Islet cell antibody	ICA
Glutamic acid decarboxylase	GAD
Heat shock protein	HSP

www.manaraa.com

Horseradish protein	HRP
Human leukocyte antigen	HLA
Least Significant Difference	LSD
Kilo Dalton	KD
Macrophage	Mϕ
Major Histocompatibility Complex	MHC
Maturity onset diabetes of the young	MODY
Natural killer	NK
National Center for Biotechnology Information	NCBI
National Diabetes Data Group	NDDG
No-Insulin dependent diabetes mellitus	NIDM
Odds ratio	OR
Optical density	OD
Phosphate citrate buffer	PCB
Polymerase chain reaction	PCR
Proteinase K	PK
Single nucleotide polymorphism	SNP
Standard Error	S.E.
Statistical package for social sciences	SPSS
Regulatory T Cells	Treg Cells
Reaction oxygen species	ROS
T-Helper	Th
Transforming Growth Factor-Beta	TGF-β
Tumor Necrosis Factor	TNF
Type1 diabetes mellitus	T1DM
Type2 diabetes mellitus	T2DM
World health organization	WHO
Zinc transporter 8	ZnT8

www.manaraa.com

((الفصل الاول))

1. المقدمة Introduction

يعرف داء السكري Diabetes mellitus (DM) على انه مجموعة اضطرابات ايضية تنتهي بفرط السكري Hyperglycemia, وتنتج اما من خلل في افراز هرمون الانسولين او فعل الانسولين او كلاهما (American Diabetes Association, 2010). يحدث داء السكري نتيجة عجز خلايا بيتا β cells الموجودة في البنكرياس عن انتاج مادة الانسولين بكمية كافية او توقفها عن الانتاج بشكل نهائي وهذا يعرف بداء السكري– النوع الاول Type 1 diabetes mellitus (T1DM) المعتمد على الانسولين (IDDM) Insulin-dependent diabetes mellitus, او عندما يعجز الجسم عن استعمال تلك المادة بشكل فعال وهذا يمثل داء السكري– النوع الثاني Type 2 diabetes mellitus (T2DM) غير المعتمد على الانسولين Noninsulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). هرمون الانسولين Insulin hormone هو هرمون يعمل على تنظيم مستوى السكر بالدم, ويعد داء السكري من الامراض الشائعة التي تحدث جراء عدم السيطرة على مستوى الكلوكوز بالدم, والذي يؤدي مع الوقت إلى حدوث اضرار كبيرة تكون مؤثرة في تركيب ووظائف انسجة الجسم (WHO, 2015). الاعراض الرئيسة المؤدية إلى الشكوك بالاصابة بداء السكري وارتفاع نسبة الكلوكوز في الدم هي العطش الشديد Polydipsia مع زيادة الادرار Polyuria وفقدان في الوزن, وفي بعض الاحيان يشعر المريض بالجوع (Gianani, 2005). داء السكري– النوع الاول مرض خطير ومميت ان لم يعالج, واكثر الحالات الخطرة التي تواجه المريض هي ارتفاع نسبة الكلوكوز في الدم مع زيادة في نسبة حامض الكيتون Ketoacidosis مصحوبة بفقدان السوائل, وهاتان

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الحالتان تسبب اغماء المريض وفي اسوء الأحوال يسبب الموت ان لم تتم معالجته (Nordwall *et al*., 2009). اظهرت الاحصائيات بان عدد المصابين بداء السكري تجاوز 347 مليون نسمة في جميع انحاء العالم, وتشير البيانات إلى ان سنة 2004 قد شهدت وفاة نحو 3.4 مليون نسمة من المصابين بهذا الداء, وأكثر من 80% من وفيات المصابين بهذا الداء تحدث في البلدان المنخفضة والمتوسطة الدخل, وسجل نصف وفيات المصابين بداء السكري تقريباً بين الأشخاص الذين تقل أعمارهم عن 70 سنة, كما سجل 55% من تلك الوفيات بين النساء, وتشير توقعات منظمة الصحة العالمية إلى ان الوفيات ستتضاعف في المدة بين الأعوام 2005–2030 (WHO, 2015).

وضعت ظاهرة تشخيص وتنظيم مستوى السكر في الدم لاول مرة من قبل منظمة الصحة العالمية World Health Organization (WHO) سنة 1965م, وبوساطة مجموعة بيانات مرضى السكري الوطنية National Diabetes Data Group (NDDG) عام 1976م (Alberts *et al*., 2002)، اما تشخيص داء السكري فقد اعتمد من خلال استعمال طريقة تركيز الكلوكوز الصيامي Fasting plasma glucose وذلك في التشخيص الروتيني والدراسات الوبائية لداء السكري, وحدد التركيز الحرج Threshold في الفحص الصيامي بمقدار 126 مليغرام/ديسي لتر (7 ملي مول/لتر), او غير الصيامي وفي اي وقت والذي يكون فيها التركيز الحرج 200 مليغرام/ديسي لتر (11.1 ملي مول/لتر), او اجراء الفحص بعد ساعتين من اخر وجبة غذاء وبتركيز كحد اعلى 140 مليغرام/ديسي لتر (American Diabetes Association, 2008).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

داء السكري– النوع الاول يظهر في المرضى الذين يكون مستوى الانسولين لديهم قليلاً او لا يوجد سعة في افراز للانسولين, ويصنف داء السكري– النوع الاول على نوعين هما Type1a و Type1b. النوع الاول a يعود إلى تحطم مناعي ذاتي لخلايا بيتا في البنكرياس مسببة في نقص الانسولين ويشكل نسبة 90%, بينما النوع الثاني b فيكون مجهول السبب Idiopathic ويشكل حوالي 9% من داء السكري– النوع الاول T1DM ولا يوجد أي دليل يثبت ارتباطه بامراض المناعة الذاتية (Atkinson and Maclaren,1994; Betterle and Zanette,1984).

يعُد داء السكري– النوع الاول من امراض المناعة الذاتية Autoimmunological disease الناتجة من اضطرابات ايضية لفرط الكلوكوز مع اضطرابات في أيض الدهون والكاربوهيرات والبروتينات, وان حدوث الداء مرتبط بالاضداد الذاتية Autoantibodies الموجهة ضد خلايا بيتا, وتطور الداء يزداد بسبب تحطم خلايا بيتا في البنكرياس المنتجة لهرمون الانسولين مما يسبب نقصاً في انتاج هرمون الانسولين (American Diabetes Association, 2008). يتميز الداء بوجود اضداد ذاتية ويمكن الكشف عنها في مصل المريض، وأهمها الاضداد لخلية الجزيرات Islets cell antibody (ICA) والاضداد الذاتية لمضاد حامض الكلوتاميك ديكاربوكسيليت Anti-glutamic acid decarboxylate (anti GAD) والاضداد للانسولين Insulin antibody (IA) التي تميز عملية المناعة الذاتية مع تحطم خلايا بيتا. هناك امراض مناعية ربما تكون مرتبطة مع داء السكري– النوع الاول مثل مرض Graves disease ومرض Hashimoto’s disease ومرض التهاب الغدة الدرقية Thyroiditis ومرض أديسون Addison's disease (Atkinson and Maclaren, 1994).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اظهرت اغلب الدراسات ان داء السكري– النوع الاول يكون شائعاً ويصيب الاطفال والمراهقين, ويوثر سنوياً في اربعة ملايين من شعوب العالم مع كلفة تصل إلى 160 مليون دولار أمريكي تنفق جميعها على الأغراض العلاجية والعناية الطبية وزيادة هذا الداء يؤثر بشكل كبير في صحة ودخل المجتمع (Forouhi and Wareham, 2006). الإصابة لمدة طويلة بداء السكري تصاحبها مضاعفات وتطورات خطيرة مثل تلف شبكية العينRetinopathy التي تؤدي إلى ضعف في النظر ثم العمى Blindness, والمرض الكلوي Nephropathy الذي يؤدي إلى العجز الكلوي Kidney deficity, وامراض عصبية محيطية او مركزية تؤدي إلى تقرحات القدم والبتر Amputation وضمور المفاصل Charcot joints الذي قد يصاحبه زيادة خطر الاصابة بمرض وعائي قلبي Cardiovascular ووعائي محيطي Peripheral vascular ووعائي الشوكي Cerebrovascular مع اضطرابات معوية معدية حادة (Cooke and Plotnick, 2008). العلاج الرئيس للداء يتم من خلال تعويض المريض بهرمون الانسولين المفقود نتيجة الضرر الحاصل لخلايا بيتا في جزيرات البنكرياس المنتجة له, ويعطى العلاج اما بشكل حقن انسولين تحت الجلد Subcutaneously كعلاج رئيسي للمرضى المصابين بالنوع الاول وتكون محسوبة ويومية (Hiersch, 1999), او من خلال ادوية منظمة للسكري تعطى بشكل حبوب ويكون تناولها عن طريق الفم (فموي) (Bergerot and Fabien, 1994), او تعطى عن طريق الانف (انفي) Intranasally للانواع الاخرى من امراض داء السكري (Harrison and Dempsey-Collier, 1996).

تمثل الحركيات الخلوية Cytokines دوراً مهماً في حث او تفاقم داء السكري– النوع الاول, من خلال آليات مباشرة او غير مباشرة تقود إلى تحطم خلايا بيتا المنتجة للانسولين, ويكون دورها المباشر من خلال فعالية الخلايا السمية Cytotoxic T (Tc)، لكن دورها غير المباشر يكون من خلال فعالية ووظيفة

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الخلايا قبل الالتهابية Proinflammatory cells والخلايا الالتهابية Inflammatory cells. وتلعب الحركيات الخلوية دوراً وسطياً في تنظيم الاستجابة المناعية وان انتاجها من قبل الخلايا المناعية يعتمد على عوامل عدة مثل الإصابة Infection، الالتهاب Inflammation، تأثير الهرمونات Hormonal effects كما ان له علاقة بظاهرة التعدد الشكلي للجين Gene polymorphism (Daneshamandi *et al.*, 2008). ان امراضية Pathogenesis داء السكري لها علاقة بالوسيط IFN-γ المنتج من قبل الخلايا التائية المساعدة النوع الاول Th1، بينما الحماية من هذا المرض فله علاقة مع خلية Th2 التي تنتج الوسائط من الحركيات الخلوية مثل الحركي الخلوي الرابع Interleukin-4 (IL-4) والحركي الخلوي العاشر Interleukin-10 (IL-10) (Pauza *et al.*, 1999 ; Phillips *et al.*, 2001 ; Sharif *et al.*, 2002).

يمثل نظام مستضد البيضاويات Human Leukocyte Antigen (HLA) ويسمى ايضاً بمعقد التوافق النسيجي Major histocompatibility complex (MHC) دوراً رئيساً في وراثة داء السكري- النوع الاول مع وجود علاقة للخلفية الوراثية للمصابين بهذا الداء, وان خطورة وتطور الداء تكون مرتبطة بوساطة معقد HLA الذي يكون مكافئاً لمعقد التوافق النسيجي على الذراع القصير لكروموسوم رقم 6 بمسافة 21.1-21.3 (Noble and Vales, 2011). معقد HLA يشفر عن اكثر من 200 جين لها علاقة بالأستعداد للأصابة، وان الدراسات تؤكد وجود اربعة مواقع وراثية مرتبطة بمسببات الداء وحوالي 40 موقعاً لها علاقة بخطر الإصابة بداء السكري- النوع الاول (Barrett *et al.*, 2009).

لظاهرة تعدد الأشكال المظهرية للجين دور في تنظيم تعبير الحركيات الخلوية، فعلى سبيل المثال ان استبدال القاعدة النايتروجينية C بالقاعدة النايتروجينية T في الموقع 590- للجين *IL-4* يسبب اختزالاً

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

في تعبير جين *IL-4*، بينما النمط الوراثي TT يزيد من تنظيم هذا الحركي الخلوي (Kamali-Sarvestani *et al*., 2005). ان الحركي الخلوي IL-4 ينتج من قبل خلايا Th2 ويثبط المناعة الخلوية Cellular immunity، لذلك يقلل من خطر تحطم خلايا لانكرهانس Langerhanse cells (Bid *et al*., 2008).

الحركي الخلوي Interleukin-10 (IL-10) 10 هو حركي خلوي متعدد الوظائف Pleiotropic له تأثيرات مختلفة في مكونات معظم انواع خلايا الدم Hematopoietic cell types (Moore *et al*., 2001). داء السكري– النوع الاول في الانسان يتسبب بوساطة فقدان التنظيم للجهاز المناعي مؤدياً إلى استجابة واطئة Hyporesponsiveness لخلايا T المساعدة النوع الثاني Th2 وكذلك تفعيل خلايا T المساعدة المؤثرة النوع الاول Effector Th1. هناك دليل على انخفاض وظيفة خلايا Th2 وبذلك يقلل من انتاج IL-10 بدلاً من التفعيل المفرط لخلايا Th1 في الدم المحيطي Peripheral blood للاشخاص المصابين بداء السكري (Szelachowska *et al*., 1998). هناك تقريباً 75% من التباين في الحركي الخلوي IL-10 ويكون محدداً وراثياً (Westendrop *et al*., 1997)، فضلاً على ان هناك ثلاث من عديد التكوين وحيد النيكلوتيد Single nucleotide polymorphism (SNP) في محث Promoter لجين *IL-10* عند المواقع (G/A) 1082–، (C/T) 819– و(C/A) 592– (Urcelay *et al*., 2004).

قد وصف الحركي الخلوي Interleukin-17 (IL-17) حديثاً, ويعد جسراً بين تكيف ونشوء الأجهزة المناعية, وشخصت 6 عوائل من IL-17 (IL-17A-F) و 5 مستقبلات من IL-17RA - IL-17RE (Kolls and Linden, 2004 ; Kawaguchi *et al*., 2004). الحركي IL-17A و IL-17F مسؤولة عن الفعالية المرضية Pathogenic activity لخلايا Th17 (Rutitzky *et al*., 2005).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

يعد بروتين عامل تحول النمو- بيتا Transforming growth factor –β1 (TGF-β1) من البروتينات الثنائية المتماثلة Homodimeric protein الذي يشفر لهُ جين يقع على الذرع الطويل للكروموسوم التاسع عشر 19q13 (Fujii *et al*., 1986)، ويوجد على الأقل سبعة أشكال مظهرية من هذا البروتين ولكن أثنان منهم شخصا بان لهما علاقة بتعدد الأشكال المظهرية، كما ان لهما علاقة ايضاً بالتباينات بين الأفراد على مستوى انتاج هذا البروتين. هذه الأشكال المظهرية تقع في الموقع +869*C/T التي تغير الشفرة الوراثية العاشرة Codon 10 (Leu → Pro) وفي الموقع +915*G/C التي تغير الشفرة الوراثية الخامسة والعشرون Codon 25 (Arg → Pro) (Awad *et al*., 1998). ان الزيادة والنقصان في انتاج بروتين TGF-β1 قد ارتبط بعدد من الامراض من ضمنها التصلب العصيدي Atherosclerosis وامراض التليف Fibrotic diseases في الكلية، الكبد والرئة (Blobe *et al*., 1998). ان عديد التكوين وحيد النيكلوتيد Single nucleotide polymorphism (SNP) في الجين *TGF-β1* مرتبط بزيادة احتمالية الإصابة بمرض اعتلال الكلية السكري Diabetic nephropathy (DN)، كما وثق بان جين *TGF-β1* يشترك في تفاقم انخفاض النمو الكلوي Renal hypotrophy وكذلك في تجمع المادة الخارج خلوية Extracellular matrix في مرضى داء السكري (Ten and Hill, 2004).

يعد بروتين الانترفيرون-كاما Interferon-gamma (IFN-γ) الذي يعرف ايضاً بانترفيرون النوع الثاني Type II interferon او عامل تفعيل الملتهمات الكبيرة Macrophage-activating factor (MAF) من الحركيات الخلوية الناتجة من خلايا T المساعدة النوع الاول(Th1) Type 1 helper cells والذي يدعم الجهاز المناعي لانجاز التحلل الخلوي للخلايا المستهدفة وكذلك وثق بانه يزداد في مرضى داء السكري (Stalenhoef *et al*., 2008). يعتقد في تعدد الأشكال المظهرية في الانترون الاول Intron-1

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

لجين *IFN-γ* بان له تاثير في مرض المعقد المناعي Immune complex disease، والذي شخص بواسطة عدم التوازن في التنظيم المناعي Immunoregulatory systems (Cantor *et al*., 2005).

تعد هذه الدراسة المناعية الوراثية ذات اهمية كبيرة لمرضى داء السكري– النوع الاول في العراق، إذ ان العراق يفتقر لكثير من الدراسات لاسيما في جانب التعدد الشكلي المظهري Polymorphism للجينات المسببة للامراض الوراثية وامراض المناعة الذاتية Autoimmune diseases. استعملت في الدراسة تقانة نظام الممانعة للتضخيم Amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) لتحليل التعدد الشكلي للطراز الوراثي في الفرد باستعمال بادئات خاصة ويتم من خلالها تحديد الأليلات مع حساب تكراراتها في الجين للعينات المدروسة (Duta-Cornescu *et al*., 2009) وتهدف الدراسة إلى:

1. قياس مستوى تركيز بعض بروتينات الحركيات الخلوية Cytokines وهي IL-4، IL-10، IL-17A، TGF-β1 و IFN-γ في مصول عينات مرضى داء السكري – النوع الاول ومقارنتها مع العينات القياسية.

2. تعيين تعدد الاشكال الوراثية للجينات المدروسة وهي *IL-4* -590 (C>T)، *IL-10* -592 ، *IL-10* -1082 ، *IL-17A* ، *IL-17F* ، *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T)، *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) و*IFN-γ* +874 T/A بأستعمال تقانة الممانعة للتضاعف ARMS-PCR وتفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) بعد عزل الدنا DNA من العينات المدروسة لمعرفة مدى العلاقة بين الانماط الوراثية للجينات وداء السكري– النوع الاول واستعمالها كمؤشرات مرتبطة مع المرض.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3. تشخيص محفز الجين IL-10 في الموقعين الطافرين 592-، 1082- باستعمال طريقة التسلسل التتابعي للدنا المتضخم بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وبستعمال جهاز التحليل الوراثي Genetic analyzer.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

((الفصل الثاني))

2. استعراض المراجع Literature review

2-1: تعريف داء السكري وتشخيصه Definition and diagnosis of Diabetes

ان داء السكري يمثل مصطلحاً شاملاً يجمع اكثر من مرض واحد وهو حصيلة اضطرابات ايضية لفرط الكلوكوز مع اضطرابات في ايض الكاربوهيرات والبروتينات والدهون. يزداد تطور السكري بسبب تحطم خلايا بيتا الفارزة لهرمون الانسولين في البنكرياس، مما ينتج عنه نقصاً او توقفاً في انتاج الانسولين (WHO, 1999). قدرت منظمة الصحة العالمية لمرضى داء السكري في الولايات المتحدة بان هناك اكثر من 220 مليون شخص في العالم مصاب بهذا الداء, وبصورة تقريبية فان هناك 1.1 مليون حالة وفاة على مستوى العالم مرتبطة بداء السكري سنوياً, واكثر من 5 مليون حالة غير مشخصة, وحوالي 54 مليون لديهم بداية داء السكري او معرضين للإصابة بهذا الداء (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases,2008). عند الإصابة بالسكري فان الكلوكوز الزائد يترشح من الدم بوساطة النبيبات الكلوية بشكل اكثر مما يعاد أمتصاصه ويخرج مع البول. التراكيز العالية للكلوكوز في البول تؤدي الى تأثير تناضحي يقلل من اعادة امتصاص الماء بوساطة الكليتين مسببة فرطاً في البول. يحفز فقدان الماء في الدورة الدموية العطش لدى المرضى المصابين بداء السكري مما يسبب لهم زيادة في البول وعطش شديد، كذلك فقدان الكلوكوز في الدم يسبب ضعفاً Weakness ونحولاً Fatigue وفقدان الوزن وزيادة الشهية Appetite increased (Polyphagia)، مما يؤدي الى مضاعفات خطيرة مثل سكر البول Glucouria وانعدام الرؤية Blurred vision والنحافة والتشنج Cramps وامراض الفطريات الجلدية

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Candidiasis (Bakker *et al*., 2013) ، والالتهابات Inflammations وان اكثرها عرضة هي الالتهابات البولية والمهبلية Vaginal and urinary (Katavetin, 2009).

يوجد عاملان مهمان ومهددان لحياة المرضى بداء السكري هما فرط الكلوكوز Hyperglycemia والحامضية Acidosis (زيادة حموضة الدم). ان نقص الانسولين إذا لم يعالج يؤدي الى فرط الكلوكوز الشديد وزيادة في تحطم الدهون مع زيادة تحرير متوسط الأحماض الدهنية من الانسجة الدهنية Adipose tissue. ان اكثر الأحماض الدهنية الزائدة في الكبد تتحول الى حامض beta-Ketoacids hydroxybutyric acid وحامض الخليك Acetoacetic acid، فالتحرر الزائد للأحماض الدهنية والكيتواسد من انسجة العضلات والكبد يرفع مستوى حامضية الدم (خفض الأس الهايدروجيني pH للدم). ان اتحاد فرط الكلوكوز والحامضية يسمى السكري الكيتوني الحامضي Diabetic ketoacidosis الذي يؤدي الى تعقيدات خطيرة تؤدي الى الغيبوبة Coma ثم الموت Death (Wajchenberg, 2007). هناك دراسة قد اظهرت بان فرط الكلوكوز يسبب جهداً مؤكسداً في الانسجة التي تكون حساسة لتعقيدات داء السكري متضمنة الأعصاب المحيطية (Ziegler and Sohr, 2004)، وأبرز التعقيدات الرئيسة خطورة هي الناتجة من ارتفاع كلوكوز الدم مع زيادة نسبة حامض الكيتون مسببة أعتلال شبكية العين Retinopathy, وان ارتفاع مستوى سكر الدم يؤدي الى تحطم الاوعية الدموية حول شبكية العين التي تودي الى ترسيب البروتينات والدهون مكونة ترسبات تتداخل مع الرؤية, كذلك الاوعية الدموية المتحطمة سوف تصبح غير فعالة في نقل الاوكسجين الى الشبكية مما يسبب التلف في شبكية العين (Bakker *et al*., 2013)، كذلك ان فرط الكلوكوز يؤدي الى امرض كلوية تنتهي بالعجز الكلوي, وكذلك يسبب امراضاً عصبية محيطية ومركزية التي تقود الى تقرحات القدم والبتر وضمور المفاصل الذي قد يصاحبه زيادة خطر الإصابة بأمراض

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الوعائي القلبي والوعائي المحيطي والوعائي الشوكي مع اضطرابات معوية معدية (Cooke and Plotnick, 2008).

2-2: تصنيف داء السكري Classification of diabetes mellitus

هناك نوعان رئسيان لداء السكري هما داء السكري- النوع الاول وداء السكري- النوع الثاني لكن حسب منظمة الصحة العالمية في 2006 (WHO, 2006)، فقد صنف داء السكري على اربعة انواع هي:

1. داء السكري- النوع الاول Type1 diabetes Mellitus (T1DM)

هذا النوع هو مرض وراثي مناعي ذاتي, ويعد من اخطر الانواع ويحدث في مرحلة الطفولة ومع بداية مرحلة المراهقة ويسمى السكري المعتمد على الانسولين Insulin dependent diabetes mellitus, والاطفال المصابون بهذا النوع يتوقف لديهم انتاج هرمون الانسولين بسبب تحطم خلايا بيتا في البنكرياس, ويحتاجون الى حقن الانسولين كعلاج رئيس على مدى الحياة (Cernea and Herold, 2010). هذا النوع يقسم بصورة ثانوية على نوعين هما داء السكري- النوع الاول a ويشكل حوالي 90% من نسبة المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول, والنوع الآخر هو داء السكري- النوع الاول b ويشكل حوالي 9% من مرضى السكري- النوع الاول (Betterle and Zanette, 1984), وهناك نوع آخر من داء السكري يصيب الاطفال ويسمى Maturity onset diabetes of the young (MODY) ويحدث بسبب وجود قصور وظيفي لخلايا الجزيرات في البنكرياس ويرتبط هذا النوع مع ست طفرات مختلفة وغير مرتبطة مع المناعة الذاتية, ويشكل نسبة من 1-2% من الاطفال المصابين بمرض داء السكري.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ان التمييز السريري لهذه الانواع من داء السكري النوع- الاول يكون صعباً بسبب تشابه الأعراض السريرية لجميع هذه الانواع, لكن من خلال الاختبارات الوراثية يمكن الفصل بين هذه الانواع (Thanabalasingham and Owen, 2011).

2. داء السكري- النوع الثاني Type2 diabetes mellitus (T2DM)

يعد هذا النوع من الانواع الاكثر شيوعاً ويشكل حوالي 90-95% من جميع حالات امراض داء السكري, ويحدث بسبب قلة التقاط الكلوكوز في جسم المريض نتيجة مقاومة الانسولين او نقص الانسولين ويسمى داء السكري غير المعتمد على الانسولين Non-Insulin dependent diabetes mellitus. مرضى داء السكري- النوع الثاني لايشخص مرضهم إلا بعد مدة طويلة وحتى الأعراض السريرية تكون طفيفة, والمرض يكون مرتبطاً بصورة قوية مع السمنة وتقدم العمر وتاريخ العائلة مع المرض (American Diabetes Association, 2008).

3. سكر الحمل Gestational diabetes

أكتشف فرط الكلوكوز خلال مدة الحمل في بداية الأشهر الثلاث الثانية من الحمل وخلال هذه المدة يكون تركيز الكلوكوز عند الصيام وبعد الأكل اعلى عند مقارنته مع مستويات الكلوكوز عند المرأة الطبيعية غير الحامل، وبعد الولادة يرجع تركيز الكلوكوز الى الوضع الطبيعي لكن مع زيادة خطر تطور الإصابة الى مرض داء السكري- النوع الثاني (American Diabetes Association, 2008).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

4. انواع خاصة لمرض داء السكري Specific types of diabetes

ترتبط هذه الانواع بالعوامل الوراثية والمسببات المرضية المختلفة, فالاضطرابات الوراثية لداء السكري تقود الى ضعف في افراز الانسولين، بينما الطفرات الوراثية لمستقبل الانسولين تقود الى فرط في الانسولين, وهناك انواع من الهرمونات ذات عمل مضاد للانسولين مثال ذلك هرمون النمو Growth hormone، الكورتيزول Cortisol، الكلوكاكون Glucagon والأبنفيرين Epinephrine, وان اية زيادة في هذه الهرمونات تؤدي الى خطر الإصابة بداء السكري، فضلاً عن الاضطرابات الوراثية والافرازات الغدية غير الطبيعية, كما ان الإصابات والالتهابات المرضية في البنكرياس قد تسبب الإصابة بمرض داء السكري (American Diabetes Association, 2008).

2-3: وبائية داء السكري- النوع الاول Epidemiology of T1D

الدراسات الوبائية اظهرت اختلافات بين شعوب العالم في متوسط الإصابات بداء السكري- النوع الاول وضمن المواقع الجغرافية المختلفة، ففي الشعوب الاوربية والقوقازية كانت النسب عالية وقد سجلت معدل 100000/40/سنة و100000/37.8/سنة، وعلى التوالي (Hasham and Tomer, 2011), بينما في شعوب فنزويلا والصين فقد اظهرت نسباً قليلة إذ سجلت معدل 100000/0.1/سنة و100000/0.4/سنة, وعلى التوالي (Wild *et al*., 2004)، اما في فلندا فاظهرت نسباً عالية جداً، إذ سجلت معدل 100000/64.2/سنة لعام 2005 (Harjutsalo *et al*., 2008).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ان تطور داء السكري– النوع الاول في الولايات المتحدة يختلف باختلاف العمر والأصل والعرق والموقع الجغرافي, فقد اظهرت النتائج للعينات المدروسة في عام 2003م لدى الأمريكان البيض ومن الأصل الأسباني معدل 19.0/100000/سنة ضمن الأعمار من 10–14 سنة, بينما اظهرت معدلات أقل لدى الأمريكان السود من الأصل الأفريقي، إذ سجلت معدل 15.7/100000/سنة وبالمقارنة مع القوقازيين إذ سجلت معدل 23.6/100000/سنة ضمن الأعمار نفسها (Bell, 2009).

لقد اصدرت منظمة الصحة العالمية دراسة عالمية لداء السكري الخاص بالطفولة وقد توقعت حدوث زيادة في نسبة الإصابة بهذا الداء من النوع الاول (Karvonen *et al*., 2000), ويتوقع حصول زيادة في انتشار داء السكري– النوع الاول بنسبة تصل الى 2–5% لدى الاطفال والمراهقين التي تتراوح اعمارهم لغاية 18 سنة في الولايات المتحدة (Maahs et al., 2010), كما قدرت الدراسات حصول زيادة في العام 2025م مقارنة بالنسب المسجلة في عام 2003م, وتتوقع حدوث زيادة لدى الاطفال الأسويين قد تصل نسبتها الى 91%, بينما في أطفال قارة اوربا فقد تتوقع حصول زيادة تصل نسبتها الى 16%, اما أطفال قارة أفريقيا فتتوقع حصول زيادة كبيرة بالمرض تصل نسبتها الى 98%, بينما انخفضت التوقعات بالإصابة لدى أطفال قارة أستراليا وقارة أمريكيا الشمالية لتصل نسبتها الى 59% لكلا القارتين, بينما اظهرت النتائج توقع حصول زيادة كبيرة بالإصابة بهذا المرض لدى أطفال قارة أمريكا الجنوبية قد تصل نسبتها الى 97% (Richard, 2004).

اختلفت النسب في الدول العربية بين العالية والمنخفضة، إذ اظهرت الدراسة على أطفال الشعوب العربية تبايناً ملحوظاً في العام 2000م وبأعمار من 0–15 سنة, إذ سجل اعلى معدلاً في مصر إذ بلغ

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

100000/36.4/سنة, بينما انخفضت النتائج في سوريا وسجلت معدل 100000/18.4/سنة, وفي الجزائر فقد سجل معدل 100000/27.3/سنة, اما في أطفال العراق فقد سجل معدلاً أقل إذ بلغ 100000/14.2/سنة, وفي السعودية قد سجل معدل 100000/10.9/سنة, بينما أقل نسبة قد سجلت في الصومال وقطر والبحرين وبمعدل 0.1 و0.4 و100000/0.5/سنة على التوالي (Abdullah, 2005). توضح البيانات ان 400 منطقة متغيرة من دول العالم يكون حدوث داء السكري- النوع الاول بشكل مغلق في شعوبها وان هذه التغيرات تكون غير شائعة للمرض، بمعنى ان التغير الدراماتيكي يكون مرتبطاً مع توزيع التكرارات للأليلات في المجتمعات التي لديها استعداد للإصابة بداء السكري- النوع الاول (Wild *et al.*, 2004).

2-4: علاج وامراضية داء السكري- النوع الاول

Therapeutic and pathogenesis of TD1M,

داء السكري- النوع الاول هو مرض مناعي ذاتي مزمن Chronic ويظهر لدى الاطفال الذين لديهم استعداد وراثي للإصابة بالمرض او نتيجة لمحفزات بيئية (Belle *et al.*, 2011). فرط الكلوكوز المزمن يكون مرتبطاً مع المرض لمدة طويلة ناتجاً عنه قصور وظيفي في عمل أعضاء الجسم وان أسرع الأعضاء تأثراً هي تلف شبكية العين Retinopathy مع فقدان جزئي للنظر، امراض كلوية Nephropathy مؤدية الى عجز كلوي وامراض عصبية Neuropathy مع خطر تقرح القدم والبتر وامراض المفاصل Arthritis وامراض قلبية وعائية ومعدية وعائية Gastrointestinal, Genitourinary and Cardiovascular,

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

كذلك امراض تناسلية مع قصور وظيفي جنسي Sexual dysfunction (American diabetes association,2004).

يكون الجانب الوراثي مهماً في تطور داء السكري- النوع الاول, ويلاحظ ان معدل ظهور المرض لدى الاطفال التوائم احادية الزيجة (البيضة نفسها) Monozygotic والمتطابقة وراثياً بنسبة اعلى من التوائم ثنائية الزيجة (بيضة مختلفة) Dizygotic غير المتطابقة وراثياً (Metcalfe *et al*., 2001). اظهرت النتائج في دراسة تضمنت 107 من الاطفال التوائم المصابين بداء السكري- النوع الاول بان معدل التطابق الوراثي يكون مرتبطاً مع المرض بنسبة تتراوح بين 13-23% لدى التوائم أحادية الزيجة, بينما اظهرت في التوائم ثنائية الزيجة تطابقاً وراثياً ومرتبطاً مع المرض بنسبة بلغت 3-5% (Kaprio *et al*., 1992). وفي دراسة اخرى اظهرت نسبة ارتباط مع المرض بلغت 43% لدى التوائم المتطابقة وراثياً، بينما اظهرت نسبة 7% لدى التوائم غير المتطابقة وراثياً, كما اظهرت تلك الدراسة ترددات عالية مرتبطة مع خطر الإصابة بالمرض لدى الاطفال الأقارب مقارنة مع الاطفال غير الأقارب وكانت النسبة 55% لدى اقارب الدرجة الاولى بالمقارنة مع نسبة 0.4% لعموم المجتمع (Van der Werf *et al* ., 2007).

دعت زيادة متوسط الإصابة بداء السكري- النوع الاول الباحثين الى دراسة الانماط الوراثية للمرض, واظهرت النتائج توزيعاً متساوياً للجين HLA-class-DQ بين الشعوب منها الروس والفنلنديين مرتبط مع المرض (Kondrashova *et al*., 2005). ان خطر تطور داء السكري بين القوقازيين يشكل نسبة 5-6%, ولدى أقارب الدرجة الاولى يتطور لديهم المرض الى حوالي 33%, وهذا يتوقف على توزيع الطرز الوراثية المرتبطة مع خطر الإصابة بداء السكري- النوع الاول (Kelly *et al*., 2001). بداية الإصابة بداء

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

السكري– النوع الاول تكون بتحطم خلايا بيتا وان جزيرات البنكرياس الاخرى تبقى حاوية على خلايا بيتا غير المحببة، أي خلايا غير طبيعية مع نواة متضخمة. ان أعراض داء السكري– النوع الاول دائماً ما يكون ببداية حادة التي تعكس النقص الكلي في افراز هرمون الانسولين بسبب الفقدان الكبير لخلايا بيتا وان عدم تناول العلاج فالمرض سوف يتطور ويصاحبه ارتفاع حاد في أحماض الكيتون مع زيادة في حامضية الدم الذي يؤدي الى تعقيدات اخطر قد تنتهي بالاغماء او توقف النبض ثم الموت (Leslie *et al*.,1999).

تأخذ الاصابات الجرثومية Microbial infections دوراً في الامراضية بداء السكري– النوع الاول، فالحصبة الألمانية Rubella مرتبطة بصورة قوية للإصابة بالمرض (Lammi *et al*., 2005). كذلك الإصابات الفايروسة قادرة على احداث الضرر في خلايا الجزيرات في البنكرياس مثل فايروس Coxsackie b4 virus (Jaidane and Hober, 2008)، وكذلك الفايروس المضخم للخلايا في الانسان Human cytomegalovirus الذي يصيب الجزيرات ويعمل على تضخم خلايا بيتا، كما ان الفايروسات العجيلية Rotavirus التي اكتشفت عُدة فايروسات مسببة لداء السكري (Lammi *et al*., 2005). فرط الكلوكوز بالدم ناتج من نقص في افراز هرمون الانسولين او عمل الانسولين او كلاهما ويظهر اعراضاً حادة ويكون مهدد للحياة (Kyvik *et al*., 2004). يتضمن العلاج الرئيسي للمرض حقن الانسولين تحت الجلد وبشكل يومي لتنظيم مستوى السكر بالدم (Couri *et al*., 2006).

تستعمل المناعة الذاتية بشكل كبير كمؤشر حيوي باستعمال مصل الدم, كما استعمل العلماء الزراعة النسيجية في التجارب المختبرية لغرض تجديد كتلة خلايا بيتا المتضررة بوساطة زرع الجزيرات في البنكرياس (Belle *et al*., 2011). استعملت الخلايا البنائية كالخلايا الجذعية الجنينية Embryonic

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

stem cells في تجديد خلايا بيتا المتضررة, وكذلك استعملت العديد من الخلايا المولدة الاخرى لغرض توليد خلايا بيتا, ومن أهم هذه الخلايا هي الخلايا الجذعية البنكرياسية Pancreatic stem cells, الخلايا الجذعية المكونة للدم Hematopoietic stem cells, الخلايا الجذعية المتوسطية Mesenchymal stem cell، الخلايا البيضية الكبدية Hepatic oval cells, وخلايا بيتا الناضجة Mature β cells التي اظهرت كفاءة في اعادة توليد خلايا بيتا، علماً بانه ما زالت الدراسات جارية الى الوقت الحاضر في هذا المجال (Couri *et al*., 2006).

2-5: المناعة ومرض داء السكري Immunity and diabetes mellitus

2-5-1: دور المناعة الخلطية في داء السكري- النوع الاول

Role of humoral immunity in Type1 diabetes mellitus

2-5-1-1: الاضداد الذاتية Autoantibodes

الاضداد هي مضادات مناعية موجودة بصورة حرة في مجرى الدم, وتنتج من قبل الخلايا البائية B Cells. وظيفة الجسم المضاد هي المساهمة في منع الجراثيم من الدخول الى خلايا الجسم او منع نشاطها من خلال الالتصاق بها او تقوم بعملية ازالة الأجسام الغريبة من خلال تحفيز الخلايا البلعمية او تدمير المستضدات الغريبة بصورة مباشرة عن طريق تحفيز النظام المتمم او عن طريق الالتصاق بمستقبلات الأضداد على سطح الخلايا المناعية (Elgert, 2009). في امراض المناعة الذاتية تسلك وظائف الجسم المضاد مسلكاً عكسياً, فتهاجم خلايا الجسم ويحدث ذلك عندما يفشل الجهاز المناعي في معرفة البصمة الجينية الخاصة بكل خلية, مؤدياً الى خلل في وظائفه فيهاجم خلايا الجسم على انها خلايا غريبة, وقد يؤدي

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ذلك الى حدوث اضرار ومضاعفات خطيرة في الجسم. هذا الخلل المناعي قد يحدث في عضو واحد او مجموعة أعضاء من الجسم وقد يؤدي الى حدوث مرض او مجموعة امراض تسمى امراض المناعة الذاتية Autoimmune diseases (Greidinger and Hoffman, 2001).

تشير الدراسة الى ان الاضداد الذاتية الموجودة بصفة طبيعية في الانسان ربما تستعمل كمؤشر جديد في تشخيص المرض المناعي في بداية ظهوره وبصورة مبكرة, كذلك يمكن ان يخضع لهذا التشخيص كل أفراد العائلة. تحسس الاضداد الذاتية وارتباطاتها مع العوامل الوراثية والمناعة الذاتية الخلوية تأخذ المساحة الرئيسة الأكبر في جميع الدراسات لداء السكري–النوع الاول (Pietropaolo *et al*., 2012). خلايا B اللمفاوية CD5-B Lymphocyte في الانسان تنتج أجساما مضادة ذاتية والتي ترتبط مع المستضدات الذاتية وغير الذاتية وترتفع بصورة قليلة في البالغين الاصحاء. توجد الاضداد الذاتية لمستقبل مضاد الانسولين بمستويات عالية في الدورة الدموية لمرضى داء السكري– النوع الاول وتعمل كمؤشر لفعالية المناعة الذاتية وتحطم خلايا بيتا (Berwary *et al*., 2013).

يُعد أختبار الاضداد لدى الاطفال كافياً لتشخيص داء السكري– النوع الاول دون الحاجة الى تشخيص وراثي (Kulmala *et al*., 2000). الاطفال الأقل من 14 سنة عمراً تستعمل لديهم الاضداد الذاتية Glutamic acid decaboxylase (GAD) ، Insulin Autoantibody (IAA) و Islet cell autoantibody (ICA) في الكشف عن داء السكري– النوع الاول والتي تمثل أجساما مضادة ذاتية مرتبطة مع خطر الإصابة بالمرض (Bingley *et al*., 1994). لقد وجد انه بعد عشر سنوات من الإصابة فان ثلث المرضى يبقى يمتلكون اضداد ذاتية لخلايا الجزيرات(ICA) , بينما ربع المرضى يبقون لديهم

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اضداداً ذاتية (GAD), واكثر من نصف المرضى يبقى لديهم اضداد ذاتية للـ (IA2) (Dabelea *et al*., 2011). يمتلك المرضى المصابون بداء السكري– النوع الاول نسبة 60–80% من الاضداد الذاتية ICA وIAA, لذلك فان الاضداد الذاتية مهمة في كشف خطر تطور داء السكري– النوع الاول (Hagopian *et al*., 1995)، كما ان تطور داء السكري–النوع الاول يكون مرتبطاً مع الاضداد الذاتية نوع GAD (Schmidli *et al*., 1994).

2–1–5–2: الاضداد الذاتية ضد الانسولين Insulin Autoantibody (IAA)

وصفت الاضداد الذاتية ضد الانسولين IAA لاول مرة من قبل العالم Palmer عام 1983م, وصنفت كاول الاضداد الذاتية لمستضدات خلايا بيتا في جزيرات البنكرياس (Palmer *et al*., 1983). تظهر الاضداد الذاتية للانسولين في الاطفال ضمن طور ما قبل السكري Pre-diabetes phase وتكون بشكل IAA, ودائماً ما تكتشف بصورة مبكرة عن الاضداد الاخرى المرتبطة بداء السكري– النوع الاول (Kimpimaki *et al*., 2001). الاضداد الذاتية ضد الانسولين IAA تكون من نوع IgG بشكل سائد, واظهرت هذه الاضداد الذاتية ارتباطاً قوياً مع خطر الإصابة بداء السكري النوع– الاول والمرتبط مع الجين HLA DR-4DQ8 (Knip *et al*., 2002). الاضداد للانسولين IAA تكون عالية جداً في الاطفال اليافعين وتصل نسبتها فوق 99% في الاطفال الذين يتطور لديهم المرض ضمن الأعمار 9–13 سنة ويتناقص بصورة متقدمة مع تقدم العمر (Williams *et al*., 1997). وبصورة تقريبية فان 40–70% من مرضى داء السكري– النوع الاول يظهرون اختبار موجباً للـ IAA والتي تعتمد على العمر والموقع السكاني

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

(Williams *et al.*, 2003)، بينما يظهر IAA نسبة 2.3% بين الاطفال الاصحاء (Schlosser *et al.*, 2004). من ناحية اخرى، لاحظ الباحثون بان مرضى داء السكري- النوع الاول ذو الاختبار الموجب للـ IAA يظهرون أعراضاً سريرية طفيفة (Holmberg *et al.*, 2006).

2-5-1-3: الاضداد الذاتية لخلية الجزيرة السايتوبلازمية Cytoplasmic islet cell antibody (ICA)

هي اضداد ذاتية وصفت لاول مرة عام 1974م في داء السكري- النوع الاول. اظهر الجسم المضاد الذاتي الـ ICA لدى المرضى العراقيين المصابين بداء السكري- النوع الاول نسبة 62.5% في المصل (Wahbi, 1998). الجسم المضاد الذاتي ICA قد وجدت نسبته مرتفعة الى اكثر من 90% لدى مرضى داء السكري المشخصين بطرائق حديثة. آلالية الأساسية والاولية لانتاج ICA غير واضحة لكن انتاجها لمدة طويلة ربما يعكس خللاً وراثياً متجذراً بالجهاز المناعي (Landin-Olsson *et al.*, 1989).

2-5-1-4: الاضداد الذاتية ضد انزيم الديكاربوكسيليز Glutamic acid Decarboxylase (GAD)

انزيم GAD هو انزيم مسؤول عن الصناعة الحيوية للناقل العصبي المثبط- كاما امينوبيوترك أسد γ-aminobutyric acid (GABA) , ويظهر فعالية كيميائية مناعية في الدماغ وجزيرات البنكرياس, وقد تم الكشف عنها بوساطة الترسيب المناعي لمستخلص جزيرة البنكرياس في المصل, ويوجد GABA في الانسان بنوعين هما GABA65 (65KDa) و GABA67 (67KDa) ويشفر بوساطة جينات *Gad*1

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

و*Gad2*، على التوالي (Erlander *et al*., 1991). يظهر انزيما GABA65 و GABA67 بشكل غني ووفير في الدماغ، لكن افراز انزيم GABA65 هو الذي يعبر الى خلايا بيتا البنكرياس في الانسان فقط والذي يمكن تميزه بوساطة مصل المريض المصاب بداء السكري- النوع الاول (Hagopian *et al*., 1993). اظهرت الدراسات بان كل من Gad و GABA يملكان دوراً مهماً كنواقل عصبية مثبطة في الخلايا العصبية، لكن دورها في البنكرياس غير معروف بصورة كبيرة. ان زيادة افراز GABA يضعف من أفراز الانسولين المحث بوساطة الكلوكوز, والذي يعد بانه مستضد ذاتي لداء السكري- النوع الاول, والاضداد الذاتية GADA التي اظهرت ارتباطاً قوياً مع الجين HLA-*DR*3-*DQ*2 وتكون اكثر تكراراً في النساء (Kinp *et al*., 2002). اظهرت الدراسات ان تعبير الاضداد الذاتية GADA يكون ما بين 50 الى 70% في مرضى داء السكري- النوع الاول, بينما اظهرت تعبيراً نسبة حوالي 2% لدى الاطفال الاصحاء (Notkins and Lernmark, 2001).

2-5-1-5: الاضداد لمستضد الجزيرة Islet Antigen IA-2

ان مستضد الجزيرة IA-2 قد شخص كمستضد مناعي ذاتي رئيسي مرتبط بداء السكري- النوع الاول (Lan *et al*., 1996). ان اختبار فعالية الاضداد بوساطة الراسب المناعي في المصل قد اظهر بان IA-2 يرتبط مع داء السكري- النوع الاول ويظهر بنسبة أكبر لدى الاطفال تحت عمر العشرين عاما. ان اكثر الاختبارات للمرضى قد أعطت نتائج موجبة للمستضد IA-2 ضمن الأعمار 10 سنوات (Holthofer, 2000). اظهرت النتائج فعالية كبيرة للمستضد IA-2 في مصل المرضى وقد سجلت نسبة

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

بلغت 66% لدى المرضى, بينما لم تسجل اية نسبة لدى الاطفال الاصحاء (Lan *et al*., 1996). وبصورة مشابهه فقد وجد ان نسبة 88% من المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول يحملون المستضد IA-2 ضمن المرضى المشخصين بالإصابة حديثاً, بينما سجلت نسبة 0.25% فقط بين الاطفال الاصحاء (Schlosser *et al*., 2004). المستضد IA-2 قد اقترح بان يكون مؤشراً في تمييز المرض في أختبارات المناعة الذاتية اكثر من الاضداد الذاتية الاخرى, وهذا ربما يعود الى ارتباطه القوي مع تكرار الجين HLA-*DR*4,*DQB*1*0302 والمرتبط مع المرض (Knip *et al*., 2002).

2-5-1-6: مستضد بروتين تايروسين فوسفاتيز

Protein Tyrosine Phosphatase (PTP)

هو بروتين يوجد في حبيبات خلايا بيتا لخلايا الجزيرات البنكرياسية في الانسان ويوجد ايضاً في خلايا الافراز الداخلي للغدد وخلايا الأعصاب, ويكون مرتبطاً مع مرضى السكري- النوع الاول, ويكون هذا المستضد مشابهاً للمستضد IA-2 (Solimena *et al*., 1996).

2-5-1-7: مستضد الزنك الناقل Zinc transporter 8 (ZnT8)

اكتشفَ مستضد الزنك الناقل حديثاً كمستضد ذاتي رئيس له علاقة بخطر الإصابة بداء السكري- النوع الاول (Wenzlau *et al*., 2007)، علماً بانه يساعد في تخزين الانسولين في خلايا بيتا

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

(Chimienti *et al*., 2004). وجد ان مستضد الزنك الناقل ZnT8 يستهدف بوساطة الاضداد الذاتية وتراوحت نسبته بين 60–80% في مرضى السكري– النوع الاول في بداية الإصابة بالمقارنة بأقل من 2% لدى الأشخاص الاصحاء وأقل من 3% من مرضى السكري– النوع الثاني. مستضد الزنك الناقل ZnT8 قد أكتشف بصورة مبكرة لدى الاطفال المصابين بداء السكري، ومن ناحية اخرى وجد مع الاضداد الذاتية الـ IAA و GADA لدى الاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول (Wenzlau *et al*., 2007). مستضد الزنك الناقل ZnT8 قد اقترح كمستضد ذاتي يسبب الإصابة بداء السكري– النوع الاول ويعود ذلك الى وجود اضداد ذاتية مع وجود خلايا T الفعالة ذاتياً مستهدفة المستضد الذاتي في مرضى السكري– النوع الاول (Dang *et al*., 2011).

2–5–2: المناعة الخلوية في مرضى السكري– النوع الاول

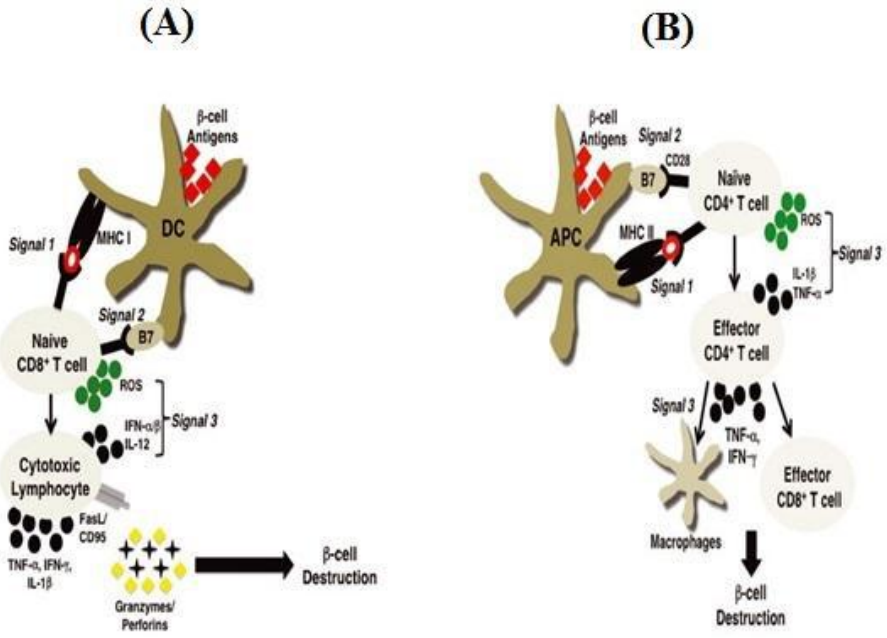
Cellular immunity in type1 diabetes mellitus

تؤدي المناعة الخلوية الذاتية دوراً رئيساً في حدوث وتطور داء السكري– النوع الاول والتي تتوسطها الخلايا التائية اللمفاوية الفعالة ذاتياً (Morran *et al*., 2008)، التي لوحظت في دم المرضى المصابين بداء السكري– النوع الاول (Alviggi *et al*., 1984). ان زيادة استجابة الخلية التائية الفعالة ذاتياً للمستضدات الذاتية قد شخصت بصورة مبكرة في المرضى المصابين بداء السكري– النوع الاول (Stadinski *et al*., 2010). آلالية المرضية الرئيسية لداء السكري– النوع الاول هي تحطم خلايا بيتا البنكرياسية التي تتوسطها الخلايا التائية الفعالة ذاتياً والتي تسبب التهاب الجزيرات المزمن Chronic insulitis (Pedicino *et al*., 2013). المناعة الخلوية الذاتية تنشط في حالة قبل السكري وتتلاشى مع

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

زيادة تحطم خلايا بيتا (Hummel *et al*., 2004), وفي بداية الإصابة للأشخاص المصابين بداء السكري– النوع الاول تظهر لديهم الخلايا التائية الفعالة ذاتياً ضد خلايا الجزيرات في البنكرياس وتكون على نوعين رئيسيين هما خلايا $CD8^+$T cells وخلايا $CD4^+$T cells مع ظهور للخلايا البلعمية الكبيرة Macrophages (Faustman and Davis, 2009). الخلايا السمية Cytotoxic cells ($CD8^+$T) تكون هي السائدة في حدوث وتطور المرض, وهذه الخلايا تصبح فعالة ذاتياً وتوجه ضد مستضدات خلايا بيتا, فضلا عن انها تعمل على حث الخلايا الدفاعية المختلفة التي تهاجم خلايا بيتا مثل خلايا الوحيدة Monocytes وخلايا البلعمية الكبيرة Macrophages وخلايا العدلة Neutrophil وجميعها موجودة في خلايا البنكرياس, كذلك تعمل هذه الخلايا على حث افراز وسائط سمية ضد خلايا بيتا مثل الحركيات الخلوية المتمثلة بالانترفيرون كاما IFN-γ وTNFa والانترلوكين IL-1 (Bach, 1994)، وعند ظهور الخلايا التائية اللمفاوية الفعالة ضد خلايا بيتا فانها تقيد او تكبح بصورة طبيعية بوساطة ميكانيكيات التنظيم المناعي والتحمل المناعي, ويحدث المرض عند فشل ألية او اكثر من آليات التنظيم المناعي وتسمح للخلايا التائية الفعالة ذاتياً ان توجه ضد خلايا بيتا وتسبب التحطم لهذه الخلايا ويظهر المرض (Rabinovitch and Pinzon, 1998) كما في الشكل رقم (1).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (1): آلالية التي تتوسطها المناعة الذاتية في تحطم خلايا بيتا في البنكرياس
A: التحطم المباشر لخلايا بيتا B: التحطم غير المباشر (Padgett *et al*., 2013)

تنتج الخلايا التائية من الانسجة الدموية Hemopoietic tissue لنخاع العظم Bone marrow وتهاجر الى غدة التوثة Thymus وتتطور فيها. غدة التوثة ونخاع العظم يمثلان الأعضاء اللمفاوية المركزية Center lymphoid organs, وان أغلب الخلايا اللمفاوية تموت في هذه الأعضاء وبعضها تتطور وتصبح قادرة على الهجرة الى الأعضاء اللمفاوية المحيطية مثل العقد اللمفاوية والطحال والخلايا الطلائية المرتبطة بالقناة المعدية المعوية Lymph nodes, spleen and epithelium associated lymphoid tissues in the gastrointestinal tract الخلية التائية التي تحمل مسقبل TCR

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

receptors ويكون مهماً لفعاليتها، إذ يعمل على حث استجابة الخلايا التائية من خلال الاتصال مع الخلايا المقدمة للمستضد Antigens presented cells (APCs) على جزيئة HLA (Alberts *et al.*, 2002).

ان تنظيم الخلايا التائية يكون عن طريق انتخابين, انتخاب موجب وانتخاب سالب Positive and negative selection. في الانتخاب الموجب تكون الخلايا التائية قادرة على تسلم الاشارة، لذلك تسمى أشارات البقاء Survival signals، اما إذا كان استلام الاشارة بجاذبية عالية فان الأشارة سوف تحذف بوساطة الخلايا المقدمة للمستضد APCs في عملية يشار اليها الانتخاب السالب Negative selection (Boyman *et al.*, 2009). عند هذه الحالة فان أغلب المستضدات الذاتية في التوثة, وان الخلايا التائية المنفعلة ضد خلايا الذات ترتبط بشكل قوي مع انسجة التوثة وبذلك لا تستطيع مغادرة التوثة وبعدها تموت, وان بعض الخلايا اللمفاوية تموت نتيجة نقص او فقدان إشارات مستقبل الخلايا التائية بعملية تسمى الموت المبرمج Apoptosis (Rothenberg *et al.*, 2011). لوحظ ان بعض الخلايا التائية اللمفاوية المنفعلة للذات تغادر التوثة الاى الاعضاء اللمفاوية الثانوية وتظهر في الدم المحيطي في المرضى المشخص لديهم داء السكري– النوع الاول بصورة حديثة، ان الخلايا التائية اللمفاوية الفعالة في الدورة الدموية تبقى في حالة عدم استجابة ولكنها تحت ظروف معينة يلاحظ ارتباطها مع الاضداد الذاتية لخلايا بيتا المنتجة للانسولين في خلايا الجزيرات في البنكرياس (Hummel *et al.*, 2004). يظهر تقدم داء السكري– النوع الاول في الاطفال مناعة ذاتية مزمنة بوساطة الاضداد الذاتية المنتجة من الخلايا البلازمية لخلايا B cells الموجهه ضد الخلايا الفارزة للانسولين مؤدية الى قلة او اختفاء وظيفة خلايا بيتا وداء السكري سوف يظهر فرط الكلوكوز Hyperglycemia (Stadinski *et al.*, 2010).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

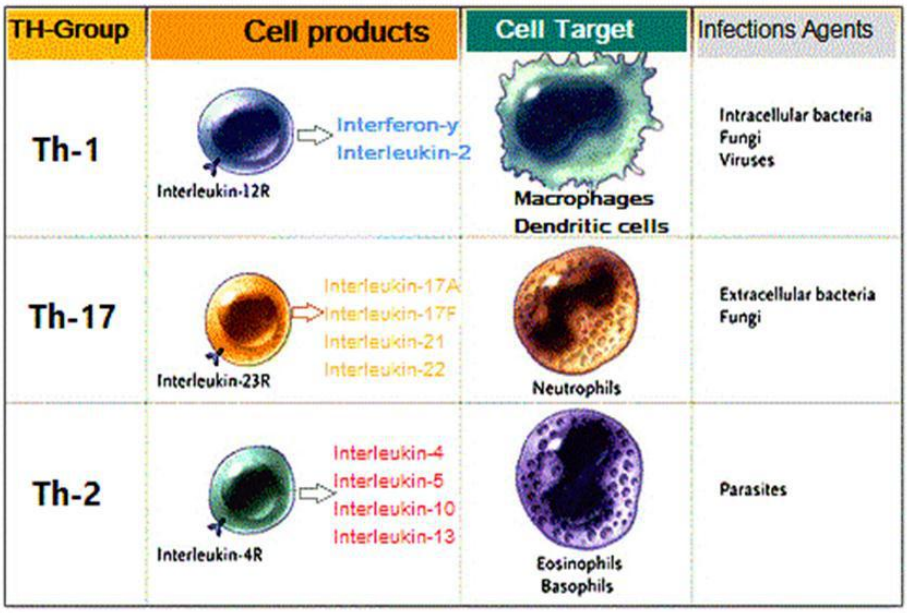
2-6: دور الحركيات الخلوية في داء السكري- النوع الاول

The Role of cytokines in type1 diabetes mellitus

تعرف الحركيات الخلوية Cytokines على انها وسائط حركية وهي عبارة عن بروتينات ذائبة ذات سلاسل ببتيدية منخفضة الوزن الجزيئي تتراوح بين 5-20 كيلودالتون، وتعد وسائط مهمة تشترك مع مظاهر الاستجابات المناعية قبل وبعد حدوث الالتهاب لتحث الخلايا على التفاعل بشكل دائم مع المسببات المرضية (Dinarello, 2007). تنتج الحركيات الخلوية Cytokines من قبل مدى واسع من خلايا البيض Leukocytes وغير البيض Non leukocytes وتعمل على تسهيل الاتصال بين الخلايا كما تعمل على التمايز والتكاثر لخلايا المناعة المؤثرة, وفعلها اما يكون ذاتياً على الخلية ذاتها Autocrine او على الخلايا الاخرى المجاورة الهدف أي جنبياً Paracrine action او يكون فعلها هرمونياً Indocrine action على الخلايا وبمسافات بعيدة (Doan *et al*., 2008).

في عام 1986م قدم كل من العالمين Mosmann و Coffman مفهوم الانواع المميزة للخلايا التائية المساعدة Th بالاعتماد على انواع الحركيات الخلوية التي تنتجها الخلايا التائية عندما تحفز الى التمايز, وان الخلية التائية تعد المصدر للعديد من الحركيات الخلوية, وبشكل رئيسي الخلايا المساعدة Th1 وخلايا Th2، فضلاً عن خلايا Th17, والتي تعمل على تنظيم وحث انتاج الحركيات الخلوية التي تحفز استجابة الخلايا المناعية ضد المسببات المرضية والأجسام الغريبة (Miossec *et al*., 2009)، كما هو مبين في الشكل (2).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



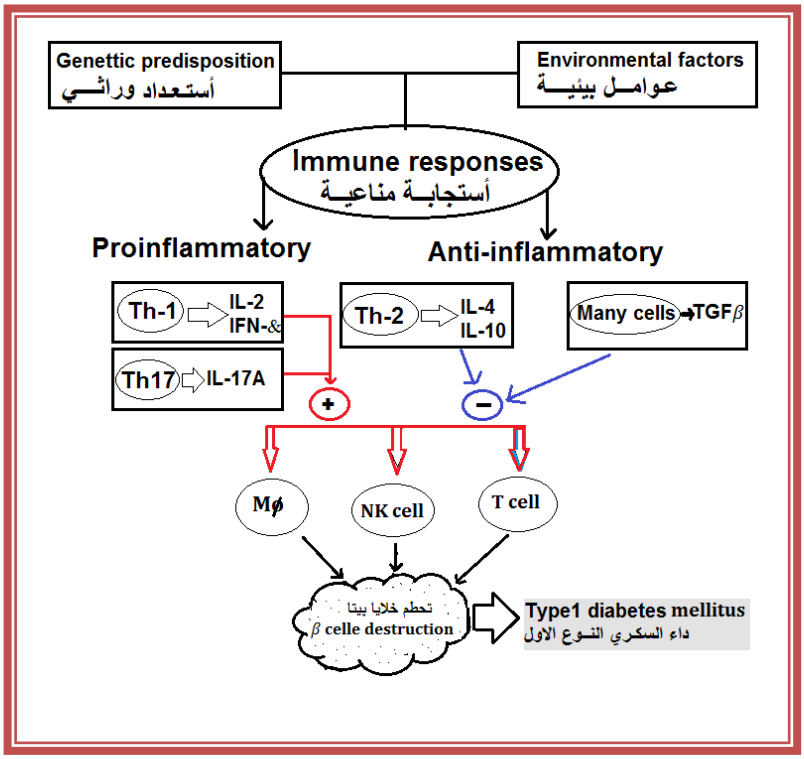
شكل (2): دور خلايا Th1 ، Th2 و Th17 في الانتاج والوظيفة لبعض الحركيات الخلوية (Miossec *et al*., 2009)

خلايا Th1 و Th17 لها دور مهم في تطور داء السكري– النوع الاول, وذلك عن طريق حث انتاج الحركيات الخلوية ومن خلال ميكانيكيات مباشرة او غير مباشرة تؤدي الى تحطم خلايا بيتا المنتجة للانسولين, ويكون دورها المباشر من خلال فعالية الخلايا التائية السمية T cytotoxic , لكن دورها غير المباشر يكون من خلال الفعالية والموقع والوظيفة المؤثرة للخلايا قبل الالتهاتية Proinflammatory cells .(Hakbani, 2002)

في داء السكري– النوع الاول وفي بداية تطور المرض دور الحركيات الخلوية في احداث المرض يكون من خلال حث فعالية خلايا Th1 الفعالة التي تعمل على انتاج الحركيات الخلوية بادئة الالتهات المتمثلة بالحركيات الخلوية IL-2 ، IFN-γ وTNFβ وهذه الحركيات الخلوية تعمل على حث الخلايا التائية السمية T cytotoxic والمتمثلة بخلايا $TCD8^{+}$ cells وهذه الخلايا تكون مؤثرة وفعالة في تحطم

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

خلايا بيتا, بينما يكون لخلايا Th2 دور تنظيمي في داء السكري- النوع الاول من خلال انتاج الحركيات الخلوية مثل IL-4 و IL-10 ودورها يكون مثبطاً للحركيات الخلوية بادئة الالتهات (Padgett *et al.*, 2013)، كما في الشكل (3).



شكل (3): دور الحركيات الخلوية المدروسة في تحطم خلايا بيتا التي توسطها الخلايا المناعية (الشكل مصمم من قبل الباحث)

2-7: الحركيات الخلوية بادئة الالتهات في داء السكري- النوع الاول

Proinflammatory cytokines in type1 diabetes mellitus

دور الحركيات الخلوية بادئة الالتهات Proinflammatory cytokines في مرضى داء السكري- النوع الاول تتميز من خلال دورها في تحطم خلايا بيتا المنتجة للانسولين الذي تتوسطه الخلايا

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

التائية الفعالة والخلايا البلعمية Macrophages (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001). تستحث الخلايا المناعية في بداية إصابة خلايا بيتا وتبدأ بافراز حركيات خلوية بادئة للالتهاب مثل IFN-γ، TNF-α و IL-1B, فضلاً عن عدد من الحركيات الكيميائية Chemochines التي تعمل على جذب الخلايا المناعية مثل الخلايا الشجيرية Dendritic cell والخلايا البلعمية Microphages وخلايا T اللمفاوية التي تهاجم وتحطم خلايا بيتا (Nakayama *et al*., 2005; Lieberman *et al*., 2003).

تحث الخلايا التائية الفعالة ذاتياً موت الخلية المستهدفة, اما بوساطة حث افراز الانزيمات المحطمة مثل Perforin و Granzymes, اومن خلال حث افراز الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب مثل IFN-γ، TNFα و IL-1B, او بزيادة التعبير عن مستقبلات Fab على سطح الخلايا المستهدفة, وجميع هذه العوامل تساهم في قتل خلايا بيتا في مرضى السكري- النوع الاول (Suk *et al*., 2001; Devin *et al*., 2000).

2-7-1: الحركي الخلوي Interlukin-17 (IL-17)

الحركي الخلوي Interleukin-17 (IL-17) هو بروتين سكري يتألف من 155 حامضاً أمينياً, ووزنه الجزيئي يتراوح ما بين 15-20 كيلو دالتون. ينتج هذا الحركي الخلوي بوساطة خلايا Th17 ووظائفه الرئيسة هي حث انتاج خلايا $CD4^+$T cell وانتاج الحركيات الخلوية قبل الالتهابية الاخرى، كما يحث على تمايز الخلايا المكونة للدم (Curfs *et al*., 1997). وصف IL-17 حديثاً وصنف على ستة حركيات خلوية تبدأ من IL-17A وتنتهي بالحركي الخلوي IL-17F, وصنف له خمسة مستقبلات هي IL-17RA -IL 17RE (Kolls and Linden, 2004 ; Kawaguchi *et al*., 2004). الحركي الخلوي نوع IL-17A

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وIL-17F التي تكون مسؤولة عن الفعالية المرضية Pathogenic activity للخلايا التائية المساعدة الفعالة (Dong, 2008)، كما ان الحركي الخلوي IL-17A له فعالية على حث خلايا $CD4^{+}$T cell لانتاج IL-2 وتحفيز الخلايا التائية على الانقسام, كما تكمن أهميته من خلال تأثيراته في الاستجابة المناعية, ويعمل على تحفيز الخلايا البلعمية Macrophages وخلايا العدلة Neutrophils على انتاج الحركيات الخلوية البادئة للالتهاب (Gaffen, 2009). يتم الدور البايولوجي للحركيات الخلوية IL-17A وIL-17F في تحطم خلايا بيتا عند بداية الإصابة ويحث زيادة الأستجابة المناعية لخلايا بيتا في البنكرياس, كما يزيد من فعالية الخلايا المتفرعة والخلايا البلعمية Macrophages وخلايا T الفعالة على افراز الحركيات الخلوية الالتهاتية مثل IL-1B ، TNFa وIFN-γ التي تعمل على الخلايا المناعية نحو موت خلايا بيتا (Jin and Dong, 2013).

أجريت دراسة مناعية لتقدير بعض الحركيات الخلوية وامراضية خلية T المنظمة في داء السكري- النوع الاول, وشملت الدراسة 71 مصاباً بداء السكري- النوع الاول, و60 شخصاً من الاصحاء تراوحت أعمارهم بين 14-56 سنة, وجمعت جميع عينات المصابين من مركز السكري في جامعة تبليسي الطبية في جورجيا، واظهرت الدراسة فروقاً معنوية في تركيز الحركي الخلوي IL-17 في مصل الدم وكان متوسط تركيز IL-17 لدى المصابين اعلى مما هو عليه لدى الاصحاء (Kikodze *et al*., 2014). وفي دراسة مناعية اخرى لتقدير مستوى IL-17 في مصل المصابين بداء السكري- النوع الاول في أيران, وشملت الدراسة 24 شخصاً مصاباً بداء السكري- النوع الاول و30 شخصاً من الاصحاء تراوحت أعمارهم بين 6-30 سنة, وجمعت عينات المصابين من المركز الطبي للأطفال في جامعة طهران واظهرت الدراسة عدم وجود فروق معنوية لدى المرضى, كما اظهرت متوسط تركيز IL-17 لدى المرضى اعلى من الاصحاء

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

(Roohi *et al*., 2014). في دراسة مناعية لتقدير مستوى الوسيط IL-17 في المرضى المصابين بداء السكري– النوع الثاني التي شملت 32 مصاباً بداء السكري (16 ذكراً و16 انثى) كان متوسط أعمارهم 52.1 سنة, و29 شخصاً من الاصحاء (15 ذكراً و16 انثى) كان متوسط أعمارهم 48.0 سنة, وجمعت عينات المرضى من مركز السكري في مستشفى امام ريزا في طهران, وبينت النتائج وجود فروق معنوية في مستوى تركيز IL-17 لدى المرضى, كما تبين النتائج ايضاً بان متوسط التركيز لدى المرضى كان اعلى من تركيزه في الاصحاء (Zareian and Dizgah, 2014).

2-7-2: الانترفيرون- كاما (IFN-γ) Interferon-gamma

يعرف الانترفيرون–كاما (IFN-γ) Interferon-gamma على انه بروتين سكري ذو وزن جزئي يتراوح بين 17–25 كيلو دالتون (Curfs *et al*., 1997), وميز لاول مرة عام 1965م كوحدة كاملة في خلايا Murine kupffer cells والخلايا البلعمية Macrophages, ويسمى عامل الحث IFN-γ inducing factor (IGIF) (Feghali and Wright, 1997)، ويعرف ايضاً بانترفيرون النوع الثاني Type II interferon او عامل تفعيل الملتهمات الكبيرة Macrophage-activating factor (MAF). الانترفيرون– كاما يدعم الجهاز المناعي لغرض انجاز التحلل الخلوي للخلايا المستهدفة وكذلك وثق بانه يزداد في مرضى داء السكري– النوع الاول (Stalenhoef *et al*., 2008). يحفز انتاج الانترفيرون– كاما بوساطة خلايا Th1 الفعالة وخلايا $CD4^+$ وخلايا $CD8^+$, كما تنتج بوساطة خلايا NK cells وخلايا

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

(Schroder *et al.*, IL-18 و IL-12 وايضاً يحث انتاجه بوساطة Cytotoxic T cells (CTLs) 2004).

تتميز اهمية الانترفيرون- كاما من خلال وظائفه، إذ يعمل على حث الخلايا المناعية البلعمية Macrophages، كما يعمل على حث انتاج الحركيات الخلوية بادئة الالتهات مثل TNF، IL-1B، IL-12 و IL-18 ويمنع تعبير الحركيات الخلوية المضادة للالتهاب مثل IL-4 (Schindler, 2001), كما يعد IFN-γ ضرورياً لحث تعبير الانزيم المُحث لتخليق اوكسيد النتريك Inducible nitric oxide synthase (INOS) المسؤول عن توليد Nitric oxide المضاد الجرثومي داخل خلوي (Sass *et al.*, 2001).

ويعمل الانترفيرون- كاما على تحفيز او تثبيط موت الخلايا المبرمج Apoptopsis وهذا يعتمد على نوع الخلايا ومرحلة التمايز ومدى وجود الحاثات للموت المبرمج, لكن العديد من الأفعال القوية للانترفيرون- كاما تثبط بوساطة الحركيات الخلوية المضادة للالتهاب مثل IL-4، IL-10 و TGF-β1 التي تعمل بشكل مضاد للاستجابة المناعية وبذلك تساعد في جعل الاستجابة المناعية تحت السيطرة (Trinchieri, 2010). في مرضى داء السكري- النوع الاول يعمل الانترفيرون- كاما على زيادة تطور المرض وينتج بوساطة خلايا Th1 ويعمل بصورة رئيسة على حث فعالية خلايا Macrophages وخلايا NK cells، خلايا $CD4^+$ T cell و CD8+ T cells نحو تحطم خلايا بيتا (Yi *et al.*, 2012). قيمت سمية الخلايا القاتلة الطبيعية NK cells ومستويات الحركيات الخلوية في دراسة على الجرذ المصابة بداء السكري النوع-الاول, وشملت الدراسة ثمانية من الجرذ الاناث المصابة تراوحت اوزانها من 200-250 غرام, وأجريت الدراسة في مختبرات المدرسة الطبية لجامعة غازي في انقرة - تركيا, واظهرت الدراسة بان

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

مستوى التركيز للوسيط الانترفيرون- كاما في مصل الجرذ المصابة بداء السكري- النوع الاول كان اعلى من الجرذ غير المصابة (Fidan *et al*., 2005).

درست العلاقة بين الحركيات الخلوية IL-10 والانترفيرون كاما مع تقدير مستوياتهما في مصل دم المرضى الاوروبيين المصابين بداء السكري- النوع الاول، وشملت الدراسة 60 شخصاً مصاباً وقد بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية للانترفيرون- كاما لدى المصابين, كما بينت بان مستوى تركيز هذه الحركيات في مصل المصابين كان اعلى مما هو عليه في الاصحاء (Alizadeh *et al*., 2006)، كما درس الحركي الخلوي الانترفيرون كاما في المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول والمشخص لديهم المرض بصورة حديثة, وشملت الدراسة على 43 مصاباً بداء السكري- النوع الاول, والمشخص لديهم المرض في وقت أقل من سنة, و30 شخصاً من الاصحاء وجمعت عينات المصابين من مركز بن خراسان لأبحاث السكري في إيران، واظهرت النتائج وجود فروقات معنوية في تراكيز الانترفيرون- كاما لدى المرضى وكان تركيز الانترفيرون- كاما لدى المرضى اعلى بالمقارنة مع الاصحاء (Khazai *et al*., 2007).

قد درس الحركي الخلوي الانترفيرون- كاما في الاطفال العراقيين المصابين بداء السكري- النوع الاول لغرض تقييم مستواه في الاطفال المصابين حديثاً, وشملت الدراسة 60 طفلاً مصاباً بداء السكري- النوع الاول منها 28 ذكراً و32 انثى تراوحت أعمارهم بين 3-17 سنة ومقسمين على فئتين, فئة أكبر من عشر سنوات والاخرى أقل من عشر سنوات, وجمعت عينات المصابين من مركز داء السكري التابع للجامعة المستنصرية في بغداد, واظهرت النتائج فروقاً معنوية في جميع الفئات المدروسة, واظهر تركيز الانترفيرون- كاما في مصل الدم لدى الاطفال المصابين والأقل من عشر سنوات نسبة اعلى من الاصحاء في الفئة

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

نفسها, كما اظهرت النتائج نفسها لدى الاطفال المصابين والأكبر من عشر سنوات نسباً اعلى من الاصحاء (Saleh, 2009). وفي دراسة ثانية على المرضى العراقيين المصابين بداء السكري- النوع الثاني لتقدير مستوى بعض الحركيات الخلوية TNF-α، IL-10 وIFN-γ في المرضى المصابين, وشملت الدراسة 36 مصاباً بالمرض جمعت عيناتهم من مركز بغداد لامراض السكري, واظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين المصابين، كما اظهر مستوى تركيز الانترفيرون- كاما لدى المرضى قيماً اعلى بالمقارنة مع الاصحاء (Saour, 2011).

وفي دراسة ثالثة على الاطفال العراقيين المصابين بداء السكري- النوع الاول لتقدير مستوى بعض الحركيات الخلوية والاضداد في مصل المصابين, وشملت الدراسة 56 شخصاً مصاباً بداء السكري- النوع الاول (27 ذكراً و29 انثى تراوحت أعمارهم بين 2-29 سنة), و20 من الاشخاص الاصحاء الذين تراوحت اعمارهم بين 5-35 سنة, وجمعت عينات المصابين من وحدة السكري في مستشفى الكندي التعليمي في بغداد, وبينت النتائج وجود فروق معنوية للانترفيرون- كاما لدى المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول, كما اظهرت مستوى متوسط التركيز في مصل الدم لدى الاطفال المصابين نسباً اعلى من الاطفال الاصحاء (Jasem, 2013). قدرت مستويات بعض الحركيات الخلوية في مصل المرضى في دراسة حديثة شملت عدداً من الاطفال المصابين بداء السكري- النوع الاول, واظهرت الدراسة عدم وجود فروق معنوية للانترفيرون- كاما في مصل الدم, كما اظهر تركيز هذا الحركي الخلوي نسبة اعلى في مصل دم المرضى بالمقارنة مع الاصحاء (Kikodze *et al*,. 2014).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2-8: الحركيات الخلوية مضادة للالتهاب في داء السكري- النوع الاول
Anti-inflammatory cytokines in type1 diabetes mellitus

الحركيات الخلوية المضادة للالتهاب هي مجموعة جزيئات حركية ذات تنظيم مناعي مثبطة للاستجابة الحركية الخلوية للحركيات بادئة الالتهات بعد ذلك ترفع من نسبة الشفاء (Herder *et al*., 2013). ففي بداية الإصابة بداء السكري- النوع الاول يحدث استقطاب لخلايا $CD4^+$ Th مؤدية الى زيادة في الطرز المظهرية لخلايا Th1 التي تعمل على حث افراز الحركيات الخلوية بادئة الالتهات مع انخفاض في تنظيم أستجابة Th2 التي تفرز الحركيات الخلوية المثبطة للالتهاب (Russell and Morgan, 2014).تفرز الحركيات الخلوية المضادة للالتهاب بوساطة العديد من الخلايا مثل الخلايا التائية المنظمة T Reg والخلايا البلعمية Macrophages والخلايا البدينة Mast cells والخلايا البائية المنظمة B Regulatory (B Reg)، وهذه الخلايا تعمل كوسائط للاستجابة المناعية في داء السكري- النوع الاول. والحركيات الخلوية المضادة للالتهاب قيد الدراسة الحالية هي IL-4، IL-10 و TGF-β1.

2-8-1: الحركي الخلوي Interleukin-4 (IL-4)

اكتشف هذا الحركي الخلوي لاول مرة في عام 1982م, وهو بروتين سكري أحادي الجزيئة Monomer glycoprotein وزنه الجزيئي 15 كيلو دالتون ويتكون من 129 حامضاً أمينياً. المصدر الرئيسي لـ IL-4 هي خلايا Th2, وكذلك ينتج بوساطة خلايا NK cells، الخلايا البدينة Mast cells، خلايا الحمضة Esinophils وخلايا القعدة Basophils (Akdis *et al*., 2011). الدور البايلوجي لـ IL-4 يكون واحداً من أقوى الحركيات الخلوية متعددة المظاهر في الجسم, ويعد حركياً خلوياً مضاداً لبعض

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الحركيات Antagonistic مثل الانترفيرون- كاما, ويعمل كذلك على زيادة الاستجابة الخلطية, كما يعمل على تمايز خلايا Th2 ويغلق العديد من الوظائف المؤثرة لخلايا البلعمية Macrophages, ويعد عامل نمو لخلايا البدينة Mast cells (Rai, 2008). يعمل IL-4 في مرضى السكري- النوع الاول على زيادة فعالية CD1d الذي يعمل على تثبيط فعالية خلايا Natural killer وخلايا T cells الفعالة الموجهه ضد خلايا بيتا (Novak *et al*., 2007). درست الحركيات الخلوية لغرض تقدير مستويات IL-4 في المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول، والمشخص لديهم المرض بصورة حديثة, وشملت الدراسة على 43 مصاباً بداء السكري- النوع الاول, والمشخص لديهم المرض في وقت أقل من سنة وعلى 30 شخصاً من الاصحاء، وجمعت عينات المصابين من مركز خراسان لأبحاث السكري في إيران، واظهرت النتائج عدم وجود فروقات معنوية في مستوى تركيز IL-4 لدى المصابين, كما بينت الدراسة بان تركيز IL-4 لدى الاصحاء كان اعلى مما هو عليه لدى المرضى (Khazai *et al*., 2007).

وفي دراسة على الاطفال العراقيين المصابين بداء السكري النوع- الاول لتقدير مستوى بعض الحركيات الخلوية والاضداد في مصل المصابين, وشملت الدراسة 56 شخصاً مصاباً بداء السكري- النوع الاول (27 ذكراً و29 انثى تراوحت أعمارهم بين 2-29 سنة) و20 من الأشخاص الاصحاء تراوحت أعمارهم بين 5-35 سنة, وجمعت عينات المصابين من وحدة السكري في مستشفى الكندي التعليمي- بغداد, وبينت نتائج هذه الدراسة المناعية عدم وجود فروق معنوية في مستوى تركيز IL-4 في مصل المصابين بداء السكري- النوع الاول, واظهرت ان تركيز هذا الحركي الخلوي لدى الاصحاء كان اعلى بالمقارنة مع المصابين (Jasem, 2013)، كما درس داء السكري- النوع الاول على الاطفال العراقيين المصابين وتضمنت هذه الدراسة دور الاستعداد الوراثي والعوامل البيئية في داء السكري- النوع الاول, وشملت 230

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

مصاباً بداء السكري- النوع الاول (108 ذكراً و122 انثى) و130 من الأشخاص الاصحاء (62 ذكراً و68انثى) التي تراوحت أعمارهم بين 3-40 سنة, وجمعت جميع عينات المصابين من مركز ليلى قاسم في أربيل كردستان العراق. اظهرت النتائج وجود فروق معنوية لمستوى تركيز IL-4 في مصل المصابين, كما اظهرت النتائج بان مستوى تركيز IL-4 لدى المصابين كان اعلى مما هو عليه لدى الاصحاء (Berwary *et al*., 2013). وفي دراسة حديثة شملت عدداً من الاطفال المصابين بداء السكري- النوع الاول, إذ اظهرت النتائج وجود فروق معنوية في مستوى تركيز الـ IL-4 لدى المصابين, وكان تركيز IL-4 لدى المصابين اعلى من الاصحاء (Kikodze *et al*., 2014).

2-8-2: الحركي الخلوي Interlukines-10 (IL-10)

حركي خلوي متعدد الاستجابة Pleiotropic ذو منشأ بروتيني سكري ومكون من 172 حامضاً أمينياً (Qi *et al*., 2015)، ووزنه الجزيئي 17-20 كيلو دالتون (Moore *et al*., 2001). أكتشف IL-10 لاول مرة في عام 1980م, ويتميز بان له القدرة بالتأثير في المناعة الذاتية والمكتسبة Innate and adaptive immune systems, والوظيفة البايولوجية للحركي الخلوي IL-10 هو بتحديد وانتهاء الاستجابة الالتهاتية, ويتميز بقدرته على تثبيط انتاج بعض الحركيات الخلوية بادئة الالتهات، ويعمل على توقف الاستجابة الالتهابية من خلال استهداف بعض الخلايا مثل الخلايا البلعمية Macrophages وخلايا العدلة Neutrophils وخلايا الحمضة Eosinophils والخلايا البدينة Mast cells, كما يعمل على حث افراز خلايا T-helper (Sky *et al*., 2013). ينتج IL-10 بوساطة عدد من الخلايا الدفاعية مثل الخلايا

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

العدلة (Natural cells (NK، الخلايا البدينة Mast cells، خلايا Th2، الخلايا البلعمية Macrophages، والخلايا الأحادية Monocytes وخلايا $DC4^{+}CD25^{+}$ T cells المنظمة. يمتلك IL-10 مستقبلات هي IL-10 R-1 و IL-10 R-2 وهما وحدتان فرعيتان تعبران بوساطة الخلايا المكونة للدم Hemotopoietic وغير المكونة للدم (Moor *et al*., 2001 ; Gleissner *et al*., 2007).

في دراسة مناعية لتقدير مستوى IL-10 في الأشخاص المصابين بداء السكري- النوع الثاني في بولندا, وشملت الدراسة 30 مصاباً (17 ذكراً و13 انثى) كان متوسط أعمارهم 41.76 سنة وجمعت جميع عينات المصابين من مركز السكري في جامعة جدانسك. بينت النتائج بان تركيز IL-10 في مصل الاصحاء كان اعلى مما هو عليه في مصل المرضى (Mysliwska *et al*., 2005)، بينما في دراسة مناعية اخرى لغرض دراسة الأرتباط الحركي الخلوي IL-10 وتقدير مستوياته في مصل المرضى الاوربيين المصابين بداء السكري- النوع الاول. شملت الدراسة 60 شخصاً مصاباً بالسكري- النوع الاول تراوح متوسط أعمارهم 26.3 سنة, واظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية في تركيز IL-10 لدى المصابين, كما بينت الدراسة بان مستوى هذا الحركي الخلوي في مصل المصابين كان اعلى بالمقارنة مع الاصحاء (Alizadeh *et al*., 2006).

في دراسة تضمنت عدداً من الاطفال المصابين بداء السكري- النوع الاول ومقسمين على فئتين أكبر وأقل من عشر سنوات قد اظهرت النتائج فروقاً معنوية لـ IL-10 ولجميع الفئات المدروسة للأطفال المصابين، كما اظهرت الدراسة نفسها نتائج في الاطفال المصابين لدى فئة الأكبر من عشر سنوات مستويات اعلى بالمقارنة مع الاصحاء (Saleh, 2009)،وقدر تركيز الـ IL-10 في مصل المصابين لـ 56 طفلاً مصاباً بداء السكري- النوع الاول تراوحت أعمارهم بين2-29 سنة, واظهرت النتائج بان تركيز IL-10

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

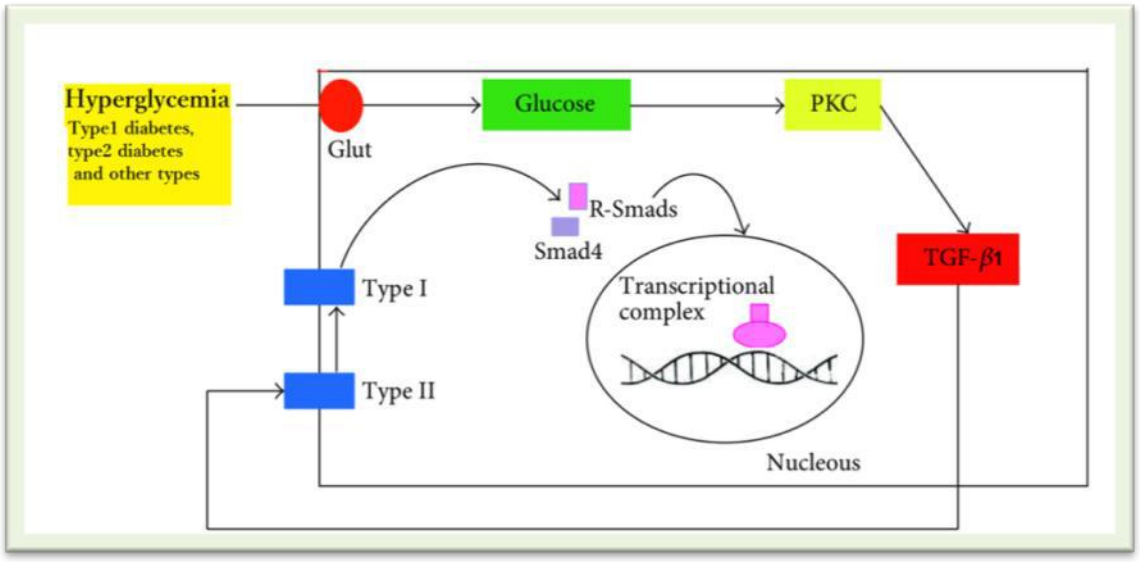
لدى الاصحاء كان اعلى بالمقارنة مع المصابين (Jasem, 2013)، بينما في دراسة اخرى على الاطفال العراقيين المصابين بداء السكري– النوع الاول لتقدير تركيز الـ IL-10 في مصل المصابين, اظهرت النتائج فروقاً معنوية للمصابين مع تركيز اعلى لدى الاطفال المصابين بالمقارنة مع الاصحاء (Berwary *et al*., 2013)، وفي دراسة حديثة شملت 71 مصاباً بداء السكري– النوع الاول لتقدير نسبة تركيز IL-10 في مصل المصابين، وقد اظهرت النتائج بان تركيز IL-10 في مصل دم الأشخاص الاصحاء كان اعلى بالمقارنة مع المصابين وكذلك اظهرت الدراسة الى عدم وجود فروق معنوية في مستوى IL-10 لدى المصابين (Kikodze *et al*., 2014)، بينما في دراسة اجراها هي وجماعته (2014) على الاطفال الصينيين المصابين بداء السكري– النوع الاول لمعرفة دور الخلل الوظيفي لدى الاطفال المصابين في انتاج IL-10, وشملت الدراسة 35 مصاباً بداء السكري– النوع الاول (16 ذكراً و19 انثى تراوحت أعمارهم بين 3–14 سنة), و30 شخصاً من الاصحاء (13 ذكراً و17 انثى تراوحت أعمارهم بين 3–15 سنة), وجمعت عينات المصابين من جامعة فوجيان الطبية في الصين, واظهرت النتائج فروقاً معنوية في تركيز IL-10 لدى المصابين, كما اظهرت متوسط تركيز لدى المرضى اعلى من الاصحاء (He *et al*., 2014).

2–8–3: عامل النمو المحول– بيتا 1
Transforming growth factor-beta (TGF-β1)

حركي خلوي متعدد الببتايد Polypeptides وزنه الجزيئي 12 كيلو دالتون (Border and Ruoslahti, 1992). ينتج هذا الحركي بوساطة العديد من الخلايا المكونة للدم متضمنة خلايا B وخلايا T الفعالة, وخلايا Thymic stromal cells، الصفيحات الدموية Platelets وخلايا البلعمة

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Macrophages، NK cells وDCs، وينتج ايضاً بوساطة الخلايا غير المكونة للدم مثل الكلية والعين وخلايا CNS (Miossec *et al*., 2009; Ming *et al*., 2008). يعد TGF-β1 عامل نمو متعدد الوظائف Pleiotropic وقادراً على حث تكاثر الخلايا وتمايزها, كذلك له القدرة على حث الموت المبرمج, ويمتلك خواص مثبطة ومضادة للالتهاب, ويعد وسيطاً مناعياً لفعالية خلايا T. يظهر دوره البايولوجي في مرضى داء السكري– النوع الاول عندما يحصل ارتفاع في مستوى الكلوكوز في الجسم, إذ ان الارتفاع الكبير في نسبة السكري يؤدي الى تحفيز بروتين الكاينيز Kinase protein في السايتوبلازم ومن ثم سوف ينشط فعالية TGF-β1 ليرتبط مع بروتينات Smad ويرتبط مع مستقبلاتها ويدخل النواة ليعمل تغييراً في المواقع النووية ويعمل نسخاً في الجينات المستهدفة كما مبين بالشكل (4) (Gomes *et al*., 2014; Lee, 2013).



شكل (4): دور TGF-β1 في داء السكري– النوع الاول (Gomes *et al*., 2014)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

أجريت في لبنان دراسة على عينات من المرضى اللبنانيين لغرض تقدير التغايرات في مستوى عامل النمو المحول TGF-β1 في بلازما المصابين بداء السكري– النوعين الاول والثاني, وشملت الدراسة 26 مصاباً بداء السكري– النوع الاول, و25 مصاباً بداء السكري– النوع الثاني, وجمعت عينات المصابين من عيادات السكري في بيروت, وقسمت العينات الى ثلاث مجاميع. شملت مجموعة A1 على الأعمار الأقل من سنة, وشملت المجموعة B1 على الأعمار بين 2–10 سنوات, وشملت المجموعة C1 على الأعمار الأكبر من 10 سنوات, واظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية في مستوى تركيز TGF-β1 لدى المرضى, كما اظهرت النتائج مستويات تركيز TGF-β1 نسباً أقل لدى المرضى بالمقارنة مع الاصحاء, بينما بينت نتائج المرضى المصابين بداء السكري– النوع الثاني وجود فروق معنوية في مستوى تركيز TGF-β1, وكان مستوى تركيز TGF-β1 لدى المرضى اعلى بالمقارنة مع الاصحاء (Azar *et al.*, 2000).

قدرت العلاقة بين مستوى تركيز TGF-β1 ومرحلة الإصابة بداء السكري– النوع الاول في الاطفال والمراهقيين, وشملت الدراسة 116 شخصاً مصاباً بداء السكري تراوح متوسط أعمارهم بين 3.9–13.3 سنة, وجمعت عينات المصابين من قسم الاطفال من جامعة دانسك الطبية في بولندا, واظهرت النتائج وجود فروق معنوية في تركيز TGF-β1 لدى المرضى الاطفال والمراهقين, كما اظهرت الدراسة بان تركيز TGF-β1 لدى المرضى الاطفال والمراهقين كان اعلى بالمقارنة مع الاصحاء (Zorena *et al.*, 2013).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وفي دراسة اخرى قد شملت على 24 مصاباً بداء السكري- النوع الاول ضمن الأعمار من 4-30 سنة, واظهرت النتائج ان مستوى TGF-β1 في مصل الاصحاء كان اعلى من مستوى TGF-β1 عما هو عليه في مصل دم المصابين (Roohi *et al*., 2014).

2-9: الوراثة ومرض داء السكري Genetic and diabetes mellitus

2-9-1: وراثة داء السكري- النوع الاول Genetics of Type I Diabetes

العوامل الوراثية معروفة بارتباطها بصورة قوية مع داء السكري- النوع الاول, وان خطر الإصابة يكون مرتبطاً مع جينات منطقة Human Laukocytes Antigen (HLA) الموجودة على الكروموسوم رقم 6 للذراع القصير 6p21 وتتميز كجينات خطرة وحساسة لداء السكري- النوع الاول (Rich *et al*., 2009). داء السكري- النوع الاول يكون مرتبطاً بصورة اولية مع أليلات جينات HLA-class-I ويرتبط بصورة قوية مع أليلات جينات HLA-class-II (Undlien and Thorsby, 2001). اظهرت دراسة لبعض الاطفال العراقيين وجود علاقة قوية لجينات*DR*4 *DR*3-HLA-class-II مع داء السكري- النوع الاول (Berwary *et al*., 2013)، وكذلك مع جينات *DQB*1-HLA-classII، كما أشارت دراسات اخرى ان الجين *DPB*1 له ارتباط ايضاً بالمرض, وهذا يوضح ان جينات الصف الثاني *DP*، *DQ* و*DR* تكون مساهمة في خطر الإصابة بالمرض (Levisetti *et al*., 2007).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2-9-2: دور HLA في وراثة داء السكري- النوع الاول

Role of HLA in Genetics of T1DM

يمثل نظام HLA معقد التوافق النسيجي في الانسان Major Histocompatibility complex (MHC) ويقع على الذراع القصير للكروموسوم السادس في منطقة 6p21.1-21.3 (Choo, 2007). معقد HLA يشفر عن حوالي 200 جين وهناك اكثر من 40 جيناً تشفر ولها علاقة في الاستجابة المناعة الذاتية والمكتسبة لمستضدات خلايا الدم البيضاء Leukocyte antigen (Horton *et al*., 2004)، ومن المعروف ان HLA نظام وراثي متعدد الأشكال في الانسان Polymorphic genetic system. الدور البايولوجي لنظامي HLA-class-I, II في داء السكري- النوع الاول هو تقديم المستضدات الببتيدية Processed peptide antigen في خلايا بيتا الى مستقبلات الخلايا التائية الفعالة (Choo, 2007).

يؤدي معقد HLA دوراً مهماً في مرضى السكري- النوع الاول, إذ يميز كعامل في تطور داء السكري- النوع الاول. العوامل الوراثية لداء السكري- النوع الاول تكون نصفها محمولة بوساطة معقد HLA-class-I, II, وان الدور الخلوي لجزيئة HLA-class-I هو بالعمل على التحطم السمي الذي تتوسطه خلايا Cytotoxic T lymphocyte (CT) (Valdes *et al*., 2005). التحطم الاولي لخلايا بيتا في البنكرياس تتوسطها خلايا T-helper ($CD4^+Th1$) والتحطم الآخر من خلال فعالية الخلايا السمية T-cytotoxic ($CD8^+$ CT) الموجهة مباشرة ضد خلايا بيتا. هذه الخلايا تظهر زيادة في تعبير MHC class I , II في مرضى السكري- النوع الاول (Stadinski *et al*., 2010).

اظهرت الدراسات وجود ارتباط قوي مع جينات معقد HLA المتعددة الأشكال Polymorphism في تطور وحدوث المرض, واظهرت وجود تكرار وثيق مع جينات HLA-class-I-(*A,B*) مع مرضى

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

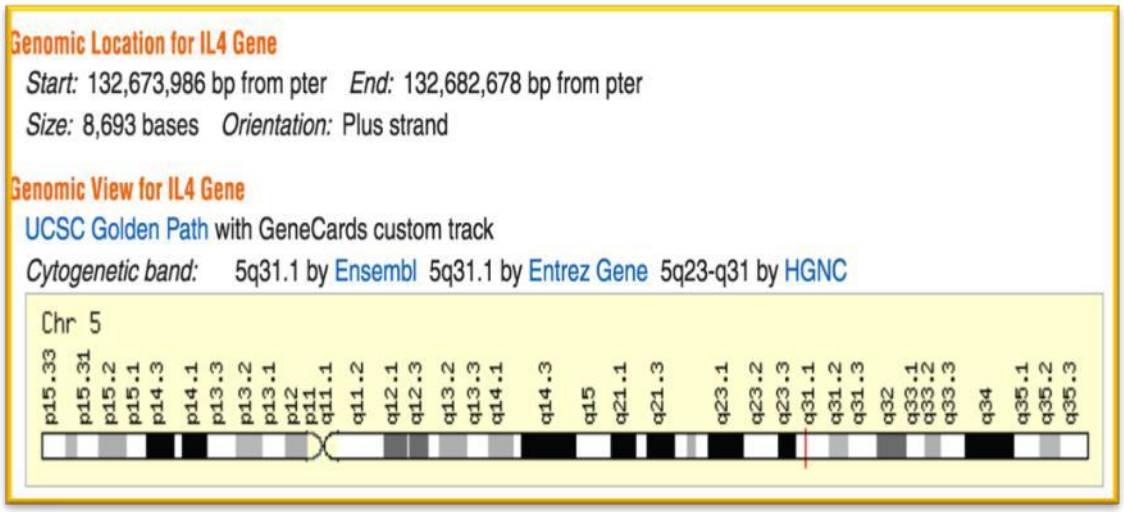
السكري– النوع الاول (Nejentsev *et al*., 2007), كما اظهرت التحليلات الاحصائية وجود ارتباط وثيق للمرض ومرتبط مع أليلات جين (*B*1) HLA-class-I, كما ان هناك علاقة وثيقة مع أليلات الجين HLA-class-I-*A* ضمن المواقع 2402* و3002* وتكرار أقل مع المواقع 0101* و1101* (Valdes *et al*., 2005). داء السكري– النوع الاول له ارتباط قوي مع جينات HLA-class-II من خلال ارتباطه مع مستضدات خلايا $CD4^{+}$Th Lymphocyte, وتأثير خلايا Th1 التي تعمل على قتل خلايا بيتا المنتجة لهرمون الانسولين في البنكرياس بعملية الموت المبرمج Apoptosis وبدون التأثير على خلايا الانسجة المحيطة الاخرى من خلال افرازها العديد من الحركيات الخلوية Cytokines (Notkins, 2002). داء السكري– النوع الاول يكون مرتبط مع نظام HLA class II وبصورة رئيسية مع جينات HLA class II-*DR*4 , *DR*3 (Choo, 2007)، كما يوجد ارتباط وثيق للمرض مع جينات HLA-class-*DQ* وخطر الإصابة بالمرض, وهناك ارتباط قوي لجينات HLA-class-II-*DQA*1,*DQB*1 مع الاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول مقارنة بالاطفال الاصحاء (Ilonen *et al*., 2002). اظهرت أليلات جينات *DQB*1*02 و *DQB*1*0302 ارتباطاً مع خطر الإصابة بداء السكري– النوع الاول، بينما اظهرت أليلات جين *DQB*1*0301,*0602,*0603 حماية ضد المرض، إذ ان التراكيب الوراثية المختلفة تتميز كخطر او حماية للمرض (Noble and Valdes, 2011). هناك دراسة في التسعينات تقارن وراثة داء السكري– النوع الاول بين أطفال فلندا وأطفال الأغريق إذ بينت ان أليلات الجين *DQB*1*02 و*DQB*1*0302 تظهر كخطر في تقدم الإصابة بالمرض, بينما أليلات الجين 0603* و0602* و*DQB*1*0301 قد اظهرت حماية من تقدم المرض في أطفال كلا المجتمعين, وأغلب الاطفال الفلنديين المصابين بالسكري– النوع الاول يحملون تكراراً وثيقاً مع الأليل للجين *DQB*1*0302, بينما أطفال الأغريق

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المصابين بالسكري- النوع الاول يحملون تكراراً وثيقاً للأليل *DQB*1*0202 (Green and Gale, 1992). اظهر الأليل لجين *DQB*1*0602 ارتباطاً بالحماية ضد داء السكري- النوع الاول حتى في حالة الاتحاد مع أليل جين *DQB*1*0302. معقد HLA class III يحتوي على عدد من الجينات التي هي *BF* , *C4* ,*C2* - HLA class III مع امتلاك وظائف متغيرة ولا تظهر أية تأثيرات مؤثرة مع داء السكري- النوع الاول (Klein and Sato, 2000).

2-9-3: جين الحركي الخلوي *IL-4* Interleukin-4 gene

اظهرت الدراسات الوراثية ان الجين المسؤول عن تشفير IL-4 يقع على الذراع الطويل للكروموسوم رقم 5 في الموقع 5q31 (Ryan *et al*., 2005), كما في الشكل (5).



شكل (5): موقع الجين *IL-4* على الكروموسوم رقم 5. (www.genecardes.org)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

في دراسة وراثية لتقدير ارتباط وفعل الجينات *IL-4*، *IL-4R* و*IL-13* بين الفلبينيين المصابين بداء السكري– النوع الاول, والتي شملت الدراسة 90 مصاباً بداء السكري– النوع الاول و40 شخصاً من الاصحاء, واظهرت نتائج تحليل الانماط الوراثية للجين 590- *IL-4* بان تكرار النمطين الوراثيين TT وCT كانت اعلى لدى المصابين بالمقارنة مع الاصحاء, وكان معدل Odds ratio (OR) لكلا النمطين أكبر من واحد, بينما يبين النمط الوراثي CC قد اظهر تكراراً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المرضى وكان معدل النسبة الحرجة OR أقل من واحد (Teodorical *et al*., 2003). قيم تطور التعدد الشكلي المظهري لجين 590- *IL-4* في مرضى داء السكري– النوع الاول, واظهرت الدراسة الى وجود ارتباط قوي في تكرار الأليل T مع المرضى مع زيادة في تطور وخطر الإصابة (Eerligh *et al*., 2004).

اجريت دراسة وراثية لغرض تقييم العلاقة بين التعدد الشكلي المظهري لجيني *IL-4* و*IFN-γ* في المرضى المصابين بداء السكري– النوع الثاني, وشملت الدراسة 160 شخصاً مصاباً بالمرض و160 شخصاً من الاصحاء, وجمعت عينات المرضى من عيادة علي أبن طالب لامراض السكري في ايران. اظهرت النتائج وجود تكرار معنوي للأليل T للجين 590- *IL-4* لدى المصابين, وكان تكرار الأليل لدى المرضى اعلى بالمقارنة مع الاصحاء, واظهرت نتائج التحليل الوراثي للطرز الوراثية الى وجود زيادة في تكرار النمطين الوراثيين TT وCT لدى المرضى بالمقارنة مع الاصحاء, إذ بلغت نسبته في المصابين 21.8% و8.2% وللأصحاء 6.9% و20.6% وعلى التوالي، بينما اظهر النمط الوراثي CC تكراراً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المرضى، إذ بلغت نسبته 72.5% و70% وعلى التوالي (Arababadi *et al*., 2009).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

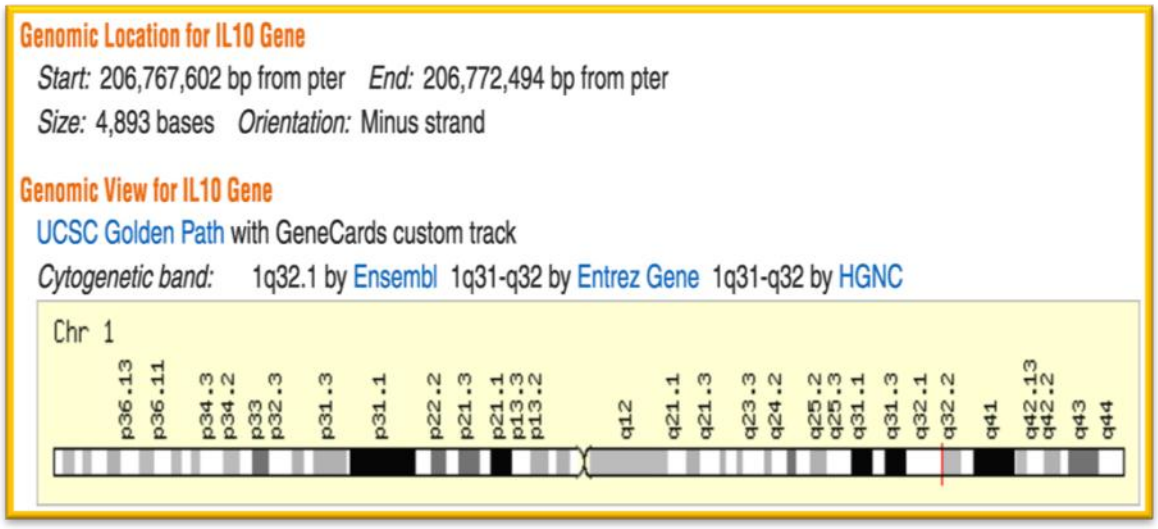
درس التعدد الشكلي المظ للجينات *IL-4*، *IL-10* و*IL-12B* في المرضى القوقازيين من غير الأقارب المصابين بداء السكري– النوع الثاني, وشملت الدراسة 376 شخصاً مصاباً بالسكري. اظهرت النتائج بان جين 590- *IL-4* يكون عاملاً مسبباً لداء السكري– النوع الثاني, واظهر الأليل C تكراراً اعلى لدى المرضى بالمقارنة مع الاصحاء, بينما اظهر الأليل T تكراراً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المرضى, كما تبين من نتائج هذه الدراسة الى وجود تكرارات اعلى للنمطين الوراثيين CC وTC عند المرضى بالمقارنة مع الاصحاء, بينما اظهر النمط الوراثي TT تكراراً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المرضى (Cilensek *et al*., 2011).

قيم ارتباط التعدد الشكلي المظهري لجيني 590- *IL-4* و1112- *IL-13* في الأشخاص المصابين بداء السكري– النوع الثاني, وشملت الدراسة 135 مصاباً بالسكري, و75 من الأشخاص الاصحاء, وجمعت عينات المصابين بالمرض من عيادات داء السكري ومن المستشفى الطبي في جامعة المنصورة. اظهرت نتائج هذه الدراسة فروقاً معنوية للنمط الوراثي CT لدى المصابين, كما اظهرت النتائج تردداً اعلى للنمط الوراثي CT لدى المصابين بالمقارنة مع الاصحاء، إذ بلغت نسبة(OR (CI 95% قيمة (3.22- 6.27 (12.12, بينما اظهر النمطان الوراثيان CC وTT تردداً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المصابين وبلغت قيمة OR (CI 95%) قيمة (0.07–0.31) 0.15 و(0.15–1.56) 0.49، وعلى التوالي (Alsaid *et al*., 2013).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2-9-4: جين الحركي الخلوي *IL-10* Interlukines-10 gene

اظهرت الدراسات الوراثية بان الجين المسؤول عن تشفير IL-10 يقع على الذراع الطويل للكروموسوم رقم 1 في الموقع 1q32 (Curfs *et al.*, 1997), كما مبين في الشكل (6).



شكل (6): موقع الجين *IL-10* على الكروموسوم رقم 1. (www.genecardes.org)

وبينت دراسة وراثية في أسبانيا بين مرضى الأسبان المصابين بداء السكري- النوع الاول الى عدم وجود فروقٍ معنوية في تكرار الأليلات المدروسة في المرضى، واظهر الأليل A تردداً اعلى لدى المصابين بالمقارنة مع الاصحاء, بينما اظهر الأليل G تردداً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المصابين (Urcelay *et al.*, 2004).

اظهر التعدد الشكلي المظهري للجينين *IL-10* -1082 و*IL-10* -592 على الأشخاص الأتراك المصابين بداء السكري- النوع الاول في دراسة شملت 117 مصاباً تراوحت أعمارهم من 16-75 سنة و116 شخصاً من الاصحاء تراوحت أعمارهم من 15-68 سنة، وجمعت العينات من مستشفى غازي في

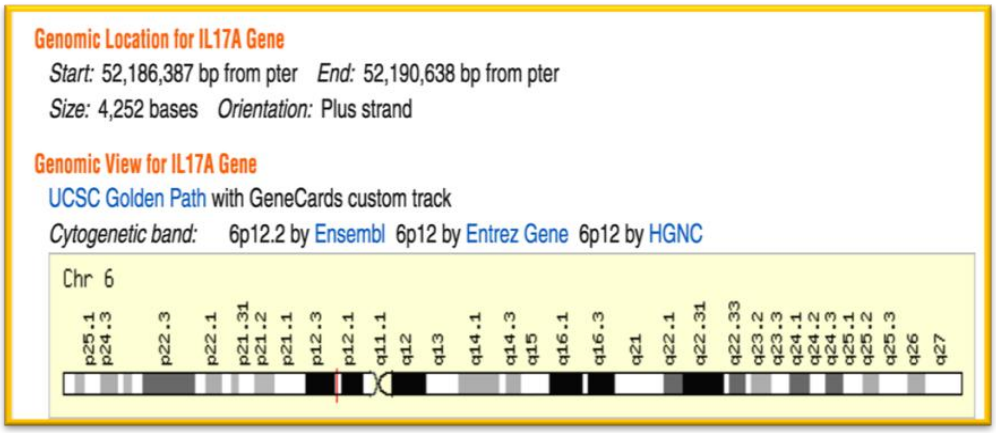
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

انقرة. اظهرت النتائج للشفرة 1082- زيادة في تردد النمطين الوراثيين AA وAG في المصابين بالمقارنة مع الاصحاء, كما اظهر الأليل A تردداً اعلى لدى المصابين بالمقارنة مع الاصحاء, كما اظهر الأليل G تردداً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المصابين, بينما اظهر النمطيان الوراثيان CC وTT للشفرة 592- تردداً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المصابين, كما اظهر الاليلان C وT تردداً اعلى لدى المصابين بالمقارنة مع الاصحاء (Mohebbatikaljahi *et al*., 2009). قدر في مصر ارتباط التعدد الشكلي المظهري في بعض الجينات المسؤولة عن داء السكري- النوع الاول في دراسة على عينة من المرضى المصريين, وشملت الدراسة 60 مصاباً بداء السكري- النوع الاول, و60 شخصاً من الاصحاء, وجمعت عينات المصابين من قسم السكري في المستشفى الطبي التابع لجامعة الاسكندرية. بينت نتائج تحليل الانماط الوراثية للجين 1082- *IL-10* على ان النمطين الوراثيين AA وGG قد اظهرا تكراراً معنوياً لدى المرضى بنسبة اعلى من الاصحاء, بينما اظهر النمط الوراثي GA تكراراً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المرضى (EL-Kafoury *et al*., 2014).

2-9-5: جين الحركي الخلوي *IL-17* Interlukin-17 gene

ان جين الحركي الخلوي *IL-17* يقع على الذراع القصير للكروموسوم رقم 6 في الموقع 21 (Southam *et al*., 2006)، كما مبين بالشكل (7).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (7): موقع الجين *IL-17A* على الكروموسوم رقم 6 . (www.genecardes.org)

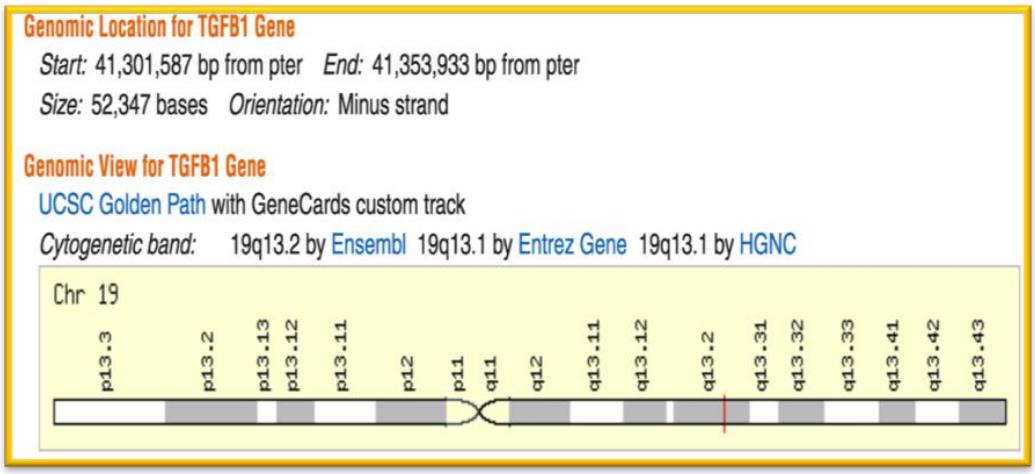
اظهرت الدراسات الوراثية لتقييم الأرتباط الوراثي في التعدد الشكلي المظهري للجين *IL-17A* في القوارض المصابة بداء السكري- النوع الاول باستعمال تقانة ARMS-PCR عدم وجود فروقٍ معنوية في القوارض المصابة بداء السكري- النوع الاول, كما اظهر النمط الوراثي AA تكراراً اعلى لدى القوارض المصابة بالمقارنة مع القوارض غير المصابة, بينما اظهر النمطان الوراثيان GG وGA تكراراً اعلى لدى القوارض غير المصابة بنسبة اعلى بالمقارنة مع القوارض المصابة (Kim *et al*., 2012).

2-9-6: جين عامل النمو المحول- بيتا1

Transforming growth factor-beta gene (*TGF-β1*)

اظهرت الدراسات الوراثية بان الجين المسؤول عن تشفير TGF-β1 يقع على الذراع الطويل للكروموسوم رقم 19 في الموقع 19q13.2 (Barton *et al*., 1988), كما في الشكل (8).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (8): موقع جين عامل النمو المحول- بيتا1 *TGF-β1* على الكروموسوم رقم 16.

(www.genecardes.org)

في دراسة وراثية على التعدد الشكلي المظهري للجينات *IL-10* و*TGF-β1* Codon 10 and 25 للأشخاص المصابين بالامراض البولية وبداء السكري- النوع الثاني قد شملت 44 شخصاً مصاباً بداء السكري كان متوسط أعمارهم بين 47.5 سنة, و118 شخصاً من الاصحاء كان متوسط أعمارهم بين 41 سنة. جمعت عينات المصابين من مستشفى أثيكل Ethical hospitol, وأشارت النتائج للجين *TGF-β1* Codon-10 الى وجود فرقٍ معنوي في تكرار النمط الوراثي TT لدى المرضى بشكل اعلى بالمقارنة مع الاصحاء, بينما اظهر النمطان الوراثيان CC وTC الى وجود تكرارٍ اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المرضى. بينت النتائج للشفرة 25 للجين *TGF-β1* الى وجود تكراراً اعلى للنمط الوراثي GG لدى المصابين بنسبة اعلى بالمقارنة مع الاصحاء, وكانت قيمة النسبة الحرجة Odds ratio (OR) اعلى من واحد, بينما لم يظهر النمط الوراثي GC فرقاً معنوياً في تكراره لدى المرضى، ولكن نسبة التكرار كانت اعلى بالمقارنة مع الاصحاء, كما اظهر النمط الوراثي CC تكراراً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المرضى (Babel *et al.*, 2006).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

في دراسة وراثية لعينات من المرضى المصريين المصابين بداء السكري- النوع الثاني التي شملت 99 شخصاً مصاباً بالسكري (16 ذكراً و63 انثى), وجمعت عينات المصابين من عيادة السكري في مستشفى جامعة المنصورة. تركزت الدراسة على تعيين التعدد الشكلي المظهري للجينين 10- *TGF-β1* و25- *TGF-β1* في الأشخاص المصابين بداء السكري, إذ اظهرت النتائج للشفرة 10- فروقاً معنوية للنمط الوراثي TC لدى المصابين, واظهرا النمطان الوراثيان TT وTC تردداً اعلى لدى المصابين بالمقارنة مع الاصحاء, إذ بلغ OR (CI 95%) لكلا النمطين (0.69-0.92) 0.8 و(1.09-3.63) 1.99، وعلى التوالي, كما اظهر الأليل T تردداً اعلى لدى المصابين بالمقارنة مع الاصحاء, بينما اظهر الأليل C تردداً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المرضى, بينما الشفرة 25- للجين *TGF-β1* اظهر الأليل G لدى المصابين والاصحاء تردداً متقارباً بلغت نسبته 89.8% و90%، وعلى التوالي وكذلك الأليل C الذي بلغت نسبته لدى المصابين 10.2% والاصحاء 10%, واظهر النمط الوراثي GG تردداً كبيراً لدى المصابين والاصحاء بلغت نسبته 79.6% و80% وعلى التوالي, بينما اظهر النمط الوراثي GC تردداً أقل لدى المصابين والمرضى, ولم يظهر النمط الوراثي CC أي تردد لكلا المصابين والاصحاء (El-Sherbini *et al.*, 2013).

وفي دراسة حديثة في انكلترا شملت 248 شخصاً مصاباً بداء السكري- النوع الاول لغرض دراسة التعدد الشكلي المظهري للجينين 10- *TGF-β1* و 25- *TGF-β1* باستعمال تقانة ARMS-PCR. جمعت عينات المرضى من مركز السكري في مانشستر، واظهرت نتائج الشفرة 10- تردداً اعلى للأليل C لدى المصابين بالمقارنة مع الاصحاء, بينما اظهر الأليل T تردداً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المصابين, كما اظهر النمط الوراثي CT تردداً كبيراً لدى المصابين بلغت نسبته 50.8% و48%، وعلى

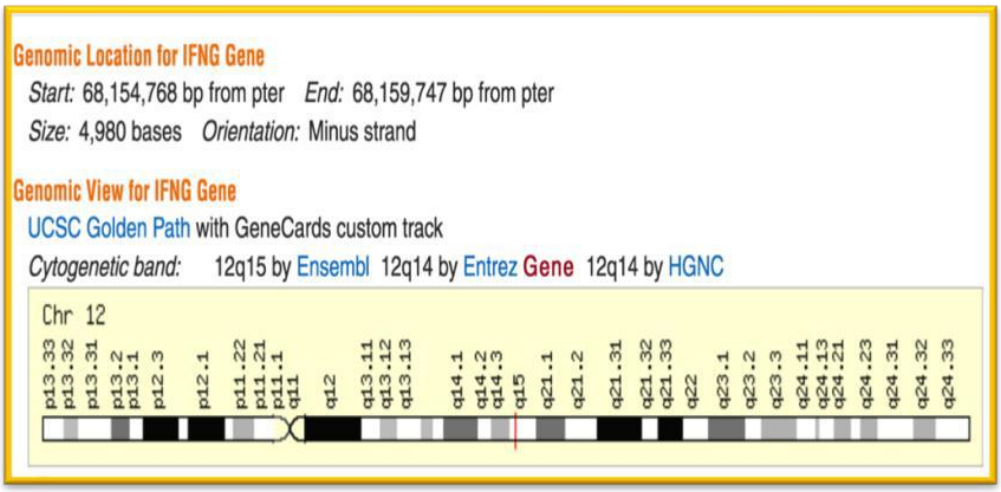
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

التوالي واظهر النمط الوراثي TT تردداً أقل لدى المصابين بالمقارنة مع الاصحاء إذ بلغت نسبتهما 33.5% و39.5% وعلى التوالي، كما اظهر النمط الوراثي CC تردداً أقل لدى المصابين اذ بلغت نسبته 15.7% ولدى الاصحاء 12.5%. نتائج الشفرة 25- لجين *TGF-β1* اظهرت تردداً كبيراً للأليل G لدى المصابين والاصحاء بلغت نسبتهما 90% و90.3% وعلى التوالي, كما اظهر النمط الوراثي GG تردداً كبيراً ومتقارباً لدى الاصحاء والمرضى بلغت نسبتهما 81% و81.5%، وعلى التوالي, وتردداً أقل للنمط الوراثي GC بلغت نسبته 17.8% لدى المصابين و17.6% لدى الاصحاء, واظهر النمط الوراثي CC تردداً لدى المصابين بلغت نسبته 1.2% ولدى الاصحاء 0.9% (Bazzaz *et al*., 2014).

2-9-7: جين انترفيرون كاما (*IFN-γ*) Interferon-gamma gene

اظهرت الدراسات الوراثية بان الجين المسؤول عن السيطرة الوراثية للانترفيرون- كاما *IFN-γ* يقع على الذراع الطويل للكروموسوم 12 في الموقع 12q15 (Hardy *et al*., 2004), كما مبين بالشكل (9). يعتقد من خلال دراسة التعدد الشكلي المظهري ان جين الانترفيرون- كاما *IFN-γ*, له القابلية على التأثير في الامراض المناعية Immune diseases (Cantor *et al*., 2005).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (9): موقع الجين انترفيرون كاما (*IFN-γ*) Interferon-gamma على كروموسوم رقم 12. (www.genecardes.org)

دراسة وراثية في إيران على المرضى الأيرانيين المصابين بداء السكري- النوع الاول لغرض تقدير التعدد الشكلي المظهري للجين *IFN-γ*، شملت الدراسة 30 مصاباً و40 شخصاً صحياً تراوحت أعمارهم بين 4-18 سنة. اظهرت نتائج التعدد الشكلي المظهري لجين الانترفيرون- كاما 874- *IFN-γ* تردداً كبيراً للأليل T لدى الاصحاء إذ بلغت نسبته 51.25%, بينما بلغت نسبته لدى المصابين 19.3%, واظهر الأليل A تردداً كبيراً لدى المصابين بلغت نسبته 80.7%, بينما بلغت لدى الاصحاء 49.25% (Rafinejad *et al*., 2004). في دراسة اخرى بينت نتائج التعدد الشكلي المظهري لجين 874+ *IFN-γ* بان الانماط الوراثية للجين لم تظهر أية تكرارات معنوية عند العينات المدروسة, كما تبين بان تكرار النمط الوراثي TT كان اعلى تكراراً لدى المرضى بالمقارنة مع الاصحاء, واظهر النمطان الوراثيان AA وAT تكراراً اعلى لدى الاصحاء بالمقارنة مع المرضى المصابين بداء السكري (Arababadi *et al*., 2009).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

في دراسة اخرى على المرضى المصريين المصابين بداء السكري– النوع الثاني لغرض تقدير التعدد الشكلي المظهري للجين 874- *IFN-γ* باستعمال تقانة ARMS-PCR. شملت الدراسة 207 مصاباً تراوحت أعمارهم من 40-78 سنة وجمعت العينات من المستشفى الطبي في جامعة المنصورة، واظهرت النتائج ان تكرار الأليل A لدى المصابين بلغت نسبته 48.6%, وكانت نسبته لدى الاصحاء 50.9%, كما اظهرت قيمة OR (CI 95%) بينهما نسبة بلغت (0.72–1.69) 1.1, بينما اظهر الأليل T تكراراً بلغت نسبته 51.4% لدى المصابين، بينما اظهرت نسبته لدى الاصحاء 49.1%, واظهر النمط الوراثي TA تكراراً لدى المرضى إذ بلغت نسبته 76.8%, واظهر النمط نفسه نسبة اعلى في الاطفال الاصحاء بلغت 86.8%, واظهر OR (CI 95%) قيمة بلغت (0.23-1.11) 0.50, بينما اظهر النمط الوراثي TT لدى المصابين تردداً إذ بلغت نسبته 10.1%, وفي الاصحاء بلغت 7.5%، كما اظهر OR (CI 95%) قيمة بلغت (0.48-4.0) 1.38, واظهر النمط الوراثي AA تردداً بلغت نسبته 13% لدى المرضى بالمقارنة مع الاصحاء إذ بلغت نسبته 5.7%, وبلغت نسبة OR (CI 95%) بينهما (0.85–7.37) 2.5 (Elsaid *et al*., 2012).

في دراسة وراثية شملت عدداً من الاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول في دراسة التعدد الشكلي المظهري باستعمال تقانة ARMS-PCR لجين الانترفيرون 874- *IFN-γ*, إذ اظهرت النتائج عدم وجود فروقٍ معنوية, واظهر الأليل T تكراراً بلغت نسبته 48% لدى المصابين, بينما بلغ لدى الاصحاء 47.6%. اظهر الأليل A تردداً لدى المرضى بلغت نسبته 52.4%, بينما اظهر تردداً لدى الاصحاء إذ بلغت نسبته 52%, كما اظهر النمط الوراثي TA لدى المصابين تردداً إذ بلغت نسبته 51%, بينما اظهر النمط الوراثي AA نسبة أقل إذ بلغت 27%, واظهر النمط الوراثي TT تردداً بلغت نسبته 22%, اما

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الاصحاء فقد اظهر النمط الوراثي TA تردداً بلغت نسبته 52%, والنمط الوراثي AA اظهر تردداً بلغت نسبته 26%, بينما اظهر النمط الوراثي TT تردداً بلغت نسبته 22% (Bazzaz *et al*., 2014).

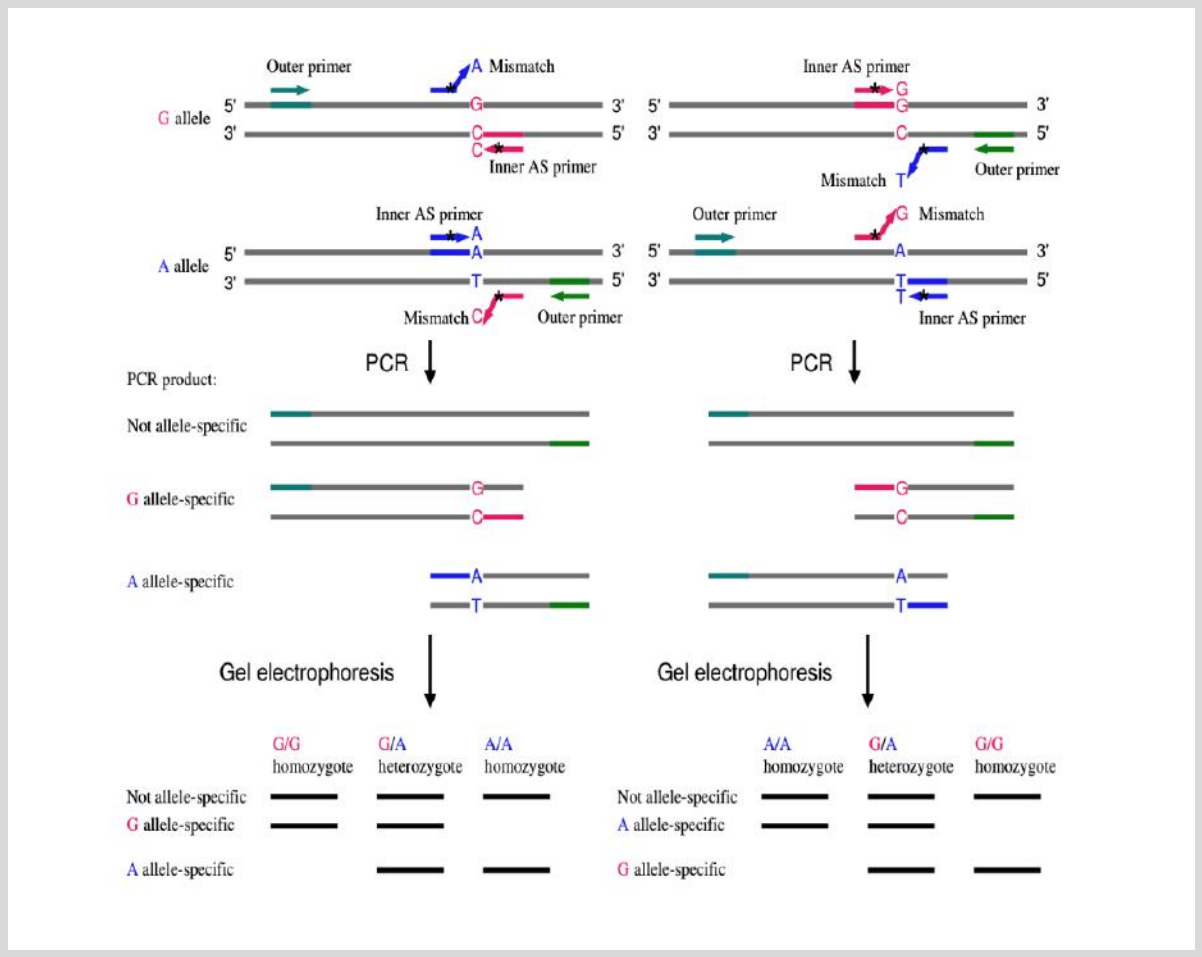
2-10: تقانة نظام الممانعة للتضخيم

Amplification refractory mutation system (ARMS-PCR)

تقانة نظام الممانعة للتضاعف قد اكتشفت لاول مرة بوساطة العالم Newton وجماعته في عام 1989م (Newton *et al*., 1989). ان تقانة ARMS-PCR النموذجي يستطيع تعيين التعدد الشكلي المظهري للنيوكلوتيدة المفردة Single nucleotide polymorphism (SNP) (Ahlawat *et al*., 2014). تقانة ARMS-PCR تتألف من تفاعلين رئسيين, الاول يحتوي على بادئ ARMS خاص لتتابع الدنا الأصلي, اما البادئ الآخر فيكون خاصاً بنوع الطفرة.

ان اكتشاف تقانة ARMS-PCR قد أعطى أهمية للدراسات الوراثية وعدت التقانة الأفضل وذلك للأسباب الآتية: **اولاً** يتم اكتشاف النمط الوراثي للطفرة بسهولة, **ثانياً** تكون سهلة الاستعمال وهذه ما تجعلها ملائمة لتحليل أعداد كبيرة من العينات في الدراسات الوراثية, **ثالثاً** والأهم تكون نسبة صحتها 99.9%, **ورابعاً** سهولة استعمال نواتجها في تحليل تسلسلات القواعد باستعمال جهاز التحليل الوراثي Genetic analyzer (Duta-Cornescu *et al*., 2009)، والشكل (10) يبين مراحل هذه التقانة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (10): مراحل تقانة ARMS-PCR (You *et al*., 2008)

www.manaraa.com

((الفصل الثالث))

3. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1: الأجهزة Instruments

الاجهزة المستخدمة في الدراسة موضحة في جدول رقم (1).

جدول (1): الأجهزة العلمية المستعملة في هذه الدراسة

اسم الجهاز	الشركة المصنعة	بلد المنشأ
ELISA system	Bio tech	USA
Laminar flow	LabTech	Korea
Microcentrifuge	Hettich-R220	Germany
Electronic balance	Kern	Germany
Thermo cycler	Esco	Singapore
Nanodrop	Act Gene	USA
U.V transilluminator	Major Science	Taiwan
Gel documentation system	Biocom	USA
pH meter	Milwaukee	Romania
Dry bath	Elite	Taiwan
Autoclave	Jaban	India
Vortex mixer	LabTech	Korea
Hot plate and stirrer	78-1	China
Water distillator	LabTech	Korea
UV-Spectrophotometer	Optima SP-3000	Japan
Power supply	Major Science	Taiwan
Genetic analyzer 3500	Applied Biosystems	USA

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-2: المواد والمحاليل المستعملة Materials and solutions

3-2-1: عينات دم المرضى المصابين بداء السكري- النوع الأول

جمعت 35 عينة دم من الأطفال المصابين بداء السكري- النوع الأول وشملت 18 عينة من الذكور و17 عينة من الاناث كان متوسط اعمارهم 9.4±0.34 من مستشفيات الطفل المركزي والمركز الوطني للسكري/ الجامعة المستنصرية في بغداد-العراق, كما جمعت 15 عينة من الأطفال الأصحاء (المجموعة القياسية) وشملت 9 عينات من الذكور و6 عينات من الاناث كان متوسط اعمارهم 10,9±0.38 للمدة من تموز عام 2014 ولغاية تشرين الأول من العام نفسه وتراوحت اعمار الاطفال من 7-12 سنة. جمع الدم في انابيب خاصة بجمع الدم بحجم 5 مليلترات بدون مانع لتخثر الدم التي استعملت في دراسات تعيين تركيز الحركيات الخلوية بجهاز ELISA وفي انابيب بحجم 2.5 مليلتر حاوية على EDTA كمانع لتخثر الدم التي استعملت في استخلاص الدنا DNA. شخصت الاصابة لدى المرضى من قبل اطباء مختصين بداء السكري في وحدة السكري في مستشفى الطفل المركزي وفي المركز الوطني للسكري واعتمد الكشف السريري والمختبري في تحديد الاصابة. نظمت أستمارة خاصة جمعت فيها معلومات عن الأطفال المصابين بداء السكري- النوع الأول والأصحاء (ملحق 1).

3-2-2: عدد تشخيص الحركيات الخلوية Interleukins kits

استعملت عدة عدد تشخيصية خاصة بالكشف عن الحركيات الخلوية وهي Interleukin-4 ELISA development kit (IL-4) ، Interleukin-10 ELISA development kit (IL-10)، Interleukin-17A ELISA development kit (IL-17A) ، Transforming growth factor-

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Interferon gamma mini ELISA و Beta mini ELISA development kit (TGF- β) development kit (INF-γ) والمصنعة من قبل شركة PepRotech البريطانية.

3-2-3: عدة استخلاص الدنا DNA من الأطفال المرضى والأصحاء

استعملت العدة ReliaPrep^{TM} Blood gDNA Miniprep System والخاصة بعزل الدنا DNA والمصنعة من قبل شركة Promega الأميريكية.

3-2-4: الملونات Dyes

3-2-4-1: ملون تحميل البروموفينول الأزرق للترحيل الكهربائي

Bromophenol blue loading dye for electrophoresis

حضر ملون التحميل بإذابة 25 مليغرام من ملون البروموفينول الأزرق Bromophenol blue في 6.7 مليلتر من الماء المقطر. أضيف 25 مليغراماً من صبغة Xylene cyanol FF و3.3 مليلتر من الكليسرول Glycerol ليصبح الحجم النهائي 10 مليلترات. حفظت الصبغة تحت درجة −20 °م لغرض الاستعمال الطويل الأمد.

3-2-4-2: ملون الأيثيديوم بروماید Ethidium bromide (EtBr)

حضر ملون الأيثديوم بروماید Ethidium bromide من المحلول الخزين للملون الذي يكون بتركيز 10 مليغرام/مليلتر (صبغة الأثيديوم بروماید مادة مسرطنة ويجب أرتداء الكفوف المختبرية عند التعامل معه). وضع هلام الآكاروز Agarose gel في حوض منفصل لغرض تلوينه بمادة الأثيديوم بروماید التي حضرت باذابتها في الماء المقطر للحصول على تركيز 0.5 مايكروغرام/مليلتر.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-2-5: محلول دارئ Tris-Borate-EDTA buffer (TBE)

حضر 10X من هذا الدارئ لغرض استعماله في الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis وذلك بإذابة 108 غرامات من مادة Tris base و55 غراماً من حامض البوريك Boric acid و40 ملليتراً من مادة Ethelene diamine tetra acetic acid (EDTA) بتركيز 0.5 مولاري. أضيف الماء المقطر المعقم وصولاً إلى لتر واحد مع تعديل الأس الهايدروجيني pH إلى 8، كما استعمل الدارئ نفسه المعد من قبل شركة Promega الأميريكية.

3-2-6: حامض الكبريتيك Sulfuric acid (H_2SO_4)

استعمل حامض الكبريتيك بتركيز 2 عياري مع العدة الخاصة بتعيين تركيز الحركي الخلوي TGF-β1.

3-2-7: حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric acid (HCl)

استعمل حامض الهيدروكلوريك بتركيز 1 عياري مع العدة الخاصة بتعيين تركيز الحركي الخلوي TGF-β1.

3-2-8: محلول هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide (NaOH)

استعمل محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 1.2 عياري وحضر 100 مليلتر منه وذلك باذابة 4.8 غرام في 100 مليلتر من الماء المقطر. استعمل هذا المحلول في تعيين تركيز الحركي الخلوي TGF-β1.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-2-9: محلول الأمونيوم بيرسيلفيت Ammonium persulphate (APS) تركيز 10%

حضر المحلول أسبوعياً وذلك بإذابة 1 غرام من هذه المادة في 10 ميليلترات من الماء المقطر.

3-2-10: دارئ التحميل Loading buffer في الكشف عن جين *IL-17*

يتكون هذا الدارئ من الفورمامايد Formamide بتركيز 98% EDTA بتركيز 10 ملي مولر وصبغة البروموفينول الأزرق Bromophenol blue بتركيز 0.005% وصبغة Xylene blue بتركيز 0.005%. حضر الدارئ في الماء الخالي من أنزيم النيوكليز المعقم Nuclease-Free water.

3-2-11: هلام الآكاروز Agarose gel

حضر هلام الآكاروز بتراكيز 1.5%، 2% و2.5% في تجارب نظام الممانعة للتضاعف بتقانة ARMS-PCR، إذ أذيب 0.6 غرام، 0.8 غرام و1 غرام من الآكاروز، وعلى التوالي في 40 مليلتراً من دارئ Tris-borate buffer (TBE). سخن الخليط عند درجة حرارة 60 °م باستعمال الصفيحة الساخنة Hot plate وحتى ذوبان الخليط وصب في حوض الترحيل المخصص.

3-2-12: محلول الأكريلمايد:المثيلينبس أكريلمايد الخزين Acrylamide:Methylenbisacrylamid (19:1)

حضر هذا المحلول الخزين بتركيز 40% وذلك باذابة 38 غراماً من Acrylamide مع 2 غرام من Methylenbisacrylamid في 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-2-13: هلام متعدد الأكريلمايد لعزل الدنا Polyacrylamide gel for DNA isolation

حضر هذا الهلام بتركيز 6% وذلك بإذابة 45 غراماً من اليوريا Urea في 10 مليلتر من دارئ TBE بتركيز 10X للحصول على تركيز 7.5 مولر و15 مليلتراً من المحلول الخزين Acrylamide:Methylenbisacrylamid (19:1) الذي تركيزه 40% وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر بالماء المقطر المعقم. أضيف لكل 10 مليلترات من هذا الهلام 50 مايكرولتراً من المحلول الخزين Ammonium persulphate (APS) بتركيز 10% و30 مايكرولتراً من محلول Tetramethylethylene diamine (TEMED).

3-2-14: خليط تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR mix

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

3-2-15: البوادئ Primers

صنعت البوادئ في شركة Alpha DNA الكندية وبحسب الطلب.

3-2-15-1: البوادئ المستعملة في الكشف عن جين الطافر (C>T) 590- *IL-4*

استعملت ثلاثة من البوادئ الخاصة في الكشف عن الجين الطافر (C>T) 590- *IL-4* وبحسب المصدر (Alsaid *et al*., 2013)، كما في التسلسلات النيكلوتيدية الآتية:

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ت	اسم البادئ	التسلسل النيوكلوتيدي البادئ (´3 → ´5)
1	T allele	5′-ACACTAAACTTGGGAGAACATTGTT-3′
2	C allele	5′-ACACTAAACTTGGGAGAACATTGTC-3′
3	Reverse	5′-GAATTTGTTAGTAATGCAGTCCTCC3′

3-2-15-2: البوادئ المستعملة في الكشف عن المحث Promoter للجينين الطافرين *IL-10* -592 و *IL-10* -1082

استعملت أربعة من البوادئ الخاصة في الكشف عن المحث Promoter للجينين الطافرين *IL-10* -592 و*IL-10* -1082 وبحسب المصدر (Mohebbatikaljahi *et al*., 2009)، كما في التسلسلات النيكلوتيدية الآتية:

ت	اسم البادئ	التسلسل النيوكلوتيدي البادئ (´3 → ´5)
1	IL-10 −592 (Forward)	5´-TGCAGACTACTCTTACCCACTTCC-3´
2	IL-10 −592 (Reverse)	5´-AATAATTGGGTCCC CCCAAC-3´
3	IL-10 −1082 (Forward)	5´-GACAACACTACTAAGGCTcCTTTGGGA-
4	IL-10 −1082 (Reverse)	5´-GTGAGCAAACTGAGGCACAGAaAT-3´

3-2-15-3: : البوادئ المستعملة في الكشف عن جيني *IL-17A* و *IL-17F*

استعملت أربعة من البوادئ الخاصة في الكشف عن الجينين *IL-17A* و*IL-17F* وبحسب المصدر (Hayashi *et al*., 2012)، كما في التسلسلات النيكلوتيدية الآتية:

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ت	اسم البادئ	التسلسل النيوكلوتيدي البادئ (´3 → ´5)
1	IL17A (Forward)	5’-AACAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT-3’
2	IL17A (Reverse)	5’-CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC-3’
3	IL17F (Forward)	5’-GTGTAGGAACTTGGGCTGCATCAAT-3’
4	IL17F (Reverse)	5’-AGTGGATATGCACCTCTTACTGCACA -3’

3-2-15-4: البوادئ المستعملة في الكشف عن الجينين الطافرين *TGF-β1* (Codon 10: +869*C/T) و*TGF-β1* (Codon 25: +915*G/C)

استعملت ثمانية من البوادئ الخاصة في الكشف عن الجينين الطافرين *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) و*TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) وبحسب المصدرين (El-Sherbini *et al.*, 2013 ; Bazzaz *et al.*, 2014) ، كما في التسلسلات النيكلوتيدية الآتية:

ت	اسم البادئ	التسلسل النيوكلوتيدي البادئ (´3 → ´5)
1	*TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) (Generic)	5′- TCCGTGGGATACTGAGACAC-3′
2	*TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) (C allele)	5′- GCAGCGGTAGCAGCAGCG-3′
3	*TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) (T allele)	5′- AGCAGCGGTAGCAGCAGCA-3′
4	*TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) (Generic)	5′- GGCTCCGGTTCTGCACTC-3′
5	*TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) (G allele)	5′- GTGCTGACGCCTGGCCG-3′
6	*TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) (C allele)	5′- GTGCTGACGCCTGGCCC-3′
7	*TGF-β1*- Internal control (Forward)	5′- GCCTTCCCAACCATTCCCTTA- 3′
8	*TGF-β1*- Internal control (Reverse)	5′- TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC- 3′

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-2-15-5: البوادئ المستعملة في الكشف عن الجين الطافر *IFN-γ* T/A +874

استعملت ثلاثة من البوادئ الخاصة في الكشف عن الجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 وبحسب المصدر (Elsaid *et al*., 2012)، كما في التسلسلات النيكلوتيدية الآتية:

ت	اسم البادئ	التسلسل النيوكلوتيدي البادئ (5´ → 3´)
1	Specific A	5`-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3`
2	Specific T	5`-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3`
3	Antisense	5` -TCAACAAAGCTGATACTCCA-3`

أذيبت جميع البوادئ في أعلاه باستعمال الماء الخالي من أنزيم النيوكليز Nuclease-Free water وبحسب النشرة المرفقة من قبل الشركة المصنعة.

3-2-16: واصمات الوزن الجزيئي للدنا DNA molecular weight markers

استعمل الواصم الجزيئي Molecular marker المصنع من قبل شركة Promega بحجم كلي 1500 زوج قاعدة وبدرجات 100 زوج قاعدة. استعمل هذا الواصم الجزيئي الوراثي في جميع تجارب الكشف عن جينات الحركيات الخلوية Interleukin genes وباستعمال الواصمات الجزيئية أعلاه وذلك لصغر قطع الدنا المتحصل عليها.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-2-17: عدة تنقية الدنا الناتج من تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

استعملت العدة AccuPrep®PCR Purification kit الخاصة بنواتج تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في دراسة التسلسل التتابعي للدنا DNA sequencing والمصنعة من قبل شركة BiONEER Corp. الكورية وبحسب النشرة المرفقة من قبل الشركة.

3-2-18: مادة BigDye terminator V3.1

استعملت مادة BigDye terminator V3.1 المصنعة من قبل شركة Applied Biosystems الأميركية. استعمل 0.5X من هذه المادة بعد تخفيفها بدارئ التسلسل التتابعي 5X Sequencing buffer والمصنع من الشركة نفسها أعلاه، وبحسب النشرة المرفقة.

3-2-19: عدة تنقية BigDye XTerminator Purification kit

استعملت عدة التنقية BigDye XTerminator Purification kit المصنعة من قبل شركة Applied Biosystems الأميركية لغرض تنقية ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل وبوجود مادة BigDye terminator V3.1 في التفاعل، وبحسب النشرة المرفقة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-3: طرائق العمل Methods

3-3-1: تعيين تركيز بروتينات الحركيات الخلوية IL-4، IL-10، IL-17، TGF-β1 وIFN-γ باستعمال جهاز ELISA

3-3-1-1: عزل المصل من العينات المدروسة

Isolation of serum from studied samples

وضعت 2.5 مليلتر من كل عينة دم مسحوبة حديثاً في الأنابيب الخالية من المادة المانعة لتخثر الدم ونبذت مركزياً بجهاز النبذ المركزي وبسرعة 1000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق. عزل المصل Serum من جميع الأطفال المرضى بداء السكري-النوع الأول والأطفال الأصحاء المشمولين بالدراسة, ووضع المصل في أنابيب نظيفة وجديدة محكمة الغلق وخزن تحت درجة 20- ْم لحين الاستعمال.

3-3-1-2: قياس مستويات الحركيات الخلوية في مصل المرضى

Determination of cytokine levels in patient's serum

تم تقدير مستوى تركيز خمسة أنواع من الحركيات الخلوية في مصل الأطفال المرضى المشمولين بالدراسة ومقارنتهم مع الأطفال الأصحاء ظاهرياً (مجموعة السيطرة) باستعمال جهاز ELISA. لتعيين تركيز جميع أنواع الحركيات الخلوية المستعملة في هذه الدراسة وهي IL-4، IL-10، IL-17A، TGF-β1 وIFN-γ في مصول الاطفال المصابين والاصحاء ظاهرياً وذلك باستعمال طريقة الامتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم ELISA، وأتبعت طريقة العمل المعتمدة على مبدأ تميز اللون الناتج عن ارتباط الاضداد

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

النوعية بالمستضد والمعايرة القياسية المجهز من قبل شركة PepRotech البريطانية. لقد تمثلت محتويات العدة بالآتي:-

1. صفيحة الجهاز ELISA plate: تحوي هذه الصفيحة على 96 حفرة Wells.
2. محلول مسك الأجسام المضادة Capture antibody: وهي عبارة عن أجسام مضادة خاصة بالحركيات الخلوية المطلوبة لكل من IL-4، IL-10، IL-17A، TGF-β1 و IFN-γ.
3. المحلول القياسي Standard solution: ويكون هذا المحلول محضراً من قبل الشركة والذي يرتبط مع الأجسام المضادة Ab الذي يكون خاصاً لكل حركي خلوي.
4. محلول تعيين الجسم المضاد Detection Antibody: وهي أجسام مضادة Ab لهذه الحركيات الخلوية تحمل على سطحها بروتين البايوتين Biotin.
5. محلول الاقتران Avidin-HRP (Horseradish protein): وهو عبارة عن محلول حاوٍ على البروتين الرابط.

كما أن هناك محاليل خاصة بعدد الحركيات الخلوية والتي خففت بالماء المقطر ودرجة التخفيف تعتمد على قيمة التخفيف المدونة على القناني المرفقة مع العدة والمزودة من قبل الشركة، علماً بأن المحاليل المرافقة للعدة هي:

1. دارئ الغسل Washing buffer: استعمل دارئ الغسل لغسل الطبق Plate بين الأضافات وخفف بمقدار 20 مرة بالماء المقطر، وهو مكون من Tween بتركيز 0.05% مع Phosphate buffer saline (PBS).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2. محلول PBS solution: خفف هذا المحلول بالماء المقطر بمقدار 20 مرة واستعمل بالإضافة الأولى لتخفيف محلول مسك الأجسام المضادة Capture antibody، إذ ساعد على تثبيت Ab في قعر حفر الطبق.
3. محلول الصد Blocking solution: لا يخفف هذا المحلول واستعمل كما هو مزود من قبل الشركة ويكون كطبقة عازلة لمنع الالتصاقات الجانبية للأجسام المضادة على جوانب الحفر ويتكون من Bovine serum albomin (BSA) بتركيز 1% مذاباً في محلول PBS.
4. محلول التخفيف Diluent solution: خفف هذا المحلول بمقدار 20 مرة بالماء المقطر واستعمل لتخفيف كل من المحاليل القياسية Standard, ومحاليل الكشف Detection وبروتين Aviden وهو مهم جداً ومكون من Tween بتركيز 0.05%، وBAS بتركيز 1% مذاباً في محلول PBS.
5. ABTS liquid substrates: استعملت هذه المادة الفعالة كخطوة أخيرة وهي محضرة وجاهزة من الشركة، إذ يعمل على تغير اللون ليساعد الجهاز على القراءة.

قبل اجراء عملية تعيين تراكيز الحركيات الخلوية فقد وضعت المحاليل والعينات بدرجة حرارة الغرفة 25 °م ولمدة 30 دقيقة قبل بدء القياس بجهاز ELISA.

3-3-1-3: طريقة العمل

وضعت كل أنبوبة Vial في جهاز النبذ المركزي قبل الاستعمال، وكانت طريقة العمل وبحسب النشرة المرفقة من قبل الشركة المصنعة كما يأتي:

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

1. اذيب محلول مسك الأجسام المضادة Capture Ab المرفق مع العدة بـ 110 مايكروليترات من الماء المقطر المعقم, ومن ثم سحب منه 55 مايكرولتراً وأضيف إلى 10 مليلترات من محلول PBS المخفف مسبقاً.
2. وزعت 100 مايكرولتر من محلول مسك الأجسام المضادة Capture Ab المحضرة على كل حفرة من حفر الصفيحة Plate.
3. تركت الصفيحة Plate لليوم التالي بعد أن تم تغطيتها بغطاء خاص لمنع التلوث, ومن ثم حضنت في مكان مظلم وتركت تحت درجة حرارة الغرفة.
4. في اليوم التالي، غسلت الصفيحة بمحلول الغسل Washing buffer المعد مسبقاً بوساطة جهاز الغسل وبحجم 300 مايكرولتر للحفرة الواحدة وكررت عملية الغسل 4 مرات.
5. جففت الصفيحة وذلك بقلبها على مناديل ورقية نظيفة وتم ضربها عدة مرات للتخلص من الماء الزائد.
6. وضع دارئ الصد Block buffer وبحجم 300 مايكرولتر في كل حفرة وترك لمدة ساعة تحت درجة حرارة الغرفة.
7. خلال هذه المدة بدأ بتحضير المحاليل القياسية كما ياتي:

- ذوبت المحاليل القياسية الخاصة لكل حركي خلوي في1 مليلتر من الماء المقطر المعقم.
- حضرت سبعة أنابيب اختبار فالأنبوب الأول يحتوي على 1 مليلتر من محلول التخفيف Diluent solution والمحضر مسبقاً، أما الأنابيب الستة الأخرى فوضع فيها 0.5 مليلتر من المحلول المخفف.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- أخذ 5 مايكرولترات من المحلول القياسي Standard solution المذاب ووضع في الأنبوب الأول الحاوي على 1 مليلتر من المحلول المخفف، ومن ثم نبدأ بعمل تخافيف المحاليل القياسية المتسلسلة Serial dilution.
- أخذ 0.5 مليلتر من الأنبوب رقم 1 ووضعت على الأنبوب رقم 2 وبعدها أخذ المقدار نفسه 0.5 مليلتر من الأنبوب رقم 2 ووضعتا على الأنبوب رقم 3، وهكذا وصولاً إلى آخر أنبوب والذي هو رقم 7 لتصبح التراكيز من الأنبوبة رقم 1 إلى الأنبوبة رقم 7 هي 5000، 2500، 1250، 625، 312.5، 156.25 و78.125 بيكوغرام/مليلتر، وعلى التوالي.

8. بعد انتهاء مدة الانتظار غسلت الصفيحة بجهاز الغسل وكررت عملية الغسل 4 مرات ونشفت وجففت جيداً.
9. وضع في أول حفرتين 100 مايكرولتر من محلول التصفير Blank solution والذي يمثل المحلول المخفف والخالي من أية أضافات لغرض تصفير الجهاز.
10. أضيف 100 مايكرولتر من كل أنبوب من المحاليل القياسية السبعة بشكل تدريجي من أقل تركيز إلى أعلى تركيز في الحفر الموجودة على الصفيحة.
11. بعدها أضيف 100 مايكرولتر من أمصال الأطفال المصابين والأطفال الأصحاء (العينة القياسية) المشمولين بالدراسة كل على حدة باستثناء الحركي الخلوي TGF-β الذي حضر تحضيراً خاصاً، إذ حضرت العينات وذلك بأخذ 20 مايكرولتر من مصل الدم لكل عينة ثم أضيف لها 20 مايكرولتراً من حامض الهايدروكلوريك HCL بتركيز 1 عياري ثم حضنت لمدة عشر دقائق تحت درجة حرارة الغرفة, ثم أضيف أليها 20 مايكرولتر من هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 1.2 عياري

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وحضنت لمدة عشر دقائق تحت درجة حرارة الغرفة, ليصبح لدينا 60 مايكرولتراً من المحلول المحضر. أخذ 10 مايكرولترات من المحلول المحضر وأضيف أليه 90 مايكرولتراً من دارئ التخفيف Dilution buffer ليصبح الحجم النهائي 100 مايكرولتر ثم وضعت في حفرة الصفيحة.

12. تركت الصفيحة لمدة ساعة ونصف إلى ساعتين تحت درجة حرارة الغرفة.

13. خلال هذه المدة حضر محلول تعيين الجسم المضاد Detection Ab، إذ اذيب بإضافة 110 مايكرولتراً من الماء المقطر المعقم ثم سحب منه 55 مايكرولتراً ووضعت في 10 مليلترات من محلول التخفيف.

14. بعد أنتهاء مدة الأنتظار غسلت الصفيحة وكرر الغسل 4 مرات بجهاز الغسل وجففت بشكل جيد.

15. أضيف 100 مايكرولتراً من محلول تعيين الجسم المضاد Detection Ab المحضر خلال فترة الأنتظار إلى كل حفرة في الصفيحة.

16. تركت الصفيحة لفترة ساعة ونصف إلى ساعتين تحت درجة حرارة الغرفة.

17. خلال هذه المدة حضر بروتين الربط Avidine وهو سائل مجهز مع العدة من قبل الشركة وسحب منه 5.5 مايكرولتر وأضيف إلى 10 مليلترات من محلول التخفيف.

18. بعد أنتهاء مدة الانتظار غسلت الصفيحة وكررت عملية الغسل 4 مرات بجهاز الغسل وجففت جيداً.

19. أضيف 100 مايكرولتر من بروتين الربط Avidine والمحضر خلال مدة الانتظار وترك لمدة 30 دقيقة تحت درجة حرارة الغرفة.

20. غسل بعد انتهاء مدة الانتظار باستعمال جهاز الغسل وجفف جيداً بعد الانتهاء من عملية الغسل.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

21. أضيف 100 مايكرولترً من محلول ABTS في كل الحفر، باستثناء الأنترلوكين TGF-β الذي أضيف أليه 100 مايكرولتراً في كل حفرة من حفر الصفيحة من محلول Ophenal daiaminobenzidine (OPD) الذي حضر باذابة حبة واحدة في 5 مليلترات من محلول Phosphate citrate buffer solution (PCBS) (حضر بأذابة كبسولة من هذه المادة في 5 مليلترات من الماء المقطر، والموجودة مع العدة المجهزة من قبل الشركة المصنعة), ثم حضنت لفترة من 15–30 دقيقة وحددت هذه المدة من خلال القراءة اللونية للحفرة التي ظهرت باللون البني ويبدأ من البني الفاتح الى البني الغامق بسبب التفاعل الحاصل داخل الحفرة, ثم أوقف التفاعل بإضافة 50 مايكرولتراً من حامض الكبريتيك Sulfuric acid بتركيز 2 عياري والمخفف ست مرات لكل حفرة.

22. أدخلت الصفيحة إلى داخل جهاز ELISA بعد 5 دقائق من الإضافة وكررت عملية الادخال بعد 10 و15 دقيقة وعلى الطول الموجي 405 نانوميترات لنحصل في نهاية الأمر على ثلاث قراءات وبثلاثة أوقات, بأستثناء الأنترلوكين TGF-β، إذ قرئت النتائج بجهاز ELISA عند طول موجي 490 نانوميتر وأخذت قراءة واحدة فقط بسبب توقف التفاعل.

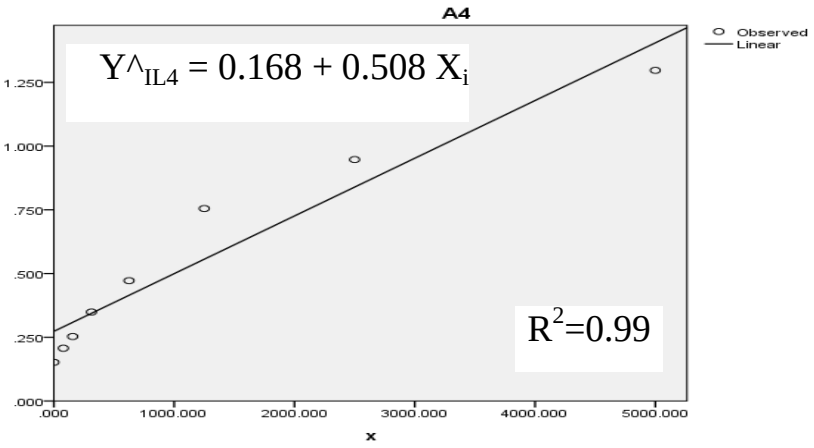
23. جمعت القراءات الثلاثة واستخرج متوسط القراءات الذي كان يمثل الكثافة البصرية Optical density (OD).

24. استعملت المحاليل القياسية مع قيم كثافتها البصرية لغرض رسم المنحى القياسي لغرض استخراج قيم تراكيز الحركيات الخلوية في الأطفال المرضى بداء السكري–النوع الأول والأطفال الأصحاء.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-3-1-4: حساب تراكيز الحركيات الخلوية في أمصال دم المصابين والعينة القياسية

قيست الكثافة البصرية للحركيات الخلوية المدروسة في أمصال عينات المصابين بداء السكري-النوع الأول والعينة القياسية (الأصحاء) باستعمال جهاز ELISA, وسجلت نتائج العينات المدروسة بوساطة تسقيط القراءات على المنحنى القياسي Standard curve لغرض استخراج تراكيز الحركيات الخلوية المشمولة بهذه الدراسة وهي IL-4، IL-10، IL-17A، IFN-γ وTGF-β لدى المصابين والعينة القياسية، وتبين الأشكال (11-15) المنحنيات القياسية ومعادلاتها المستعملة لأستخراج تراكيز الحركيات الخلوية.

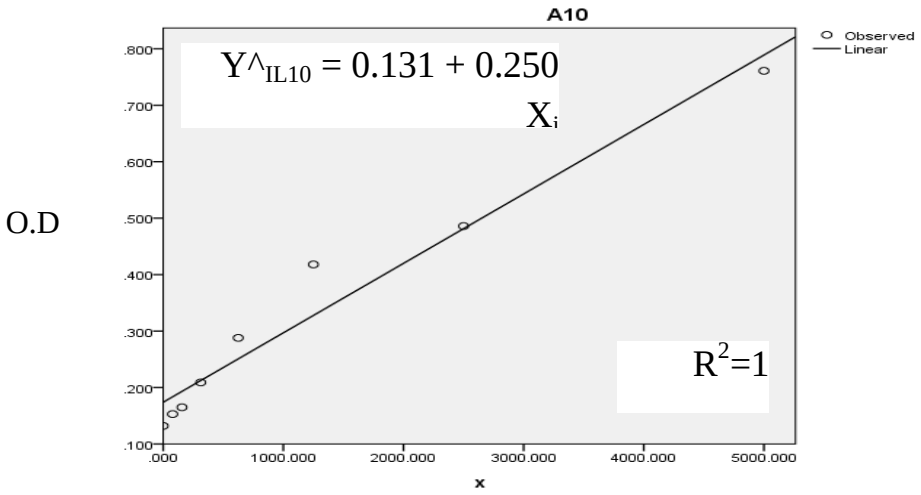


O.D

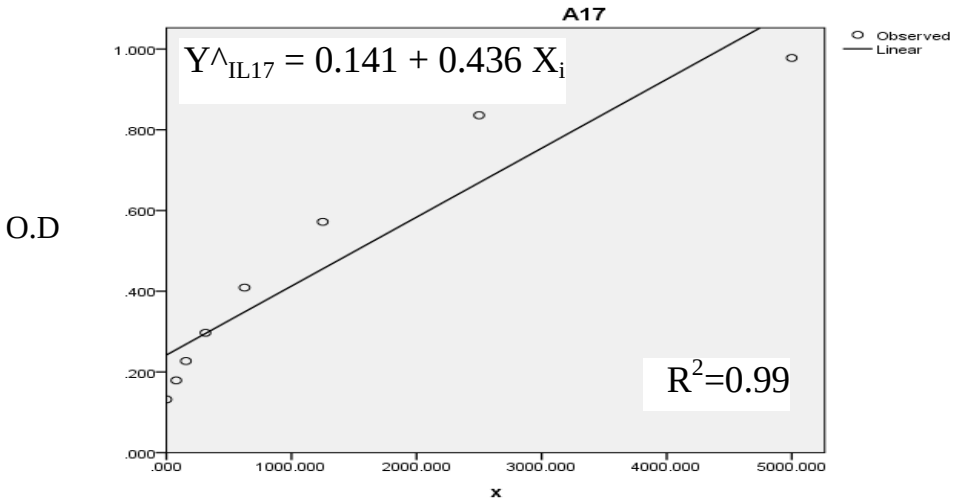
التركيز بيكوغرام/مليلتر

شكل (11): المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز IL-4

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

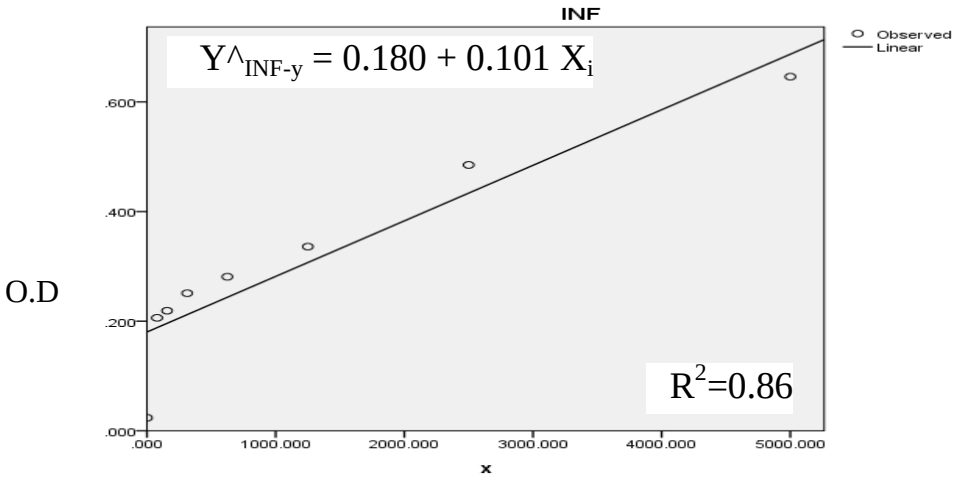


شكل (12): المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز IL-10



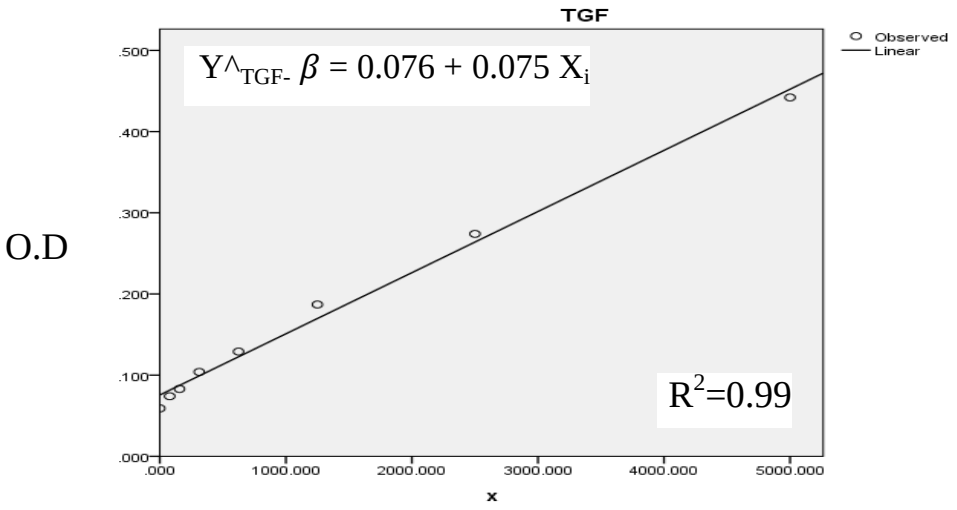
شكل (13): المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز IL-17A

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



التركيز بيكوغرام/مليلتر

شكل (14): المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز IFN-γ



التركيز بيكوغرام/مليلتر

شكل (15): المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز TGF-β

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-3-2: استخلاص الدنا الكلي

عزل الدنا DNA من عينات الدم المأخوذة من الأطفال المصابين بداء السكري-النوع الأول والأطفال الأصحاء وباستعمال العدة ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System والخاصة بعزل الدنا DNA والمصنعة من قبل شركة Promega الأميريكية، ويمكن تلخيص طريقة العمل وكما يأتي:

1. خلطت عينات الدم المسحوبة لمدة 10 دقائق في هزاز تحت درجة حرارة الغرفة وفي حالة الدم المجمد فقد ذوب كلياً قبل عملية الخلط.

2. أضيف 20 مايكروليتر من محلول أنزيم Proteinase K (PK) والمزود من قبل الشركة في العدة المستعملة إلى أنبوبة Eppendorf بحجم 1.5 مليلتر.

3. أضيف 200 مايكرولتر من كل عينة دم مسحوبة من الأطفال المرضى والأصحاء إلى الأنابيب الحاوية على محلول أنزيم Proteinase K (PK) وخلطت ولمدة قصيرة.

4. أضيف 200 مايكرولتر من دارئ تحلل الخلايا Cell Lysis Buffer (CLD) وخلط باستعمال الهزاز Vortex لمدة 10 ثوانٍ. هذا الخليط يكون أساسياً للحصول على كمية ناتج جيدة.

5. حضنت العينات تحت درجة حرارة 56 °م ولمدة 10 دقائق.

6. خلال مدة الحضن وضعت الأنابيب الخاصة بارتباط الدنا ReliaPrep™ Binding Column في أنابيب الجمع الخاصة والفارغة Collection Tube.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

7. بعد أنتهاء مدة الحضن، أضيف 250 مايكرولتراً من دارئ الارتباط Binding Buffer (BBA) وخلط باستعمال الهزاز لمدة 10 ثوانٍ. الخليط المتحلل يجب أن يكون لونه أخضر غامقاً عند هذه المرحلة وأن عملية الخلط بالهزاز مهمة لغرض الحصول على ناتج جيد.

8. نقل الخليط إلى أنابيب الارتباط ReliaPrep™ Binding Column ونبذت مركزياً باستعمال جهاز النبذ المركزي بسرعة 14000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة. بعد الأنتهاء من النبذ دقق فيما إذا كان الجزء المذاب والمتحلل قد مر من خلال أنبوبة الارتباط إلى أنبوبة الجمع وفي حالة عدم مرور جميع الجزء المذاب فيتم نبذه لمدة دقيقة واحدة أخرى.

9. بعد الأنتهاء من عملية النبذ المركزي تخلص من أنبوب الجمع وتستبدل بأخرى نظيفة.

10. أضيف 500 مايكرولتر من محلول الغسل Column Wash Solution (CWD) ونبذت مركزياً بسرعة 14000 دورة/دقيقة ولمدة 3 دقائق وتخلص من الجزء الذي تجمع بأنبوبة الجمع وفي حالة بقاء كميات صغيرة من محلول الغسل نبذت مركزياً لمدة دقيقة واحدة.

11. أعيدت الخطوة السابقة لمرتين ليصبح عدد مرات الغسل ثلاث مرات.

12. نقلت أنبوبة الارتباط ReliaPrep™ Binding Column إلى أنبوبة Eppendorf بحجم 1.5 مليلتر نظيفة ومعقمة وأضيف من 50–200 مايكرولتر من الماء الخالي من النيوكليز Nuclease-Free water إلى أنبوبة الارتباط ونبذت مركزياً بسرعة 14000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة. تخلص من أنبوبة الارتباط وجمع الدنا في أنبوبة Eppendorf.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

13. عين تركيز ونقاوة الدنا باستعمال Nanodrop باستخراج نسبة A_{260}/A_{280} وأن الدنا النقي تكون قيمة نسبة الامتصاص له 1.8±0.1 (Clark, 1997), وحفظت العينات بعد ذلك تحت حرارة – 20 °م لحين الاستعمال.

3-3-3: الكشف عن الطفرة (C>T) 590- للجين IL-4

استعملت في هذه الدراسة تقانة Amplification refractory mutation (ARMS-PCR) system في الكشف عن الجين الطافر *IL-4* -590 (C>T) . حضر الخليط الأساسي Master Mix للبوادئ المستعملة وبحسب المصدر (Alsaid *et al*., 2013) مع بعض التحوير، كما في أدناه:

المركب Component	الحجم	التركيز
Go Taq® Green Master Mix (2X)	12.5 مايكرولتر	1X
البادئ* Primer	2 مايكرولتر لكل بادئ	1.0 مايكرمولر
قالب الدنا DNA template	2 مايكرولتر	100 نانوغرام
ماء خالي من النيوكليز Nuclease-Free water	لغاية حجم 25 مايكرولتر	-

*= استعمل البادئان T allele وReverse للكشف عن الأليل T والبادئان C allele وReverse للكشف عن الأليل C.

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف التفاعل، كما في أدناه:

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الخطوات	درجة الحرارة والدورات		الوقت
مسخ القالب Denature template	96 م°		1 دقيقة
المسخ الأولي Initial denaturation	95 م°	10 دورات	15 ثانية
الألتحام Annealing	65 م°		50 ثانية
الأستطالة Extension	72 م°		40 ثانية
المسخ الأولي Initial denaturation	95 م°	20 دورة	50 ثانية
الألتحام Annealing	59 م°		50 ثانية
الأستطالة Extension	72 م°		50 ثانية
الأستطالة النهائية Final Extension	72 م°		7 دقائق
المرحلة النهائية للحضن	4 م°		حسب الرغبة

3-3-4: الكشف عن المحث Promoter للجين *IL-10* في الموقعين 592- و1082-

استعملت في هذه الدراسة طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) في الكشف عن المحث Promoter للجينين الطافرين 592- *IL-10* و1082- *IL-10* . حضر الخليط الأساسي Master Mix للبوادئ المستعملة وبحسب المصدر (Mohebbatikaljahi *et al*., 2009) مع بعض التحوير، كما في أدناه:

المركب Component	الحجم	التركيز
Go Taq® Green Master Mix (2X)	12.5 مايكرولتر	1X
البادئ* Primer	2 مايكرولتر لكل بادئ	1.0 مايكرمولر
قالب الدنا DNA template	2 مايكرولتر	100 نانوغرام
ماء خالي من النيوكليز Nuclease-Free water	لغاية حجم 25 مايكرولتر	-

*= استعمل البادئان Forward و Reverse للكشف عن المحث للجينين 592– *IL-10* و 108– *IL-10* وكلاً على حدة.

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف التفاعل، كما في أدناه:

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الخطوات	درجة الحرارة والدورات		الوقت
مسخ القالب Denature template	94 مº		5 دقائق
المسخ الأولي Initial denaturation	94 مº	30 دورة	15 ثانية
الألتحام Annealing	55 مº		15 ثانية
الأستطالة Extension	72 مº		30 ثانية
الأستطالة النهائية Final Extension	72 مº		5 دقائق
المرحلة النهائية للحضن	4 مº		حسب الرغبة

3-3-5: الكشف عن جين *TGF-β1* في الموقعين الطافرين (Codon 10: +869*C/T) و(Codon 25: +915*G/C)

استعملت في هذه الدراسة طريقة Amplification refractory mutation (ARMS-PCR) system في الكشف عن الجينين الطافرين *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) و *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C). حضر الخليط الأساسي Master Mix للبوادئ المستعملة وبحسب المصدرين El-Sherbini *et al*., 2013 وBazzaz *et al*., 2014، كما في أدناه:

المركب Component	الحجم	التركيز
Go Taq® Green Master Mix (2X)	12.5 مايكرولتر	1X
البادئ* Primer	2 مايكرولتر لكل بادئ	1.0 مايكرمولر
قالب الدنا DNA template	2 مايكرولتر	100 نانوغرام
ماء خالي من النيوكليز Nuclease-Free water	لغاية حجم 25 مايكرولتر	-

*= استعمل البادئان T allele وGeneric للكشف عن الأليل T والبادئان C allele وGeneric للكشف عن الأليل C في الكشف عن الأليل، *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T)، بينما استعمل البادئان G allele وGeneric للكشف عن الأليل G والبادئان C allele وGeneric للكشف عن الأليل C في الكشف عن الأليل، *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C). البادئان Internal control الأمامي Forward والخلفي Reverse استعملا لتضخيم جين *TGF-β1* الذي عُد كسيطرة لغرض المقارنة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف التفاعل، وكما في أدناه:

الخطوات		درجة الحرارة والدورات		الوقت
مسخ القالب	Denature template	95 م°		1 دقيقة
المسخ الأولي	Initial denaturation	95 م°	10 دورات	15 ثانية
الألتحام	Annealing	65 م°		15 ثانية
الأستطالة	Extension	72 م°		40 ثانية
المسخ الأولي	Initial denaturation	95 م°	20 دورة	20 ثانية
الألتحام	Annealing	56 م°		20 ثانية
الأستطالة	Extension	72 م°		50 ثانية
الأستطالة النهائية	Final Extension	72 م°		7 دقائق
المرحلة النهائية للحضن		4 م°		حسب الرغبة

3-3-6: الكشف عن الطفرة 874+ T/A للجين *IFN-γ*

استعملت في هذه الدراسة تقانة (ARMS-PCR) Amplification refractory mutation system للكشف عن الجين الطافر *IFN-γ* 874+. حضر الخليط الأساسي Master Mix للبوادئ المستعملة وبحسب طريقة Elsaid *et al.*, 2012 ، كما في أدناه:

المركب Component	الحجم	التركيز
Go Taq® Green Master Mix (2X)	12.5 مايكرولتر	1X
البادئ* Primer	2 مايكرولتر لكل بادئ	1.0 مايكرمولر
قالب الدنا DNA template	2 مايكرولتر	100 نانوغرام
ماء خالي من النيوكليز Nuclease-Free water	لغاية حجم 25 مايكرولتر	-

*= استعمل البادئان Specific A وAntisense للكشف عن الأليل A والبادئان Specific T وAntisense للكشف عن الأليل T.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف التفاعل، كما في أدناه:

الخطوات		درجة الحرارة والدورات		الوقت
مسخ القالب	Denature template	95 م°		3 دقيقة
المسخ الأولي	Initial denaturation	95 م°	10 دورات	15 ثانية
الألتحام	Annealing	65 °م		50 ثانية
الأستطالة	Extension	72° م		40 ثانية
المسخ الأولي	Initial denaturation	95 م°	20 دورة	50 ثانية
الألتحام	Annealing	55 م°		50 ثانية
الأستطالة	Extension	72 م°		50 ثانية
الأستطالة النهائية	Final Extension	72 م°		7 دقائق
المرحلة النهائية للحضن		4 م°		حسب الرغبة

حملت نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البوادئ أعلاه لعينات الدنا للأطفال المصابين بداء السكري–النوع الأول والأطفال الأصحاء (العينة القياسية) في المكان المخصص لها في هلام الآكاروز بتركيز 1.5% عند الكشف عن محث الجينين الطافرين *IL-10* -592 و*IL-10* -1082 والجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 ، 2% عند الكشف عن الجينين الطافرين *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) و*TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) و2.5% عند الكشف عن الجين الطافر *IL-4* -590 (C>T)، كما حمل الواصم الجزيئي الوراثي بحسب النشرة المرفقة معه الذي كان بحجم 1500 زوج قاعدة. صبغة تحميل البروموفينول الأزرق للترحيل الكهربائي Bromophenol blue في كل عينة بحجم 3 مايكرولترات ورحلت العينات كهربائياً من القطب الأسود السالب باتجاه القطب الأحمر الموجب تحت جهد كهربائي 75 فولتاً ولمدة من 3–4 ساعات وباستعمال محلول دارئ Tris-Borate-EDTA buffer (TBE) بتركيز 1X (حضر من الدارئ الخزين الذي كان بتركيز 10X والمزود من قبل شركة Promega الأميركية). صبغ

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

هلام الآكاروز بصبغة الأثيديوم بروماید Ethidium bromide (EtBr) لمدة 15 دقيقة، وشوهدت وصورت قطع الدنا المتضخمة بوساطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

3-3-7: الكشف عن جيني *IL-17A* و*IL-17F*

استعملت في هذه الدراسة تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في الكشف عن الجينين *IL-17A* و*IL-17F*. حضر الخليط الأساسي Master Mix للبوادئ المستعملة وبحسب طريقة (Hayashi *et al.*, 2012)، وكما في أدناه:

المركب Component	الحجم	التركيز
Go Taq® Green Master Mix (2X)	12.5 مايكرولتر	1X
البادئ* Primer	2 مايكرولتر لكل بادئ	1.0 مايكرمولر
قالب الدنا DNA template	2 مايكرولتر	100 نانوغرام
ماء خالي من النيوكليز Nuclease-Free water	لغاية حجم 25 مايكرولتر	-

*= استعمل البادئان Forward و Reverse للكشف عن الجينين *IL-17A* و *IL-17F* وكل على حدة.

وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف التفاعل، كما في أدناه:

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الخطوات	درجة الحرارة والدورات		الوقت
مسخ القالب Denature template	96 م°		90 ثانية
المسخ الأولي Initial denaturation	96 م°	35 دورة	15 ثانية
الألتحام Annealing	58 م°		30 ثانية
الأستطالة Extension	72 م°		45 ثانية
الأستطالة النهائية Final Extension	72 م°		3 دقائق
المرحلة النهائية للحضن	4 م°		حسب الرغبة

حمل 10 مايكرولترات من نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البوادئ أعلاه لعينات دنا الأطفال المصابين بداء السكري–النوع الأول والأطفال الأصحاء (العينة القياسية) وأضيفت لها 10 مايكرولترات من دارئ التحميل Loading buffer (فورمومايد بتركيز 98%، EDTA (pH 8) 10 ملي مولر، بروموفينول الأزرق بتركيز 0.005% و Xylene cyanol بتركيز 0.005%). مسخ ناتج التفاعل تحت حرارة 95 م° ولمدة 5 دقائق ومن ثم وضع مباشرة على الثلج. أخذ 5 مايكرولترات من هذا الناتج لكل عينة وحملت العينات في المكان المخصص لها على هلام المتعدد الأكريلمايد لعزل الدنا Polyacrylamide gel for DNA isolation بتركيز 6%، كما حمل الواصم الجزيئي الوراثي بحسب النشرة المرفقة معه الذي كان بحجم 1500 زوج قاعدة. رحلت العينات كهربائياً من القطب الأسود السالب باتجاه القطب الأحمر الموجب تحت جهد كهربائي 75 فولتاً ولمدة من 3–4 ساعات أو إلى أن تصل صبغة التحميل على بعد 2–3 سنتيمترات من أسفل الهلام وباستعمال محلول دارئ Tris-Borate-EDTA buffer (TBE) بتركيز 1X. صبغ هلام الآكاروز بصبغة الأثيديوم بروماید Ethidium bromide (EtBr) لمدة 15 دقيقة، وشوهدت وصورت قطع الدنا المتضخمة بوساطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-3-8: التسلسل التتابعي للدنا DNA sequencing لمحث الجين IL-10 في الموقعين الطافرين 592- و1082-

آجري التسلسل التتابعي للدنا في المختبر الخدمي المركزي/ كلية التربية للعلوم الصرفة– ابن الهيثم/ جامعة بغداد, واستعملت تقانة التسلسل التتابعي للدنا في دراسة المحث للجين *IL-10* في الموقعين 592- و 1082- على المستوى النيوكليوتيدي لعشرة عينات كان منها خمس لكل من عينات الأطفال المصابين والأصحاء التي تمتلك تراكيز عالية من الحركي الخلوي IL-10 أو لايملكون أي انتاج لهذا الحركي الخلوي بالمقارنة مع متوسط تركيز هذا الحركي في عينة المصابين والعينة القياسية. نقيت نواتج PCR باستعمال عدة التنقية المصنعة من قبل شركة Bionner الكورية، وبحسب النشرة المرفقة. أجري تفاعل PCR في أنبوبة PCR الخاصة حجم 0.2 مليلتر، وبحسب طريقة العمل الموصى بها من قبل شركة Applied Biosystems وبتركيز نهائي 0.5X لمادة BigDye terminator V3.1 وكما في أدناه:

المركب Component	الحجم	التركيز
BigDye terminator V3.1	4 مايكرولتر	1X
5X Sequencing buffer	2 مايكروليتر	5 X
البادئ* Primer	1 مايكرولتر	3.2 بيكومول
قالب الدنا المنقى DNA template	2 مايكروليتر	100 نانوغرام
ماء خالي من النيوكليز Nuclease-Free water	الحجم لغاية 20 مايكروليتر	-

*= استعملت البوادئ كل بحسب الجين المدروسة، وتكون أما أمامية Forward أو راجعة Reverse.

بعد خلط المكونات أعلاه باستعمال جهاز الهزاز Vortex ثم نبذت بجاز الطرد المركزي. وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف التفاعل، كما في أدناه:

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الخطوات	درجة الحرارة والدورات		الوقت
مسخ القالب Denature template	96 مº		1 دقيقة
المسخ الأولي Initial denaturation	96 مº	30 دورة	15 ثانية
الألتحام Annealing	50 م°		10 ثانية
الأستطالة Extension	60º م		4 دقيقة
المرحلة النهائية للحضن	4 مº		حسب الرغبة

نقلت العينات أعلاه على طبق جهاز التحليل الوراثي Genetic analyzer 3500 والحاوي على 96 حفرة ومن ثم نقت نواتج التفاعل أعلاه (20 مايكرولتراً لكل عينة) باستعمال عدة التقانة BigDye XTerminator Purification kit وبحسب النشرة المرفقة، إذ وضع 90 مايكرولتراً من محلول SAM و20 مايكرولتراً من محلول خليط تفاعل التسلسل التتابعي Sequencing reaction في كل حفرة حاوية على ناتج PCR أعلاه. رج الطبق الحاوي على العينات باستعمال جهاز الهزاز Vortex لمدة 30 دقيقة. نبذت العينات بطردها مركزياً لمدة قصيرة وحمل الطبق بعد ذلك بجهاز التحليل الوراثي وقرئت النتائج بعد استعمال بروتوكول BDxStdSeq50_POP7_1BDTv3.1_PA_Protocol والمزود مع البرنامج الخاص للجهاز.

3-3-9: التحليلات الاحصائية

حللت البيانات باستعمال البرنامج الاحصائي Statistical Package for Social Sciences ver. 22 (SPSS)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبارات Mann-Whitney U

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وفشر Fisher's تحت مستوى احتمالية P<0.05، كما حسب معامل الارتباط بين الحركيات الخلوية وفق اختبار Person correlation عند مستوى احتمالية 0.05. حللت تكرارات الأنماط الوراثية وأليلاتها والنسبة الحرجة Odds ratio (OR) ومدة الثقة Confidence Intervals (CI) باستعمال البرنامج Compare Ver.3.04 2 والمصنع من قبل J. H. Abramson عام 2003–2013، كما حللت النتائج باستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium وبحسب البرنامج الموجود في الموقع الألكتروني www.had2know.com/academics.html. نتائج دراسة التسلسل التتابعي للدنا قد حللت باستعمال برنامج Chromas Pro المصنع من قبل شركة Technelysium Pty Ltd (ChromasPro version 1.6, 2012). وبرنامج BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

((الفصل الرابع))

4: النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1: العينات المدروسة للمصابين بداء السكري- النوع الاول

شملت الدراسة 50 عينة دم مأخوذة من أطفال تراوح أعمارهم من 7-12 سنة, وشملت الدراسة على 35 عينة دم (18 ذكراً و17 من الاناث), لأطفال مصابين بداء السكري- النوع الاول, إذ كان متوسط أعمارهم 0.34±9.4 سنة, كما شملت الدراسة 15 عينة دم (9 ذكور و6 من الاناث) لأطفال اصحاء ظاهرياً والتي عُدت كعينة قياسية وكان متوسط أعمارهم 0.38±10.9 سنة. أجريت دراسات مناعية ووراثية على عينات الدم المأخوذة من الاطفال المصابين والاصحاء (العينة القياسية).

4-2: الجانب المناعي

قُدرت مستويات تركيز بعض الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب Pro-inflammatory ومضادة الالتهاب Anti-inflammatory في العينات المدروسة باستعمال تقنية الامتزاز المناعي المرتبط بالانزيم الأليزا (Enzy-Linked ImmunoSorbent Assay) ELISA.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

4-2-1: مستوى تركيز الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب في مصل دم العينات المدروسة

4-2-1-1: تركيز الانترفيرون- كاما Interferon-gamma (IFN-γ)

يبين الجدول (2) أرتفاعاً ملحوظاً في تركيز الانترفيرون- كاما في مصل المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية (الاصحاء), إذ بلغ التركيز في مصل دم المصابين 1.575±0.179 بيكوغرام/مليلتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.921±0.178 بيكوغرام/مليلتر (الشكل 16). نتائج التحليل الاحصائي باستعمال اختبار Mann-Whitney U قد اظهر وجود فروقٍ معنوية في تركيز للانترفيرون- كاما بين الاطفال المصابين بداء السكري- النوع الاول والعينة القياسية وتحت مستوى احتمالية $P<0.05$ ، إذ بلغت قيمة الاحتمالية 0.035.

جدول (2): تركيز IFN-γ في مصل العينات المدروسة.

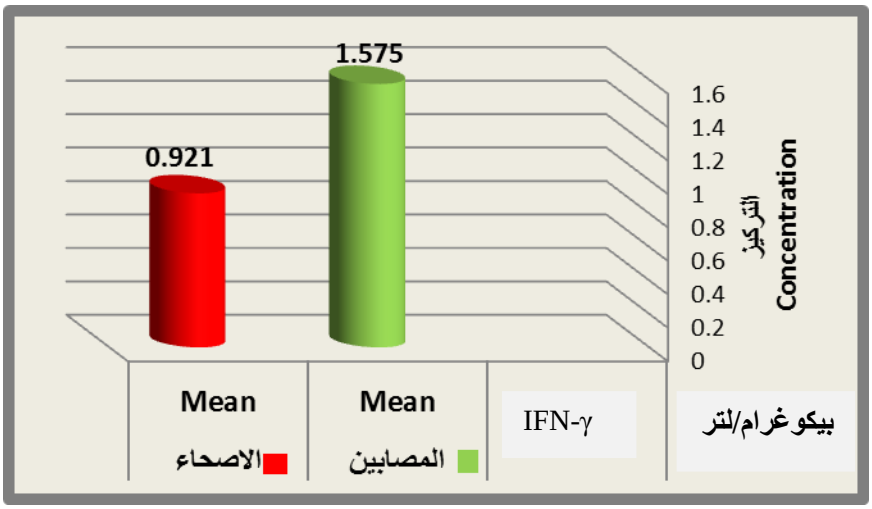
الحركي الخلوي	العينة المرضية (35 عينة) المتوسط±الخطأ القياسي بيكوغرام/مليلتر	حدود الثقة 95%		العينة القياسية (15 عينة) المتوسط±الخطأ القياسي بيكوغرام/مليلتر	حدود الثقة 95%		الاحتمالية P
		اقل قيمة	اعلى قيمة		اقل قيمة	اعلى قيمة	
IFN-γ	0.179±1.575	1.076	1.778	0.178±0.921	0.405	1.102	*0.035

* = اختلاف معنوي عند مستوى احتمالية 0.05 باستعمال اختبار Mann-Whitney U

بينت نتائج هذه الدراسة وجود مستويات عالية في تركيز الانترفيرون-كاما لدى المصابين بداء السكري- النوع الاول والدور المؤثر الذي يمثله في تحطم خلايا بيتا في الاطفال المصابين بداء السكري- النوع الاول, وهذه النتائج تتوافق مع نتائج كل من (Khazai *et al.*, 2007 ;Fidan *et al.*, 2005 ;

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

(Kikodze *et al*., 2014 ;Jasem, 2013) إذ حصلوا على تراكيز عالية من الانترفيرون–كاما لدى عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية (الاصحاء).



شكل (16): متوسط تركيز IFN-γ في مصل العينات المدروسة.

هناك العديد من الدراسات التي تدعم هذه النتائج وتبين مفهوماً واضحاً في ان خلية بيتا المتحطمة مرتبطة مع زيادة تعبير الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب مثل IL-12، IL-2، IL-1، TNF-β، TNF- α، IFN-γ و INF- α (Hussain *et al*.,1996), كما تبين الدراسات ان هناك حركيات خلوية معينة يكون دورها الوظيفي دوراً سمياً لخلايا بيتا في البنكرياس مثل TNF-β، IFN-γ وIL-1، وتسبب هذه الحركيات الخلوية الركود الخلوي Cytostatic لخلايا الجزيرات في البنكرياس مثل تثبيط صناعة الانسولين وافرازه, لكن إذا تم التخلص وازالة هذه الحركيات الخلوية فان الوظائف المؤثرة في خلايا الجزيرات سوف تزال, فضلاً عن ان هذه الحركيات الخلوية ممكن ان تؤدي دوراً خلوياً قاتلاً Cytocidal لخلايا بيتا في جزيرات البنكرياس، مما ينتج عنه تحطماً لخلايا بيتا عند الاطفال المصابين بداء السكري–النوع الاول(Foulis *et al*., 1991).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الحركيات الخلوية ومن ضمنها الانترفيرون–كاما تعمل على حث وتعجيل تحطم خلايا بيتا في داء السكري– النوع الاول, وتكون آلية التحطيم اما بصورة مباشرة او غير مباشرة. تحث آلية التحطم المباشر للحركيات الخلوية المفرزة من قبل Th1 والمتضمنة الانترفيرون– كاما والتي تظهر تأثيراتها اما بصورة اولية عند خلايا البلعمية الكبيرة Macrophage مما يؤدي إلى زيادة ترشيح هذه الخلايا في مواقع خلايا جزيرات البنكرياس مسرعة من تحطم خلايا بيتا من خلال تحرير اوكسيد النتريك Nitric oxide وجذور الاوكسجين Oxygen radicals (Karlson *et al*., 2000), او من خلال زيادة حث ترشيح الخلايا التائية السامة T $CD8^+$ المميزة لجزيئة MHC class I التي يتم التعبير عنها على سطوح خلايا جزيرات البنكرياس، والخطوة اللاحقة هي تحطم حاد لخلايا بيتا في الانسان (Seewaldt *et al*., 2000 ;Kukerja and Maclaren, 1999). يسرع IFN-γ من تحطم خلايا بيتا بآلية مباشرة او غير مباشرة. في الآلية المباشرة تظهر وسائط Th1 من ضمنها IFN-γ تأثيرات في الخلايا البلعمية Macrophage ويحثها على الترشيح في خلايا جزيرات البنكرياس، إذ سوف يسرع من تدمير خلايا بيتا من خلال الوسائط المصنعة في المسلك الجديد مثل جذور الاوكسجين الحرة واوكسيد النتريك، او يستحث الخلايا التائية لتميز الجزيرات الحاملة للـ MHC-I وتميز من قبل خلايا CD8 حصراً، ونظراً لزيادة تعبير الوسائط IFN-γ وTNF مما يؤدي إلى زيادة التدمير في النسيج لخلايا بيتا في كل من الانسان والفئران (Amrani *et al*., 2000). في التحطم غير المباشر هناك عدة آليات تشترك في تثبيط مستوى منتوج وفعالية Th2 وذلك من خلال زيادة أعداد الخلايا التائية المفعلة ضد الذات وتثبط منتوج الوسائط المضادة لفعل IFN-γ مما يزيد التعبير عن هذا الوسيط الخلوي المدمر لخلايا بيتا (Faust *et al*., 1996). هذه النتائج لم تتوافق مع (Kikodze *et al*., 2014) وذلك لعدم حصوله على فروقٍ معنوية في تركيز الانترفيرون–كاما لدى المصابين بداء السكري– النوع

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الاول, وقد اوضح الباحث وجماعته بان الحركي الخلوي الانترفيرون–كاما يكون تركيزه غير متغير في مرضى داء السكري– النوع الاول.

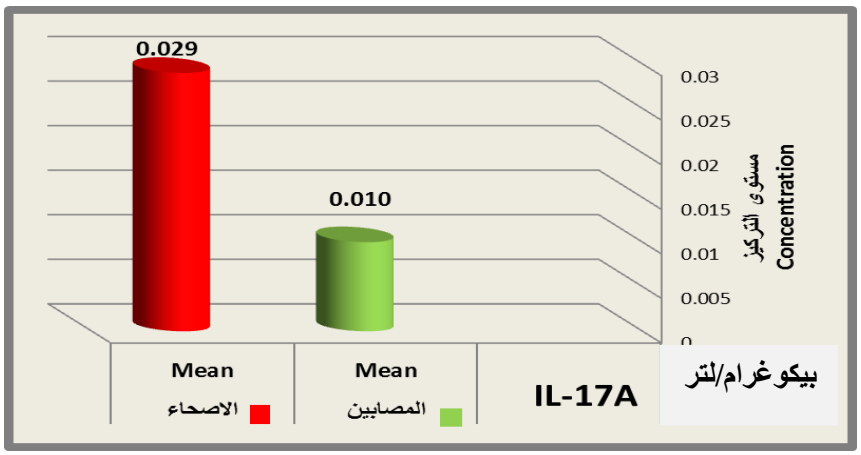
2-1-2-4: مستوى تركيز الحركي الخلوي Interleukin-17A (IL-17A)

يبين الجدول (3) انخفاضاً في تركيز IL-17A في مصل دم المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية (الاصحاء), إذ بلغ التركيز في مصل دم المصابين 0.010±0.004 بيكوغرام/مليلتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.029±0.014 بيكوغرام/مليلتر (الشكل 17). نتائج التحليل الاحصائي باستعمال اختبار Mann-Whitney U لم يظهر أية فروقٍ معنوية في تركيز IL-17A بين الاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية وتحت مستوى احتمالية $P<0.05$.

جدول (3): تركيز IL-17A في مصل العينات المدروسة.

الحركي الخلوي	العينة المرضية (35 عينة) المتوسط±الخطأ القياسي بيكوغرام/مليلتر	حدود الثقة 95%		العينة القياسية (15 عينة) المتوسط±الخطأ القياسي بيكوغرام/مليلتر	حدود الثقة 95%		الاحتمالية P
		اقل قيمة	اعلى قيمة		اقل قيمة	اعلى قيمة	
IL-17A	0.004±0.010	0.000	0.007	0.014±0.029	0.000	0.028	0.103

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (17): متوسط تركيز IL-17A في مصل العينات المدروسة.

هذه النتائج لا تتوافق مع نتائج الدراسة التي قام بها Kikodze *et al*., (2014) لحصولهم على نتائج ذات فروق معنوية في مستوى تركيز IL-17 في المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول, بينما هذه النتائج اتفقت مع نتائج الباحث Roohi *et al*., (2014) لعدم حصولهم على نتائج ذات فروق معنوية في مستوى تركيز IL-17 في المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول, واوضح Li, (2014) بان مستوى تركيز IL-17 لدى الأشخاص المصابين بداء السكري- النوع الاول لا يظهر زيادة لدى المصابين, ولكن أغلب الدراسات تدعم الدور الكبير الذي يؤديه IL-17 في تحطم خلايا بيتا في البنكرياس للأشخاص المصابين بداء السكري- النوع الاول, ففي مرضى السكري- النوع الاول فان خلايا CD4+T cell اللمفاوية تتمايز إلى Th17 في نسيج البنكرياس المتضمن لخلايا الجزيرات β cells التي تعمل على تحطيم خلايا بيتا بوساطة افرازها IL-17, فضلاً عن ان خلايا CD4+T cell يمكن لها التمايز ايضاً إلى Th1 و Th2.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

4-2-2: مستوى تركيز الحركيات الخلوية مضادة للالتهاب في المصل للعينات المدروسة

4-2-2-1: تركيز الحركي الخلوي Interleukin-4 (IL-4)

يبين الجدول (4) انخفاضاً في تركيز IL-4 في مصل المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية (الاصحاء), إذ بلغ التركيز في مصل دم المصابين 0.015±0.006 بيكوغرام/مليلتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.021±0.009 بيكوغرام/مليلتر (الشكل 18). نتائج التحليل الاحصائي باستعمال اختبار Mann-Whitney U لم يظهر أي فروقاً معنوية في تركيز IL-4 بين الاطفال المصابين بداء السكري- النوع الاول والعينة القياسية وتحت مستوى احتمالية $P<0.05$.

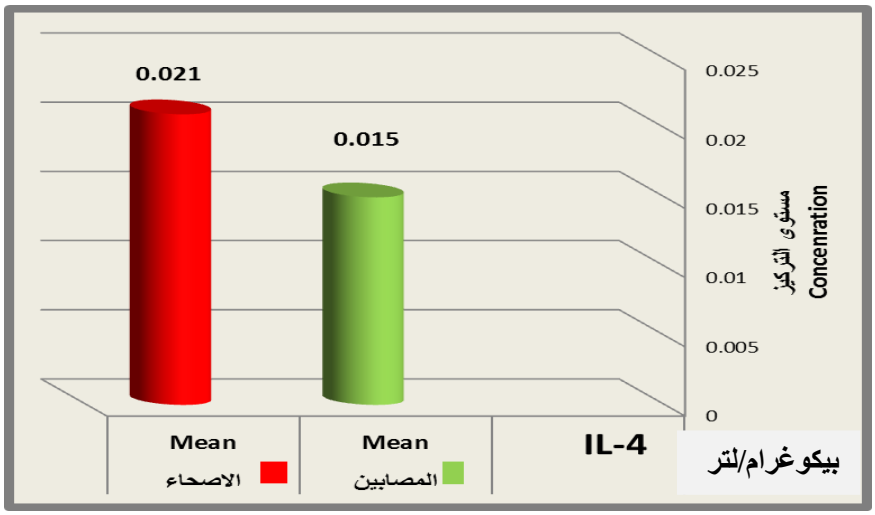
جدول (4): تركيز IL-4 في مصل العينات المدروسة.

الحركي الخلوي	العينة المرضية (35 عينة) المتوسط±الخطأ القياسي بيكوغرام/مليلتر	حدود الثقة 95%		العينة القياسية (15 عينة) المتوسط±الخطأ القياسي بيكوغرام/مليلتر	حدود الثقة 95%		الاحتمالية P
		اقل قيمة	اعلى قيمة		اقل قيمة	اعلى قيمة	
IL-4	0.006±0.015	0.000	0.012	0.009±0.021	0.000	0.018	0.232

في غضون هذه النتائج فان أغلب الدراسات تؤكد ان تركيز IL-4 في مصل المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول ينخفض بالمقارنة مع العينة القياسية (Lindley *et al.*, 2005 ; Aly and Gottlieb, 2009 ; Ferraro *et al.*, 2011). تتفق هذه النتائج مع نتائج كل من (Khazai *et al.*, 2007 ; Jasem, 2013), إذ حصلوا على نتائج ذات فروق غير معنوية في مستوى تركيز IL-4 لدى

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول مقارنة بالعينة القياسية. وتبين العديد من الدراسات الأخرى ان تركيز IL-4 يقل في الأشخاص المصابين بداء السكري– النوع الاول, إذ ان الأشخاص غير المصابين بالسكري قد اظهروا مستويات اعلى في تركيز IL-4 بالمقارنة مع المصابين, وعلى العكس فان وجود IL-4 في مصل المصابين يعمل على حث المستضدات الذاتية لخلايا بيتا (Hedman *et al*., 2006). وفي دراسات أخرى اظهرت ان الزيادة العالية في تركيز IL-4 في الدورة الدموية للأشخاص المصابين بالسكري– النوع الاول يكون مؤذياً ومحطماً لخلايا بيتا (Amirshahrokhi *et al*., 2008).



شكل (18): متوسط تركيز IL-4 في مصل العينات المدروسة.

لا تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليه كل من Berwary *et al*., (2013)، Kikodze *et al*., (2014) إذ حصلوا على نتائج ذات فروقٍ معنوية في تركيز IL-4 لدى المرضى المصابين بداء السكري– النوع الاول بالمقارنة مع الاصحاء، كما ان هنالك دراسات أخرى تبين ان وجود IL-4 في مصل دم المصابين له دور منظم ويمنع من تطور مرض السكري– النوع الاول, وذلك من خلال زيادة فعالية CD1d

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الذي يعمل على تثبيط فعالية خلايا Natural killer والخلايا التائية الفعالة الموجهه ضد خلايا بيتا في جزيرات البنكرياس (Novak *et al.*, 2007)، كما يعمل على غلق العديد من الوظائف المؤثرة للخلايا البلعمية الكبيرة Macrophages (Rai, 2008).

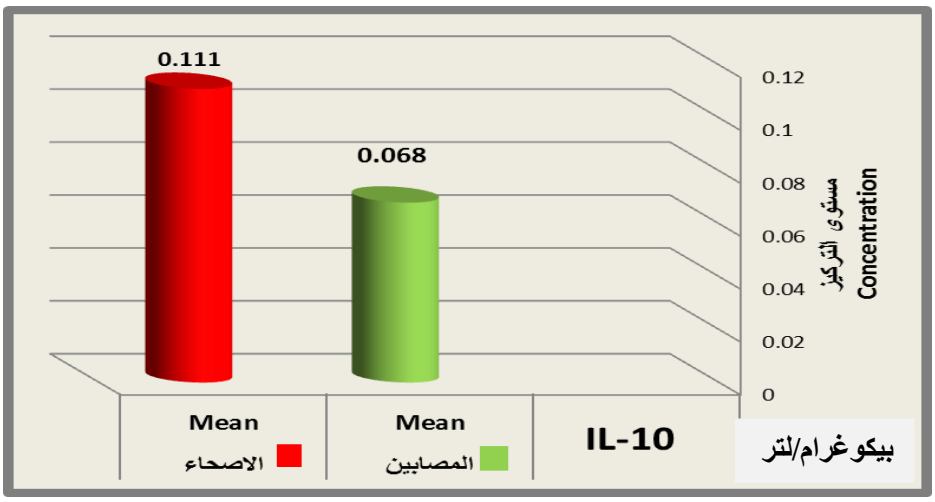
4-2-2-2: تركيز الحركي الخلوي Interleukin-10 (IL-10)

يبين الجدول (5) انخفاضاً في تركيز IL-10 في مصل المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية (الاصحاء), إذ بلغ متوسط التركيز في مصل دم المصابين 0.068±0.011 بيكوغرام/مليلتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.111±0.031 بيكوغرام/مليلتر (الشكل 19). نتائج التحليل الاحصائي باستعمال اختبار Mann-Whitney U لم يظهر أية فروقٍ معنوية في تركيز IL-10 بين الاطفال المصابين بداء السكري- النوع الاول والعينة القياسية وتحت مستوى احتمالية $P<0.05$.

جدول (5): تركيز IL-10 في مصل العينات المدروسة.

الحركي الخلوي	العينة المرضية (35 عينة) المتوسط±الخطأ القياسي بيكوغرام/مليلتر	حدود الثقة 95%		العينة القياسية (15 عينة) المتوسط±الخطأ القياسي بيكوغرام/مليلتر	حدود الثقة 95%		الاحتمالية P
		اقل قيمة	اعلى قيمة		اقل قيمة	اعلى قيمة	
IL-10	0.011±0.068	0.002	0.066	0.031±0.111	0.004	0.126	0.618

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (19): متوسط تركيز IL-10 في مصل العينات المدروسة.

تتفق هذه النتائج مع نتائج ما حصل عليه كل من (Mysliwska *et al*., 2005 ; Alizadeh *et al*., 2006 ; Jasem, 2013 ; Kikodze *et al*., 2014)، إذ حصلوا على نتائج ذات فروقٍ غير معنوية في تركيز IL-10 في عينة المصابين بداء السكري بالمقارنة مع عينة الاصحاء، كما جاءت النتائج متطابقة مع العديد من الدراسات التي تبين ان تركيزي IL-10 وIL-4 في مصل المصابين بداء السكري– النوع الاول يقل وينخفض, بينما مستوى تركيزي IL-17 وIFN-γ يزداد (Lindley et al., 2005 ; Aly and Ferraro et al.,2011 ; Gottlieb, 2009). ان أغلب الدراسات تبين ان دور الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب المنتجة من خلية Th1 مثل IL-1، IFN-γ وTNF-β تلاحظ في مرضى داء السكري– النوع الاول بنسبة اعلى من الحركيات الخلوية المنظمة لخلية Th2 مثل IL-4، IL-5 وIL-10, كما وجد علاقة مابين الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب والاضداد الذاتية لجزيرات البنكرياس, بينما لم توجد أية علاقة بين الاضداد الذاتية لجزيرات البنكرياس والحركيات الخلوية المنظمة, وهذا ما يبين ان داء السكري– النوع الاول في الانسان مرتبط مع عدم التوازن بين Th1 وTh2 في الجهاز المناعي (Marner *et al*., 1985 ;

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

(Borg *et al*., 2001، بينما لاتتفق هذه النتائج مع نتائج كل من Berwary *et al*., ; Saleh, 2009 ; 2013) بسبب حصولهم على نتائج معنوية في مستوى تركيز IL-10 لدى المرضى مقارنة بالاصحاء. ان النتائج التي تظهر مستويات عالية في تركيز IL-10 تكون معاكسة لعدة دراسات أخرى والتي بينت بان الإصابة بداء السكري– النوع الاول ربما لا تتطور بسبب ان حث خلايا Th2 للـ IL-4 وIL-10 التي تعمل على غلق انتاج الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب للـ Th1 مثل IL-2، IFN-γ وTNF-β (Karlson *et al*., 2000), على العكس فان هناك دراسات أخرى قد ركزت على الحركي الخلوي IL-10 المضادة لالتهاب خلايا Th2 في داء السكري– النوع الاول الذي ظهر ليكون حركياً خلوياً فعالاً في داء السكري– النوع الاول من خلال حث ترشيح الخلايا الأحادية النواةMononuclear cells في خلايا البنكرياس مؤدية إلى تحطم خلايا جزيرات البنكرياس (Pakala *et al*., 1997).

4–2–2–3: مستوى تركيز عامل النمو المحول

Transforming Growth factor beta1 (TGF-β1)

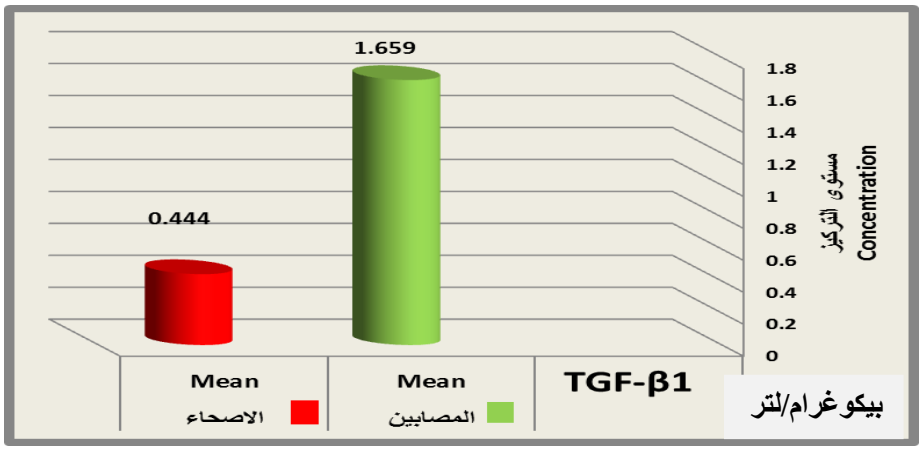
يبين الجدول (6) ارتفاعاً ملحوظاً في تركيز TGF-β1 في مصل المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية (الاصحاء), إذ بلغ التركيز في مصل دم المصابين 1.659±0.141 بيكوغرام/مليلتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.444±0.072 بيكوغرام/مليلتر (الشكل 20). نتائج التحليل الاحصائي باستعمال اختبار Mann-Whitney U قد اظهر وجود فروقاً معنوية في تركيز TGF-β1 بين الاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية وتحت مستوى احتمالية $P<0.05$.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

جدول (6): تركيز TGF-β1 في مصل العينات المدروسة.

الحركي الخلوي	العينة المرضية (35 عينة) المتوسط±الخطأ القياسي بيكوغرام/مليلتر	حدود الثقة 95%		العينة القياسية (15 عينة) المتوسط±الخطأ القياسي بيكوغرام/مليلتر	حدود الثقة 95%		الاحتمالية P
		اقل قيمة	اعلى قيمة		اقل قيمة	اعلى قيمة	
TGF-β1	0.141±1.659	1.362	1.914	0.072±0.444	0.288	0.572	*0.000

* = اختلاف معنوي عند مستوى احتمالية 0.05 باستعمال اختبار Mann-Whitney U



شكل (20): متوسط تركيز TGF-β1 في مصل العينات المدروسة.

هذه النتائج تتفق مع النتائج التي حصل عليها Zorena *et al.*, (2013)، إذ وجدوا فروقاً معنوية في تركيز TGF-β لدى الأشخاص المصابين بداء السكري– النوع الاول بالمقارنة مع الاصحاء. هذه النتائج المرتفعة في تركيز TGF-β جاءت متطابقة مع نتائج الدراسات التي بينت بان تراكيز TGF-β تكون محسوسة في مرضى السكري– النوع الاول, وان مستوى الكلوكوز في الجسم يؤثر في مستويات TGF-β1, وان فرط الكلوكوز لدى الأشخاص المصابين بداء السكري يحفز تعبير TGF-β في انواع مختلفة من خلايا

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الجسم مثل الخلايا البلعمية الكبيرة Macrophages (Tesch, 2007), والخلايا الجذعية للانسان (Jung *et al*., 2010), والمستويات المرتفعة للتعبير الجيني TGF-β التي سجلت لدى مرضى السكري (Abbasi *et al*., 2012). العديد من الدراسات بينت بان الارتفاع الكبير في مستوى الكلوكوز في الجسم, سوف يؤدي إلى تحفيز بروتين الكاينيز Kinase protein في السايتوبلازم بعد ذلك سوف يحث على انتاج TGF-β ليرتبط مع بروتينات Smad ويرتبط مع مستقبلاتها ويدخل النواة ليكون معقداً يعمل على حث او كبت تعبير الجينات المستهدفة كما مبين بالشكل (4) (Lee, 2013 ; Gomes *et al*., 2014)، ويعرف بروتين Smad protein على انه بروتين داخل خلوي يعمل على نقل الايعازات الخارج خلوية للحركي الخلوي TGF-β إلى داخل النواة (Lan, 2012). هناك دراسات أخرى تبين ان دور TGF-β في مرضى داء السكري– النوع الاول يكون تنظيمياً, إذ يعمل على تثبيط تطور الامراضية المناعية للمستضدات الذاتية دون ان يؤثر في الاستجابة المناعية (Li *et al*., 2006)، وينتج TGF-β1 من انواع مختلفة من الخلايا مثل الخلايا المتفرعة Dendritic cells وخلايا T المنظمة الطبيعية nTregs naturally occurring regulatory T cells (Wan and Flavell, 2006).

تؤدي خلايا T المنظمة (Tregs) دوراً مركزياً في داء السكري– النوع الاول من حيث آلية تعمل على منع تطور داء السكري– النوع الاول بوساطة أفرازها TGF-β (You, et al., 2006). لا تتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج كل من (Roohi *et al*., 2014; Azar *et al*., 2000)، إذ حصلوا على نتائج غير معنوية في تركيز TGF-β لدى المصابين بالمقارنة مع الاصحاء. هذه النتائج المنخفضة في مستوى تركيز TGF-β قد سجلت في مدة مبكرة من الإصابة, وفسرت النتائج على أساس ان مستويات TGF-β تكون مختزلة في داء السكري– النوع الاول (Abbasi *et al*., 2012; Olivieri *et al*., 2010).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

4-2-3: معامل الأرتباط بين الحركيات الخلوية المدروسة في جميع العينات

جدول (7) يبين معامل الأرتباط باستعمال تحليل Pearson Correlation بين الحركيات الخلوية المدروسة, وتشير النتائج إلى وجود فروقٍ معنوية موجبة في بعض الحركيات الخلوية, بينما لم تظهر النتائج وجود أية فروقٍ معنوية في الحركيات الخلوية الأخرى. تبين النتائج وجود فروقٍ معنوية موجبة بين IFN-γ وعامل نمو التحولTGF-β, وكانت قيمة الأرتباط بينهما 0.359, كما تبين النتائج ايضاً وجود فروقٍ معنوية موجبة بين IFN-γ وIL-4, إذ كانت قيمة معامل الأرتباط بينهما 0.351, كما يوضح الجدول وجود فروقاً معنوية موجبة بين IL-17A وIL-10, إذ كانت قيمة معامل الأرتباط بينهما 0.640, بينما لم تظهر أية فروقٍ معنوية بين الحركيات الخلوية المدروسة الأخرى.

جدول (7): معامل الأرتباط بين الحركيات الخلوية المدروسة في جميع العينات.

الحركي الخلوي		IFN-γ	TGF-β	IL-17A	IL-10	IL-4
IFN-γ	معامل الأرتباط	1.000	*0.359	0.119	0.197	*0.351
	الاحتمالية P		0.011	0.410	0.170	0.012
TGF-β	معامل الأرتباط		1.000	−0.059	−0.081	0.208
	الاحتمالية P			0.686	0.578	0.208
IL-17A	معامل الأرتباط			1.000	*0.640	0.217
	الاحتمالية P				0.373	0.130
IL-10	معامل الأرتباط				1.000	0.213
	الاحتمالية P					0.137
IL-4	معامل الأرتباط					1.000
	الاحتمالية P					0.000

* = اختلاف معنوي عند مستوى احتمالية 0.05 باستعمال اختبار Person correlation

ان عدم التوازن بين انتاج خلايا Th1 لـ IFN-γ وانتاج خلايا Th2 لـ IL-4 وIL-10 اللذين لهما علاقة في تحطم خلايا بيتا المنتجة لهرمون الانسولين في البنكرياس (Tisch and McDevitt, 1996).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ان خلايا Th1 والفارزة لـ IFN-γ والذي يتترشح في خلايا جزيرات البنكرياس لمرضى داء السكري– النوع الاول في الانسان, كما يمكن ان تنتج في الانواع الأخرى من امراض المناعة الذاتية (Rabinovitch *et al*., 1995; Foulis *et al*., 1991). بين Weiner, (1997) بان الحفاظ على التحمل الذاتي ضد المستضدات الذاتية يتضمن تنشيط الخلايا المناعية المنظمة (خلايا Th3) والمتمثلة بعامل النمو التحول TGF-β1. واوضح لي في دراستين Li and Flavell,(2008b); Li and Flavell, (2008a) بان عامل نمو التحولTGF-β1 له فعالية التهابية ومنظمة في الاستجابة المناعية. ان تمايز خلايا +CD4 في خلايا Th1 تثبط مباشرة بوساطة عامل النمو التحول TGF-β1, مؤدياً إلى كبت المناعة الذاتية التي تتوسطها انواع خلايا Th1 (Schmitt *et al*., 1994). اظهر Haleminen *et al*., (2001) وجود انخفاضاً في مستوى انتاج TGF-β1 وIL-4 في الدم المحيطي خلال الاستجابة المناعة الذاتية في بداية داء السكري– النوع الاول. وبين Zorena *et al*., (2013) حصول زيادة في مستوى انتاج TGF-β1 عندما يتطور داء السكري– النوع الاول وانخفاض تحمل الكلوكوز.

زيادة تعبير خلايا Th17 وTh1 في الاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول تكون مؤشرات متقدمة في استجابة المناعة الذاتية لتحطم خلايا بيتا (Hartwall *et al*., 2015), وان داء السكري – النوع الاول تتوسطه خلايا Th17 المنتجة للحركي الخلوي IL-17A وخلايا Th1 المنتجة للحركي الخلوي IFN-γ (Kallmann *et al*., 1997; Foulis, 1991).

التنظيم المناعي العالي للحركيات الخلوية IL-17A وIFN-γ لهما فعل مؤثر في خلايا جزيرات البنكرياس, كما ان لهما علاقة مع تطور داء السكري– النوع الاول, وربما تعمل كمؤشر حيوي في استجابة

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المناعة الذاتية لتحطم خلايا بيتا (Hartwall *et al*., 2015). وفي دراسة أخرى تبين ان ارتباط الحركي الخلوي IL-17A مع الحركيين الخلويين IL-1B وIFN-γ يتوسط التأثير الضار في خلايا جزيرات البنكرياس في الانسان ويزيد من الموت المنظم لخلايا بيتا (Honkanen *et al*., 2010 ; Arif *et al*., 2011 ; Grieco *et al*., 2014), كما بين Hartwall *et al*., (2015) بان التنظيم العالي للحركيات الخلوية IL-17A، IL-9 وIFN-γ تلاحظ في الاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول عند تقدم الاستجابة المناعية الذاتية ضد خلايا بيتا. الدراسة التي أجراها Alizadeh *et al*., (2006) اظهرت وجود علاقة بين IL-10 وIFN-γ, كما اظهرت تلك الدراسة وجود زيادة في مستويات تراكيز IFN-γ في مصل المصابين, وكذلك فان الانماط الوراثية متعددة الأشكال لهذه الجينات قد اظهرت علاقة مع داء السكري– النوع الاول.

4-2-4: العلاقة بين مدة الإصابة للأطفال المصابين بداء السكري–النوع الاول وتراكيز الحركيات الخلوية المدروسة

درست العلاقة بين مدة أصابة الاطفال بداء السكري– النوع الاول وتراكيز الحركيات الخلوية المدروسة. قسمت مدة الإصابة على مجموعتين, فتضمنت المجموعة الاولى عينة الاطفال المصابين بالمرض لمدة اقل من سنة وكان عددهم 12 طفلاً, اما المجموعة الثانية فقد شملت المصابين بالمرض لمدة سنة فاكثر وكان عددهم 23 طفلاً. حصل على المعلومات لمدة الإصابة بالمرض من خلال عائلة الطفل المصاب ومن الطبيب المختص الذي شخص المرض وأشرف على حالة الطفل المريض وقد سجلت البيانات في استمارة خاصة لكل طفل مريض (ملحق 1). يشير الجدول (8) إلى وجود فروقٍ معنوية في عامل نمو

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

التحول TGF-β لدى الاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول بين مدة الإصابة الاقل من سنة ومدة الإصابة لسنة فاكثر، إذ بلغ متوسط تركيز TGF-β بين مجموعة المصابين بالمرض لمدة اقل من سنة 1.33 بيكوغرام/مليلتر والتركيز لمجموعة مدة الإصابة لسنة فاكثر 2.33 بيكوغرام/مليلتر، بينما لم تظهر النتائج أية فروقٍ معنوية في تراكيز الحركيات الخلوية الأخرى.

جدول (8): العلاقة بين مدة الإصابة للأطفال المصابين وتراكيز الحركيات الخلوية.

الحركي الخلوي العدد الكلي 35 عينة	تركيز الحركي الخلوي لمدة الإصابة اقل من سنة العدد 23 عينة المتوسط±الخطأ القياسي	تركيز الحركي الخلوي لمدة الإصابة لسنة فاكثر العدد 12 عينة المتوسط±الخطأ القياسي	الاحتمالية P
IL-4	0.01±0.01	0.01±0.02	0.75
IL-10	0.01±0.07	0.02±0.06	0.66
IL-17A	0.00±0.01	0.01±0.01	0.55
IFN-γ	1.29±1.48	0.39±1.75	0.56
TGF-β	0.14±1.33	0.70±2.33	*0.001

* = اختلاف معنوي عند مستوى احتمالية 0.05 باستعمال اختبار Mann-Whitney U

تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليه Zorena *et al.*, (2013) من وجود فروقٍ معنوية في تراكيز TGF-β في مرضى السكري– النوع الاول ضمن مدة الإصابة وكانت غير معنوية في تراكيز الحركيات الخلوية الأخرى. هناك العديد من الدراسات التي تبين بان مدة الإصابة مرتبطة مع مستوى تركيز TGF-β لدى المصابين, وان الزيادة في تركيز TGF-β في الاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول ترتبط

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

بمرور الوقت مع خطر الإصابة بالامراض الأخرى, وكلما ازدادت مدة الإصابة يصبح تأثير TGF-β اكثر خطورة في المصابين, ووجد ارتباط قوي مع زيادة TGF-β في مرضى السكري- النوع الاول وأعتلال الاوعية الشبكية الدقيقة, وقد يظهر هذا الاعتلال في مدة ما بعد العشر سنوات من بدء الإصابة بداء السكري- النوع الاول, وفي السنوات التالية يصبح تأثير TGF-β على المصابين أقوى, ومثال على هذا فقد لوحظ ان الانحراف المعياري TGF-β يزداد في مرضى داء السكري- النوع الاول في مدة 15 سنة من بدء الإصابة. ان المستويات العالية من TGF-β يكون مرتبطاً مع تحطم انسجة العين وانسجة الكلى في مرضى داء السكري- النوع الاول والذين لديهم مدة أصابة اكثر من عشرة سنوات (Mauer *et al*., 1984). في دراسات أخرى تضمنت تحليلاً احصائياً بين مدة الإصابة بداء السكري- النوع الاول وخطورة التغيرات الشكلية في عينة نسيج من الكلى, واظهر الباحثون بان التراكيز العالية من TGF-β في مرضى السكري- النوع الاول المتقدم لديهم المرض ربما يكون مرتبطاً مع تليف الانسجة والاوعية الشبكية الدقيقة (Loukovaara *et al*., 2013). دراسة تشير إلى ان مستوى TGF-β يعد من أحد العوامل التي لها تأثير في تعقيدات الاوعية الدقيقة في الاطفال والمراهقين المصابين بداء السكري- النوع الاول (Zorena *et al*., 2013).

4-3: الجانب الوراثي

درس التعدد الشكلي الوراثي Genetic polymorphism في جينات الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب Proinflammatory ومضادة للالتهاب Anti-inflammatory في المرضى المصابين بداء السكري النوع- الاول ومقارنتها بعينة الاصحاء (العينة القياسية) باستعمال تقانتي ARMS-PCR وPCR.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

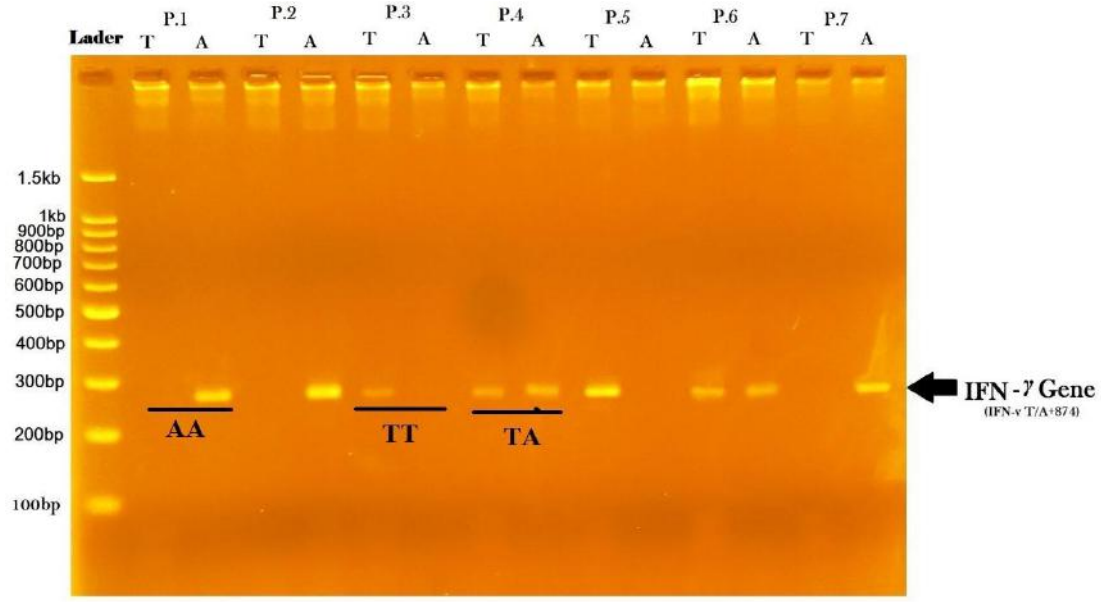
4-3-1: التعدد الشكلي لجينات الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب في مصل دم العينات المدروسة

عين التعدد الشكلي لجينات الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب Proinflammatory للجين *IFN-γ* لموقع الطفرة 874+ T/A والجينين *IL-17A* و*IL-17F* باستعمال تقانتي ARMS-PCR وPCR، كما يأتي:

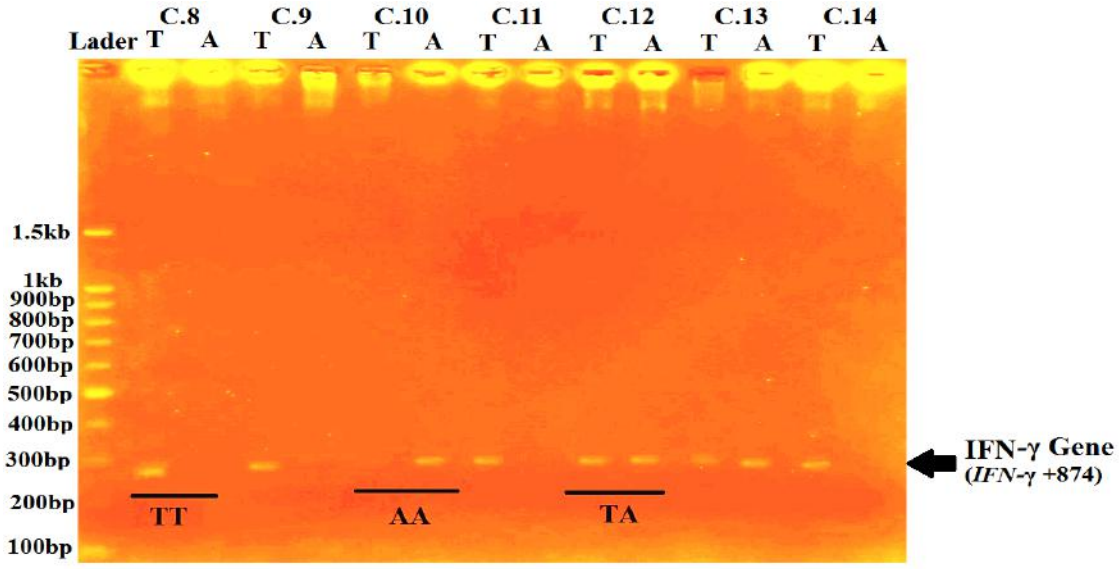
4-3-1-1: التعدد الشكلي لجين الانترفيرون- كاما Interferon-gamma (*IFN-γ*)

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 المتضخم بطريقة ARMS-PCR إلى وجود أليلين هما *t* و*a* وإلى وجود ثلاثة انماط وراثية هي TT، TA وAA في عينة المصابين بداء السكري-النوع الاول والعينة القياسية، وعند ظهور حزمة واحدة في المجال *t* وعدم وجودها في المجال *a* فيكون النمط الوراثي هو TT وفي حالة ظهور حزمة في المجال *a* وعدم ظهورها في المجال *t* فيكون النمط الوراثي AA وعند ظهور حزمتين في كلا المجالين *t* و*a* فيكون النمط الوراثي TA، وكما في الشكلين 21 و22 على التوالي، ولم نضع جميع الأشكال لعينة المصابين والعينة القياسية لكثرتها وتشابهها ونكتفي بوضع شكل واحد لكل من عينة المصابين والعينة القياسية لغرض توضيح كيفية تعيين اللأليلات والانماط الوراثية في العينات المدروسة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (21): الترحيل الكهربائي للجين *IFN-γ* لموقع الطفرة T/A +874 مبيناً فيه الأليلين *t* و *a* في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.

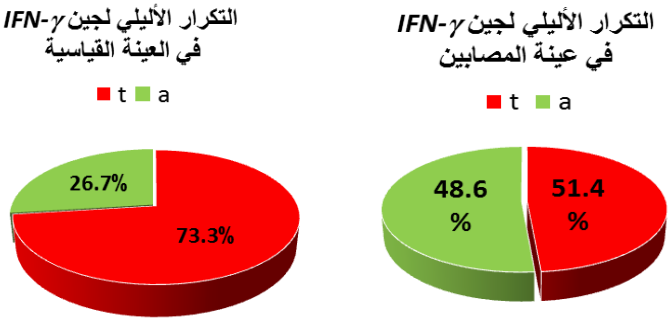


شكل (22): الترحيل الكهربائي للجين الكهربائي للجين *IFN-γ* لموقع الطفرة T/A +874 مبيناً فيه الأليلين *t* و *a* في العينة القياسية وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اظهرت نتائج التوزيع التكراري للأليلين *t* و *a* للجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 وباستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium نتائج متغايرة مابين عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية, إذ سجل الأليل *t* في عينة المصابين نسبة 51.4% بالمقارنة مع الأليل *a* الذي سجل نسبة 48.6%، بينما سجل الأليل *t* في العينة القياسية نسبة 73.3% بالمقارنة مع الأليل *a* الذي سجل نسبة 26.7% (الشكل 23). كذلك يبين الجدول (9) ان التوزيع التكراري قد أختلف معنوياً بين عينة المصابين والعينة القياسية, وتبين النتائج بان الأليل *a* اظهر تكراراً معنوياً لدى المصابين بنسبة اعلى من العينة القياسية باستعمال اختبار فشر Fisher's test وكانت النسبة الحرجة Odds ratio (OR) هي 2.60 مع مدة ثقة Confidence Intervals (CI) تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين 1.03–6.53, وكانت نسبته كأليل مسبب Etiological fraction (EF) (عندما تكون النسبة الحرجة اكثر من واحد) ومرتبط مع المرض بلغت 0.299, بينما اظهر الأليل T تكراراً معنوياً لدى العينة القياسية بنسب اعلى من عينة المصابين باستعمال اختبار فشر Fisher's test, وكانت النسبة الحرجة Odds ratio هي 0.39 مع مدة ثقة Confidence Intervals تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين 0.15–0.97، وكانت نسبته كأليل وقائي من المرض Preventive fraction (PF) (عندما تكون النسبة الحرجة اقل من واحد) بلغت0.451.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (23): تكرارات الأليلين *t* و *a* في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية.

جدول (9): تكرارات الأليلين *t* و *a* للجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية.

الجين	الأليل	عينة المصابين العدد (%)	العينة القياسية العدد (%)	(95%CI) OR	P value
IFN-γ T/A +874	*t*	(%51.4)36	(%73.3)22	(0.97-0.15=CI) 0.39	*0.034
	P.F	0.451			
	a	(%48.6)34	(%26.7)8	(6.53-1.03=CI) 2.60	
	E.F	0.299			

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

تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليها كل من (Bazzaz *et al*., 2014; Elsaid *et al*., 2012; Javor *et al*., 2010; Rafinejad *et al*., 2004) من حيث حصولنا على نتائج متوافقة مع نتائجهم في

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

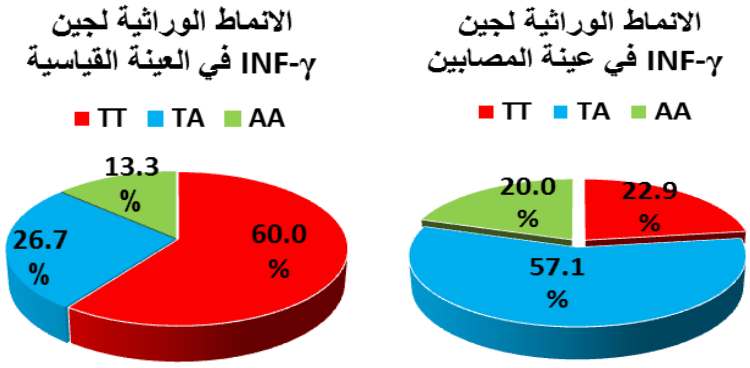
هذه الدراسة الحالية والتي تظهر ان نسبة الأليل *a* كان اعلى لدى المرضى بالمقارنة مع العينة القياسية, بينما اظهر الأليل *t* نسبة اعلى لدى العينة القياسية. ان التكرار العالي للأليل *a* وبصورة معنوية لدى المصابين يبين مدى الدور الكبير الذي يلعبه هذا الأليل مع خطر الإصابة بداء السكري– النوع الاول, بينما انخفاض تكرار الأليل *t* لدى المصابين وأرتفاعه لدى العينة القياسية يبين مدى أهمية هذا الأليل كعامل وقائي من خطر الإصابة بهذا الداء. ان هذه النتائج قد اكدتها الدراسة والتي تبين بان الأليل *a* ربما يكون مؤشراً مهماً في خطر تطور المرض وتحطم خلايا بيتا, وأقترح ان التعدد الشكلي للأليل *t* ربما ليس مهماً مع تطور داء السكري– النوع الاول وانما يمكن ان يكون كمؤشر وقائي من خطر الإصابة بالمرض (Bazzaz *et al*., 2014). دراسة أخرى أهتمت بمدى ارتباط التعدد الشكلي للجين *IFN-γ* T/A +874 مع داء السكري– النوع الاول إلى وجود تكراراً معنوياً للأليل *a* وارتباطه مع خطر الإصابة بداء السكري, بينما اظهرت تلك الدراسة تكراراً عالياً للأليل *t* في العينة القياسية، وأقترح ان يكون هذا الأليل كأليل وقائي من خطر الإصابة بهذا الداء (Jahromi *et al*., 2000). لا تتفق هذه النتائج مع نتائج الدراسة التي قام بها Arababadi *et al*., (2009) الذين بينوا ان تكرار الأليل *t* ربما يرتبط مع خطر الإصابة بداء السكري– النوع الاول, والأليل *a* يكون مرتبطاً مع الجانب الوقائي من داء السكري، لكن هذه النتائج لا تتفق مع أغلب الدراسات التي أجريت على جين *IFN-γ* T/A +874 في داء السكري– النوع الاول.

اظهرت نتائج التحليل الوراثي لتقانة ARMS-PCR للجين الطافر *IFN-γ* T/A +874, وباستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium ثلاث انماط وراثية لدى عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية وهي TT، TA وAA. بينت النتائج وجود تباين في تكرار الانماط الوراثية ما بين عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية, إذ اظهر النمط

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الوراثي TT نسبة اعلى لدى العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين بداء السكري- النوع الاول وكانت النسب 60% و22.9% وعلى التوالي، وكان هناك اختلافاً معنوياً بلغت قيمته 0.014 عند مستوى احتمالية P<0.05 باستعمال اختبار فشر Fisher's test. كانت قيمة النسبة الحرجة 0.20 ومدة الثقة كانت قيمتها بين 0.06-0.70، كما ظهر النمط الوراثي TT كنمط وراثي وقائي من خطر الإصابة بداء السكري، إذ بلغت قيمته 0.481. اظهر النمط الوراثي TA نسبة اعلى لدى عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية وكانت النسب 57.1% و26.7% وعلى التوالي، وبين التحليل الاحصائي عند استعمال اختبار فشر Fisher's test بان النمط الوراثي TA قد اختلف معنوياً لدى عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية وعند مستوى احتمالية P<0.05 وكانت قيمته 0.047. كانت قيمة النسبة الحرجة 3.67 ومدة الثقة كانت قيمتها بين 1.01-13.29، كما ظهر النمط الوراثي TA كنمط وراثي مرتبطاً مع خطر الإصابة بداء السكري، إذ بلغت قيمته 0.416. اظهر النمط الوراثي AA نسبة اعلى لدى عينة المصابين بداء السكري- النوع الاول بالمقارنة مع العينة القياسية وكانت النسب 20% و13.3% وعلى التوالي، ولم يكن هناك أي اختلاف معنوي. كانت قيمة النسبة الحرجة 1.63 ومدة الثقة كانت قيمتها بين 0.31-8.49، كما ظهر النمط الوراثي AA كنمط وراثي مرتبطاً مع خطر الإصابة بداء السكري، إذ بلغت قيمته 0.770، كما في الشكل (24) والجدول (10).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (24): الانماط الوراثية المشاهدة للجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية

جدول (10): تكرارات الانماط الوراثية المشاهدة للجين الطافر *IFN-γ* T/A +874 في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية

الجين	النمط الوراثي	عينة المصابين العدد 35 (%)	العينة القياسية العدد 15 (%)	(95%CI) OR	P value
IFN-γ T/A +874	TT	(%22.9)8	(%60)9	(0.70-0.06=CI) 0.20	*0.014
	P.F	0.481			
	TA	(%57.1)20	(%26.7)4	(13.29-1.01=CI) 3.67	*0.047
	E.F	0.416			
	AA	(%20)7	(%13.3)2	(8.49-0.31=CI) 1.63	0.45
	E.F	0.770			

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

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

من خلال النتائج أعلاه يتبين ان النمط الوراثي متباين الزيجة TA والنمط الوراثي متماثل الزيجة AA مرتبطان مع خطر وتطور الإصابة بداء السكري- النوع الاول لدى عينة المصابين, ولكن نسبة ارتباط النمط الوراثي TA مع خطر الإصابة بداء السكري كانت اعلى من نسبة ارتباط النمط الوراثي AA مع هذا الداء, لذا يتبين ان النمط الوراثي TA يمكن ان يعتمد عليه كمؤشر مع خطر الإصابة بالداء, وهذه النتائج ربما تكون مرتبطة مع النتائج المناعية للمستويات العالية والمعنوية لمستوى تركيز IFN-γ في مصل دم عينة المصابين بداء السكري- النوع الاول المدروسة مقارنة بالعينة القياسية, وبصورة عامة تبين النتائج الوراثية والمناعية مدى أهمية جين *IFN-γ* مع خطر تطور الإصابة بداء السكري- النوع الاول, ويتبين من النتائج ايضاً، ان النمط الوراثي TT المتماثل الزيجة Homozygote يكون اقل خطورة في مرضى السكري- النوع الاول, وهذه النتائج تدل على أهمية دور النمط الوراثي TT كنمط وراثي وقائي من الإصابة بداء السكري, بالمقارنة مع النمط الوراثي TA الذي ظهر كنمط وراثي مرتبط مع خطورة الإصابة بالداء. هذه النتائج جاءت لتؤكد العديد من الدراسات وتتفق معها، إذ اتفقت مع نتائج كل من (Javor *et al*., 2010 ; Bazzaz *et al*., 2014) من حيث حصولهم على نسب عالية من الانماط الوراثية AA و TA لدى عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية, وان تكرار النمط الوراثي TT لدى العينة القياسية اعلى من عينة المصابين, وان العديد من الدراسات تبين ان زيادة تعبير جين *IFN-γ* في المصابين بداء السكري- النوع الاول يعمل على زيادة تقدم وظهور المستضدات الذاتية في خلايا بيتا المستهدفة بوساطة الخلايا البلعمية الكبيرة Macrophages والخلايا المتفرعة DCs (Campbell *et al*., 1985). كذلك هناك دراسات أخرى اظهرت ان الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب مثل IFN-γ، IL-1β و TNF-α تمتلك استجابة مناعية موجهة ضد خلايا بيتا وزيادة تعبيرها يعمل على تفاقم موت خلايا بيتا (Eizirik and Darville, 2001 ;

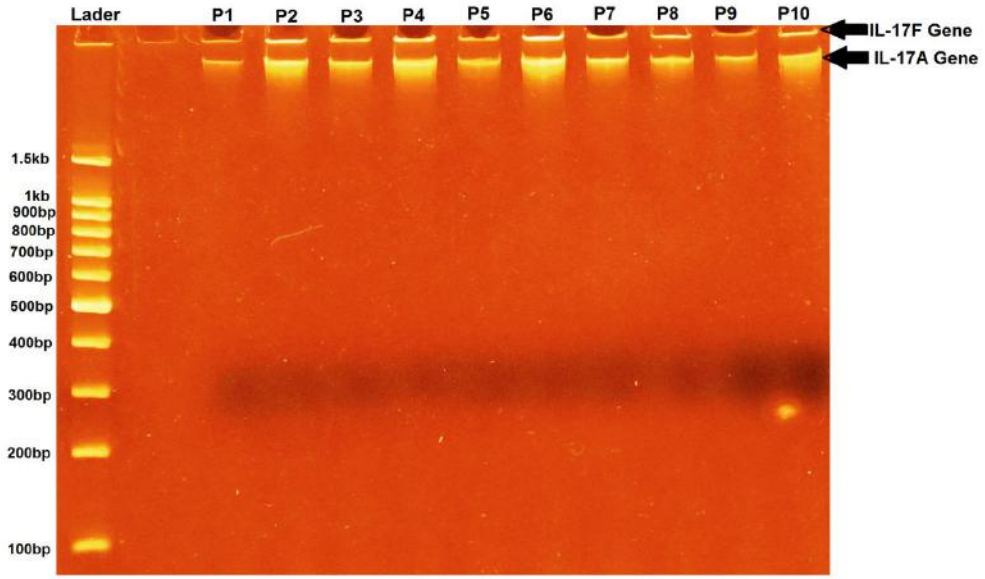
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

(Eizirik *et al*., 2009). وكذلك تظهر البيانات في دراسات أخرى ان زيادة التعبير لجين *IFN-γ* يكون له دور كبير في أحداث وتطور داء السكري– النوع الاول (Emamaullee *et al*., 2009). هناك أدلة كثيرة تدعم هذه الدراسات, فأذا تم غلق تعبير جين *IFN-γ* من خلال غلق مستقبلات IFN-γ فان خطر تطور الداء سوف يقل (Cope *et al*., 1997). وفي دراسة أخرى لجين *IFN-γ* عند الموقع UTR +5644 في المرضى الإيرانيين المصابين بداء السكري– النوع الاول, وجد ان التعدد الشكلي لهذا الموقع الجيني يمتلك ارتباطاً سالباً مع الداء, ويعتبر هذا الموقع كمؤشر وقائي في المقاومة من داء السكري– النوع الاول (Akalin and Marphy, 2001). لكن تبين دراسة أخرى ان زيادة تعبير انتاج IFN-γ في المصابين بداء السكري– النوع الاول يكون له فعالية سمية لخلايا بيتا, كذلك حث انتاج IL-2 ويعمل IFN-γ على حث استجابة الخلايا البلعمية Macrophage لغرض تحطيم خلايا بيتا (Siekiera *et al*., 2002).

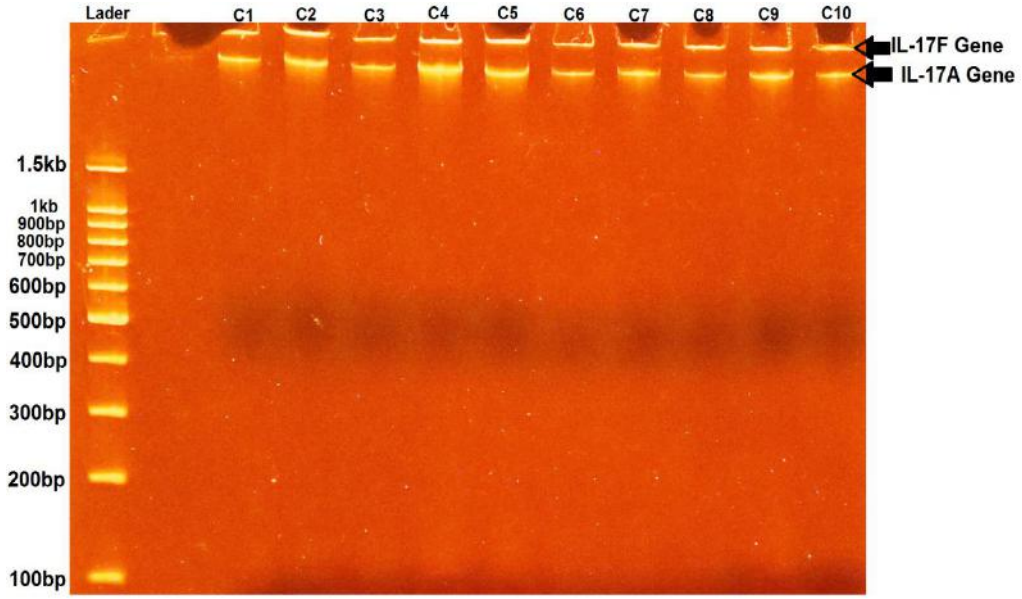
4-3-1-2: الكشف عن الجينين *IL-17A* و *IL-17F*

كشف عن الجينين *IL-17A* و*IL-17-F* في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية. ويظهر الشكلان (25) و(26) بان الجينين *IL-17A* و*IL-17F* موجودان في جميع العينات المدروسة للمصابين والقياسية, ويوضح الشكل بان هناك اختلاف في الحجم الجزيئي لهما, وبحسب موقع اطلس للدراسات الورلثية (www.atlasgeneticsnology.org) إذ يبلغ الحجم الجزيئي للجين *IL-17A* 4.25 كيلوقاعدة, بينما يبلغ الحجم الجزيئي للجين *IL-17F* 7.86 كيلوقاعدة, ولعدم توفر الانزيمات القاطعة والوقت الكافي لم يتم دراسة التعدد الشكلي لهذه الجينات.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (25):الترحيل الكهربائي للجينين *IL-17A* و*IL-17-F* في بعض المصابين بداء السكري–النوع الاول, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكريلمايد بتركيز 6% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين



شكل (26): الترحيل الكهربائي للجينين *IL-17A* و*IL-17-F* في بعض العينات القياسية, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكريلمايد بتركيز 6% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

هذه الدراسة لم تتطرق إلى تحديد كمية التعبير الجيني للجينين *IL-17A* و*IL-17-F* لمعرفة مدى توافقها مع نتائج دراسات الجانب المناعي التي لم تظهر مستويات عالية في مستوى تركيز IL-17A في مصل عينة دم المصابين بداء السكري– النوع الاول. هناك دراسة بينت ان دور الجينين *IL-17A* و-*IL-17 F* في داء السكري– النوع الاول غير واضح بشكل كامل, واظهرت الدراسة زيادة في خلايا Th17 المناعية في الدم المحيطي للمصابين بداء السكري– النوع الاول, كما اظهرت هذه الدراسة وجود علاقة بين IL-17A وتحطم خلايا الجزيرات داخل المختبر (Honkanen *et al*., 2010).

لكن هناك دراسات تبين ان دور جين *IL-17A* يكون محطماً لخلايا بيتا في البنكرياس (Jain *et al*., 2008 ; Emamaullee *et al*., 2009)، بينما هناك دراسات أخرى تبين ان دور الجين *IL-17A* في المصابين بداء السكري– النوع الاول يكون وقائياً مع وجود أدلة بينت ان خلايا Th17 تزداد في الدم المحيطي للاطفال المصابين بداء السكري– النوع الاول (Honkanen *et al*., 2010 ; Marwaha *et al*., 2010), كما تبين الدراسة التي أجراها Joseph *et al*., (2011) بان جين *IL-17A* لا يظهر أي تأثير معنوي في القوارض المصابة بداء السكري– النوع الاول, وانه يثبط حث التهاب الدماغ فيها. هنالك دراسات أخرى تبين ان جين *IL-17A* في المصابين بداء السكري– النوع الاول يظهر دوراً سمياً لخلايا بيتا في البنكرياس في المختبر (Honkanen *et al*., 2010). وتظهر الدراسة ان الحركي الخلوي IL-17A يكون مرتفعاً في خلايا الجزيرات في المصابين بداء السكري– النوع الاول, وان تأثير *IL-17* ضد هذه الخلايا يزداد عندما يتداخل وظيفياً مع الحركيات الخلوية IL-1β و IFN-γ، او مع الحركيات الخلوية TNF-α و IFN-γ الذي يزيد من تفاقم الموت المبرمج لخلايا بيتا (Arif *et al*., 2011).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

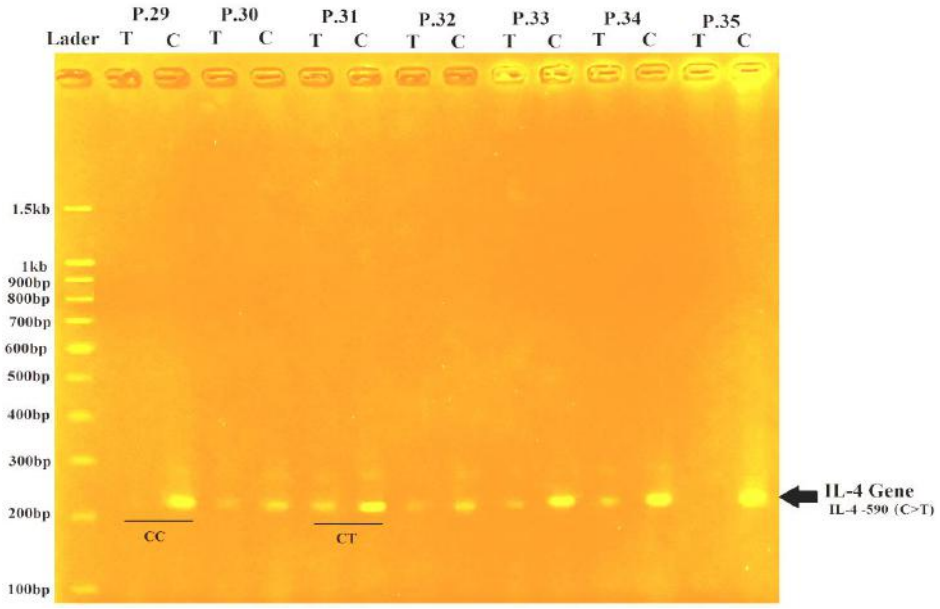
4-3-2: التعدد الشكلي لجينات الحركيات الخلوية مضادة الالتهاب في مصل دم العينات المدروسة

عين التعدد الشكلي لجينات الحركيات الخلوية مضادة للالتهاب Anti-inflammatory للجين الطافر (C>T) 590- *IL-4*، ومحث الجين *IL-10* في الموقعين الطافرين 592- و1082-، والجين *TGF-β1* في الموقعين الطافرين (Codon 10: +869*C/T) و(Codon 25: +915*G/C) باستعمال تقانتي ARMS-PCR وPCR، وكما يأتي:

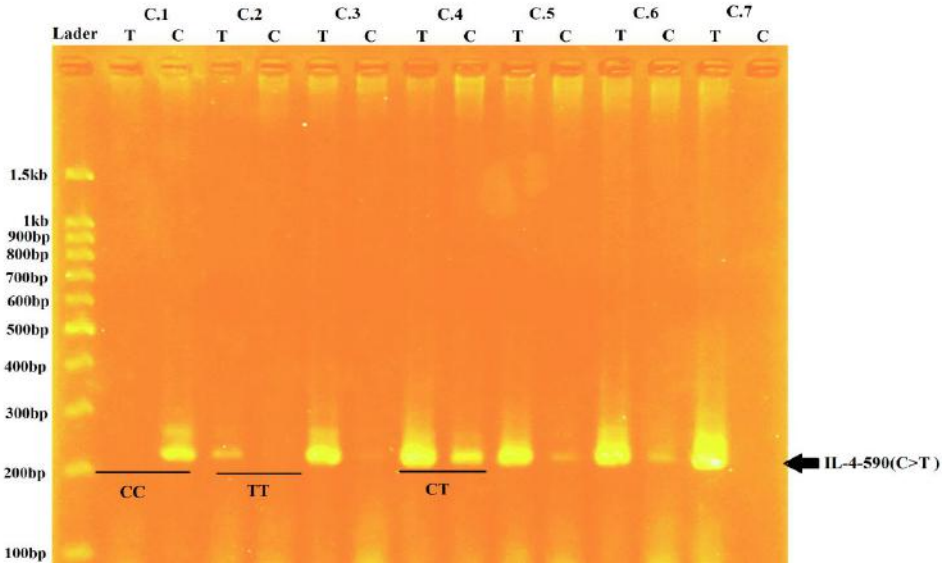
4-3-2-1: التعدد الشكلي للجين *IL-4* لموقع الطفرة (C>T) 590-

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للجين الطافر (C>T) 590- *IL-4* المتضخم بتقانة ARMS-PCR إلى وجود أليلين هما اللأليل *t* والأليل *c* وإلى وجود نمطين وراثيين هما CT وCC في جميع العينات المدروسة للأطفال المصابين بداء السكري- النوع الاول, بينما ظهر في العينة القياسية ثلاثة انماط وراثية هي TT، CT وCC, كما هو مبين في الشكلين (27 و 28)، وعلى التوالي.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (27): الترحيل الكهربائي للجين الطافر *IL-4*- 590 (C>T) مبيناً فيه الأليلين T و C في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 2.5% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.

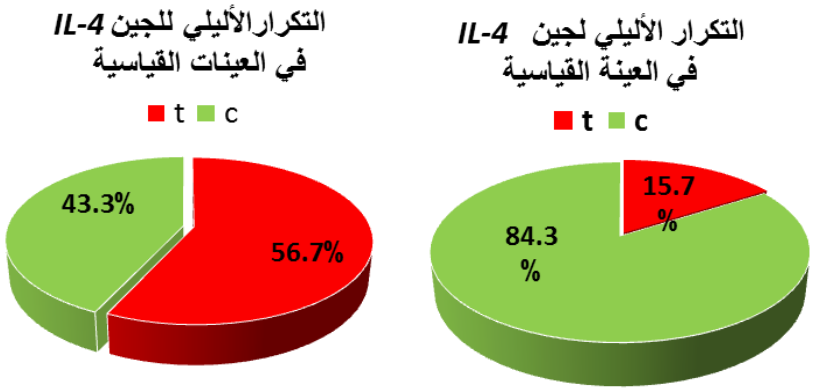


شكل (28): الترحيل الكهربائي للجين الطافر *IL-4* -590 (C>T) مبيناً فيه الأليلين T و C في العينة القياسية, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 2.5% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اظهرت نتائج التوزيع التكراري للأليلين *t* و*c* للجين الطافر 590- *IL-4* وباستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium نتائج متغايرة مابين عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول 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 *c* الذي سجل نسبة 43.3% كما في الشكل (29). كما يظهر الجدول (11) ان التوزيع التكراري قد اختلف معنوياً بين عينة المصابين والعينة القياسية, وتبين النتائج بان 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 مدة ثقة Confidence Intervals (CI) تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين 2.70–18.23, وكانت نسبته كأليل مسبب Etiological faction (EF) ومرتبط مع خطر الإصابة 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 مدة ثقة Confidence Intervals تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين 0.05–0.37، وكانت نسبته كأليل وقائي من المرض Preventive faction (PF) بلغت 0.486.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (29): تكرارات الأليلين *t* و *c* في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية.

جدول (11): تكرارات الأليلين *t* و *c* للجين الطافر (C>T) *IL-4* -590 في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول 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			

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

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

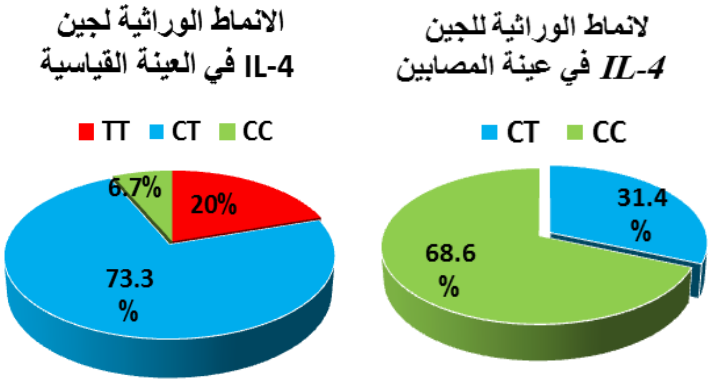
تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليها كل من (Javor *et al*., 2010; Eerligh *et al*., 2004) من حيث حصولهم على نتائج متوافقة مع نتائج الدراسة الحالية التي تظهر ان نسبة الأليل *c* كانت اعلى لدى المصابين بداء السكري بالمقارنة مع العينة القياسية, بينما اظهر الأليل *t* نسبة اعلى لدى العينة القياسية. ان التكرار العالي للأليل *c* وبشكل معنوي لدى المصابين يبين مدى الدور الكبير الذي يمثله هذا الأليل في تطور داء السكري– النوع الاول, ويبين (Eerligh *et al*., (2004, ان الأليل *c* لجين *IL-4* يظهر ارتباط مع التعدد الشكلي المظهري في جينات الحركيات الخلوية لخلايا Th2 ويرتبط مع داء السكري– النوع الاول بوساطة أليلاتها المتعددة, بينما انخفض التكرار في نسبة الأليل *t* لدى المصابين وأرتفاعه لدى العينة القياسية يبين مدى أهمية هذا الأليل كعامل وقائي من خطر الإصابة بهذا المرض. ولا تتفق هذه النتائج مع نتائج (Jahromi, 2000) وذلك لعدم حصوله على أية نتائج معنوية في تكرار الأليل *c* والأليل *t* في عينة المصابين والعينة القياسية.

اظهرت نتائج التحليل الوراثي لنتائج تقانة ARMS-PCR للجين الطافر (C>T) 590- *IL-4*, وباستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium ثلاثة انماط وراثية لدى عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية وهي TT، CT وCC. بينت النتائج وجود تباين في تكرار الانماط الوراثية ما بين عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية, إذ اظهر النمط الوراثي TT نسبة بلغت 20.0% لدى العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول التي كانت نسبتها 0.0%, وكان هناك اختلاف معنوي إذ بلغت قيمته 0.023 عند 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

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

من خطر الإصابة بداء السكري- النوع الاول إذ بلغت قيمته 0.20. اظهرت النتائج ايضاً نسبة اعلى للنمط الوراثي CT عند العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين وكانت النسب 73.3% و 31.4%، وعلى التوالي. بين التحليل الاحصائي عند استعمال اختبار فشرFisher's test بان 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 ومدة الثقة اظهرت قيمة بين 0.04-0.62، وهذه النتائج تبين الدور الكبير الذي يمثله النمط الوراثي CT كجانب وقائي من الإصابة بالمرض, وكانت نسبته كعامل وقائي 0.611, بينما ظهر النمط الوراثي CC كنمط وراثي مرتبطاً مع خطر الإصابة بداء السكري- النوع الاول 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% و 6.7%، وعلى التوالي. كانت قيمة النسبة الحرجة عالية إذ بلغت 30.55 مع مدة ثقة كانت قيمتها بين 3.81-245.08. التحليل الاحصائي عند استعمال اختبار فشرFisher's test قد بين بان 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 (30) والجدول (12).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (30): الانماط الوراثية المشاهدة للجين الطافر *IL-4* -590 (C>T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية

جدول (12): الانماط الوراثة المشاهدة للجين الطافر *IL-4*-590 (C>T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية

الجين	النمط الوراثي	عينة المصابين العدد 35 (%)	العينة القياسية العدد 15 (%)	(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			

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

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

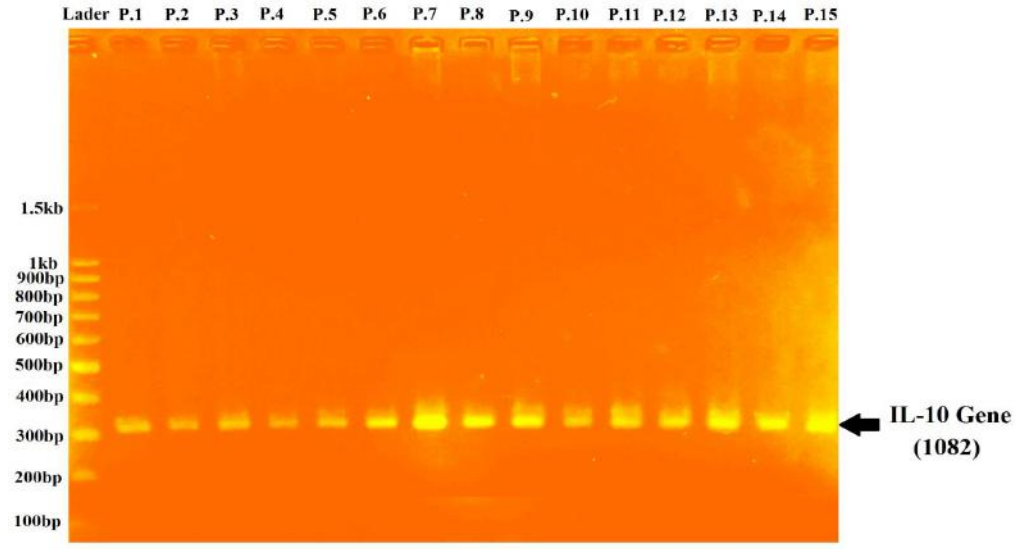
من النتائج أعلاه يتبين ان النمط الوراثي متماثل الزيجة CC يرتبط مع خطر وتطور داء السكري- النوع الاول لدى عينة المصابين, وان هناك نمطان وراثيان هما TT وCT يكونان مرتبطين مع الجزء الوقائي من خطر وتطور داء السكري- النوع الاول. تتفق هذه النتائج مع نتائج الباحثين (Javor *et al*., 2010 ; Teodorica *et al*., 2003) إذ حصلوا على نسب عالية من الطرازين الوراثيين TT وCT في العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين, كما كان للنمط الوراثي TT نسبة اعلى لدى عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية، بينما لم تتفق النتائج مع ما حصل عليه كل من (Alsaid *et al*.,2013; Arababadi *et al*., 2009) لحصولهم على نتائج للطرز الوراثية TT وCT في عينات المرضى بنسبة اعلى من العينات القياسية، كما اظهر الطراز الوراثي CC في العينات القياسية نسباً اعلى من عينات المرضى. الدراسات الوراثية اظهرت تبايناً للجين *IL-4* من ناحية ارتباطه مع داء السكري- النوع الاول من عدمه. ان مدى خطر الإصابة بداء السكري – النوع الاول ربما يحدد بوجود جين *IL-4*, فالطرز الوراثية له والتي هي CC وCT لها علاقة بداء السكري- النوع الاول, وان هذه العلاقة بين جين *IL-4* والمرض يعكس تأثيرات الحركي الخلوي IL-4 في التوازن ما بين فعالية خلايا Th1 وخلايا Th2 والخلايا التائية المنظمة, وأخيراً فان خطر الإصابة بداء السكري- النوع الاول ربما يحدد بمدى تعبير الجين للحركي الخلوي *IL-4* (Teodorica *et al*., 2003), وبين Amirshahroki *et al*.,(2008) بان جين *IL-4* يعبر عن نفسه في المصابين بداء السكري- النوع الاول, وان تعبير هذا الجين كان واضحاً من خلال وجود الحركي الخلوي IL-4 في الدورة الدموية للمرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول, ووجد ان هناك زيادة في فعالية المناعة الخلوية لاسيما خلايا CD4 و CD8 في الأشخاص المصابين. وبين Steck *et al*.,

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

(2005) من خلال دراستهم بان دور جين *IL-4* في المصابين بداء السكري– النوع الاول يكون دوراً منظماً وحامياً من تطور المرض, وأعتماداً على التعدد الشكلي المظهري للنيوكلوتيدة المفردة في الشخص المصاب.

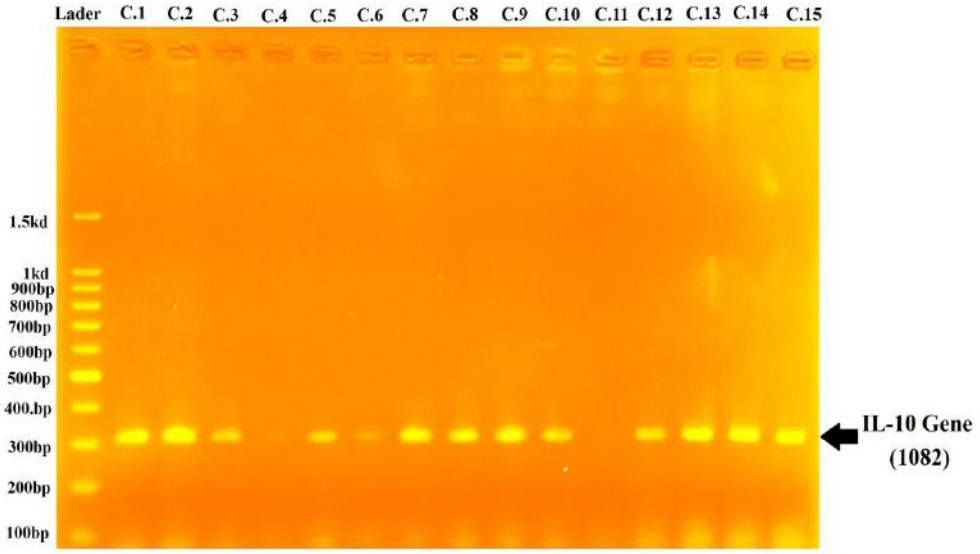
4-3-2-2: الكشف عن محث الجين *IL-10* في الموقعين الطافرين 592- و1082-

كشف عن محث Promoter الجينين الطافرين 592- *IL-10* و1082- *IL-10* في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية باستعمال تقانة PCR لغرض اجراء دراسة للتسلسل التتابعي لمحث الجين في الموقعين الطافرين. ويظهر الشكلين (31) و(32) بان محث الجين الطافر 1082- *IL-10* موجود في جميع عينات المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية, ويوضح الشكل بان القطعة المضخمة التي تمتلك الطفرة 1082– ذات حجم جزيئي يقع بين 300 و400 زوج قاعدي.



شكل (31): الترحيل الكهربائي لمحث الجين الطافر 1082- *IL-10* في المصابين بداء السكري–النوع الاول, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.

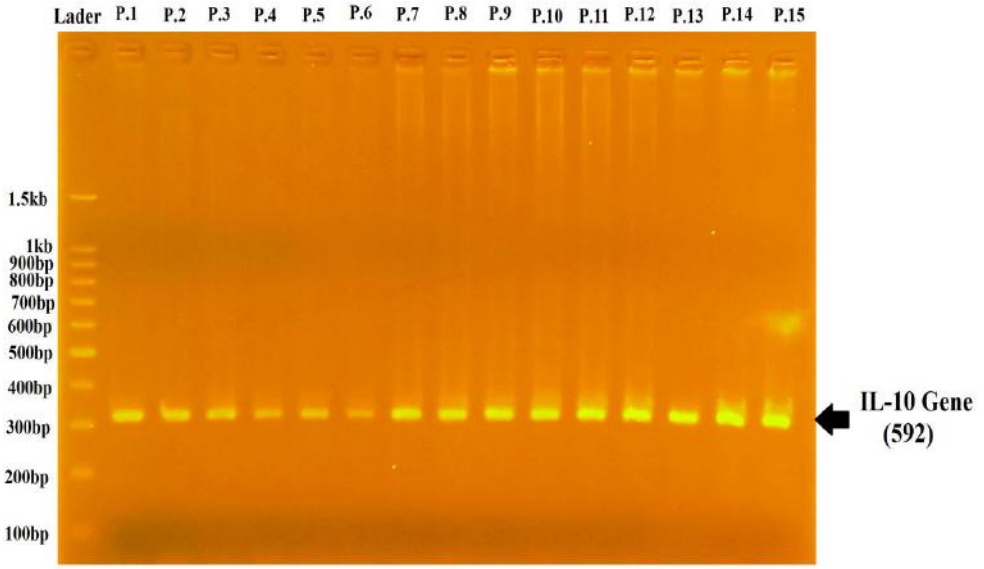
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



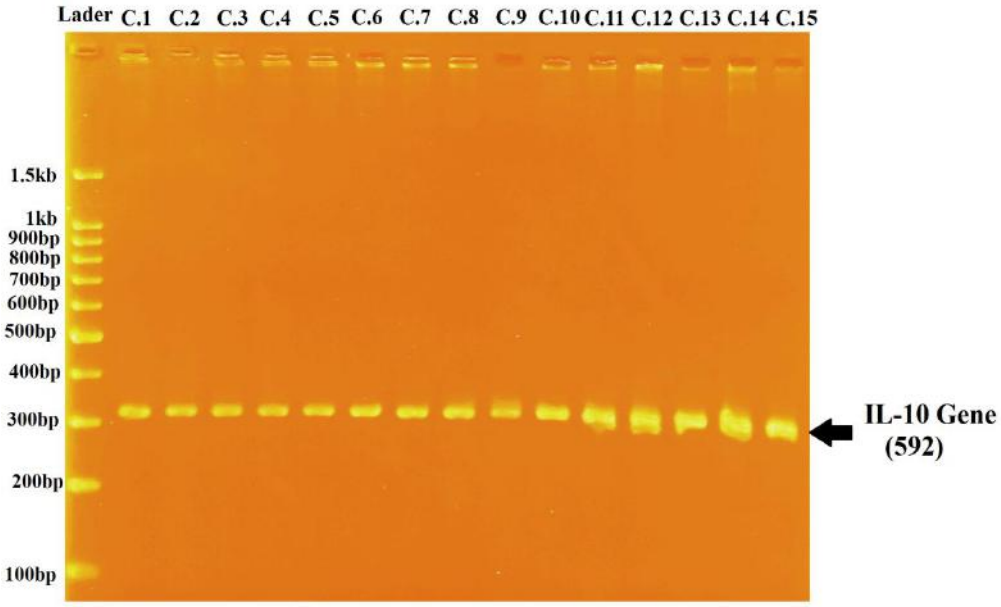
شكل (32): الترحيل الكهربائي لمحث الجين الطافر 1082- *IL-10* في العينة القياسية, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.

كما يوضح الشكلين (33) و(34) بان محث الجين الطافر 592- *IL-10* موجود في جميع عينات المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية, ويوضح الشكل بان القطعة المضخمة التي تمتلك الطفرة 592– ذات حجم جزيئي يقع بين 300 و400 زوج قاعدي.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (33): الترحيل الكهربائي لمحث الجين الطافر 592- *IL-10* في المصابين بداء السكري–النوع الاول, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.



شكل (34): الترحيل الكهربائي لمحث الجين الطافر 592- *IL-10* في العينة القياسية, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.

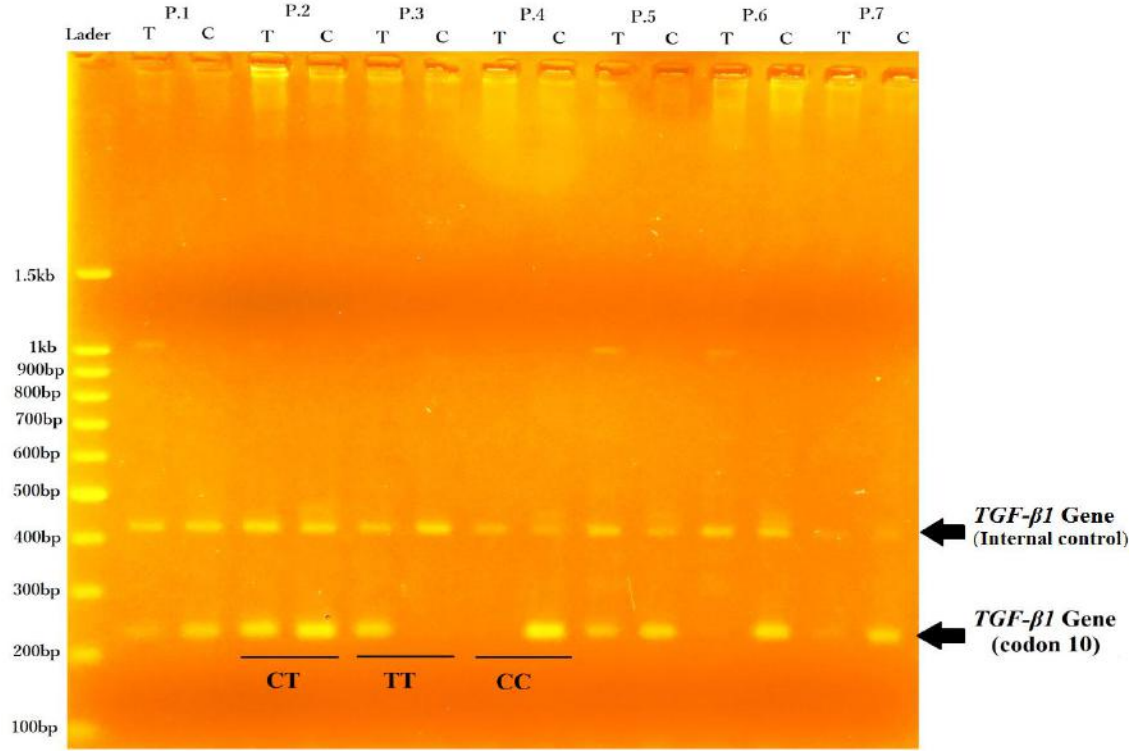
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

هذه الدراسة لم تتطرق إلى دراسة التعبير الجيني للموقعين 1082- و592- في الجين الطافر *IL-10* لمعرفة مدى توافقها مع نتائج دراسات الجانب المناعي التي لم تظهر مستويات عالية في مستوى تركيز الحركي الخلوي IL-10 في مصل عينات دم المصابين بداء السكري- النوع الاول. الدراسات الوراثية السابقة في التعدد الشكلي المظهري للجين الطافر *IL-10* في الموقعين 1082- و592- بينت تبايناً في علاقتهما او ارتباطهما بداء السكري- النوع الاول, وبين Urcelay *et al*., (2004) ان التعدد الشكلي المظهري للجين *IL-10* في الطفرات G/A 1082- ، C/T 819- و C/A 592- اظهروا استعداداً وراثياً مع خطر الإصابة داء السكري- النوع الاول, بينما في دراسة أخرى Mohebbatkaljahi *et al*., (2009), لوحظ بان التعدد الشكلي المظهري للجين *IL-10* في الطفرات G/A 1082- ، C/T 819- و C/A 592- لم يظهروا أية فروقٍ معنوية مرتبطة بداء السكري- النوع الاول, كما بينوا ان الدور الذي تلعبه هذه الطفرات في الإصابة بداء السكري- النوع الاول وقائياً من خطر الإصابة بالمرض, كما بين Javor *et al*., (2010) ان التعدد الشكلي المظهري للجين *IL-10* في الطفرات G/A 1082- ، C/T 819- و C/A 592- تظهر كمواقع لها ارتباط بالجانب الوقائي من خطر الإصابة بداء السكري- النوع الاول, وان هناك طرازان وراثيان مرتبطان بالجزء الوقائي مع خطر الإصابة بالمرض من بين الطرز الوراثية الثلاثة التي ظهرت في كل من الموقعين. جاءت هذه النتائج لتبين الدور الذي يؤديه جين *IL-10* كجين وقائي من المرض, إذ بين Kaur *et al*., (2009) بان للجين *IL-10* فعلاً متعدد المظاهر في الخلايا والانسجة, إذ يعمل على تثبيط الاستجابة المناعة الخلوية, وان أي خلل وراثي او طفرة في الجين *IL-10* قد يسبب فرطاً في انتاج الحركيات الخلوية الالتهابية مثل IL-1b، TNF و IFN-γ مما يؤدي إلى تطور المرض المناعي الذاتي مسبباً مرضاً مزمناً.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

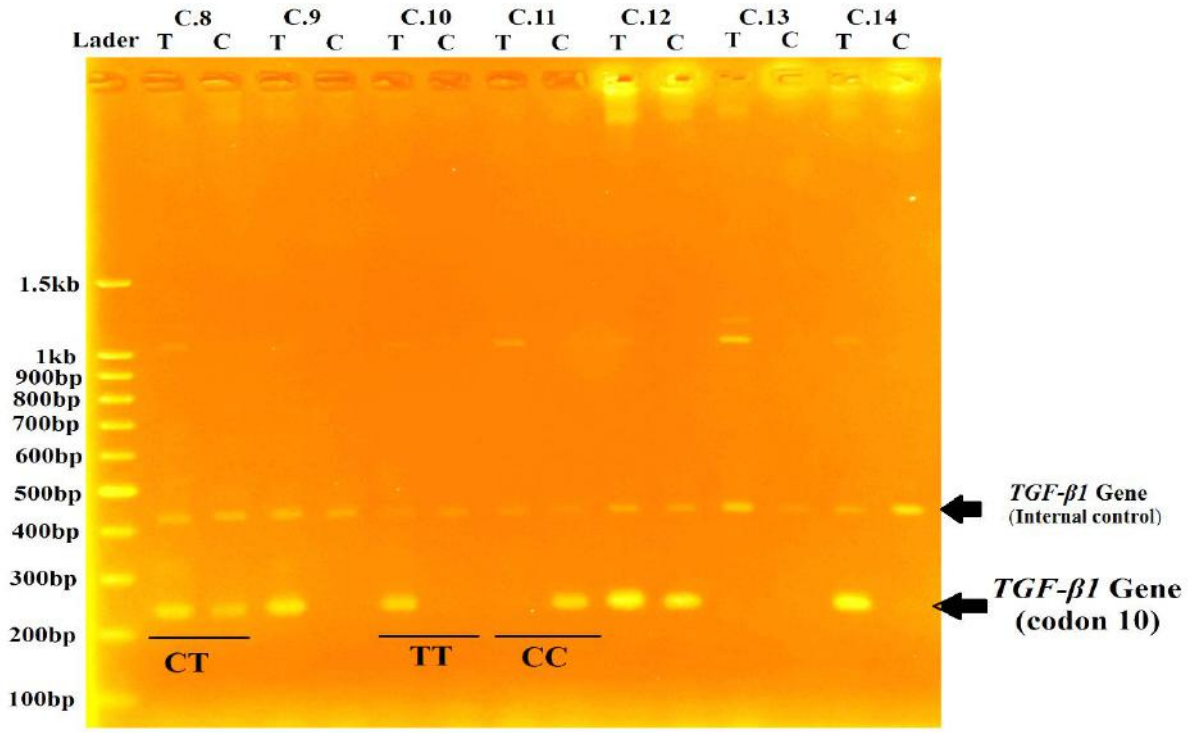
4-3-2-3: الكشف عن الطفرتين Codon 10: +869*C/T و Codon 25: +915*G/C في الجين *TGF-β1*

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للجين الطافر *TGF-β1* للشفرة (Codon 10: +869*C/T) المتضخم بتقانة ARMS-PCR إلى وجود أليلين هما C و T وإلى وجود ثلاثة انماط وراثية هي TT، CT وCC في عينة المصابين بداء السكري–النوع الاول والعينة القياسية، كما تبين نتائج الترحيل الكهربائي إلى وجود الجين الطافر *TGF-β1* بعد استعمال البادئ الخاص به في جميع العينات المدروسة للمصابين والعينة القياسية, وكما في الشكلين (35) و(36)، وعلى التوالي.



شكل (35): الترحيل الكهربائي للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) مبيناً فيه الأليلين T وC في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 2% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

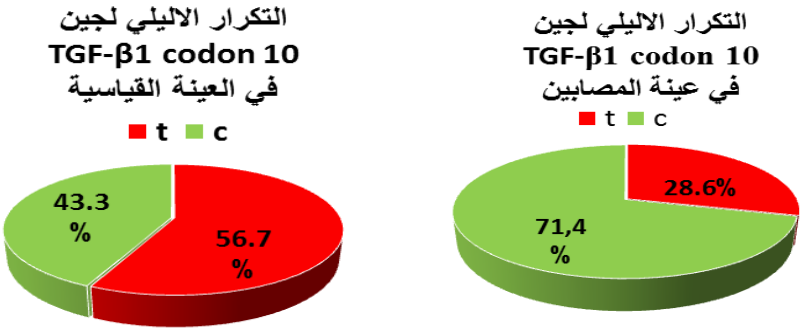


شكل (36): الترحيل الكهربائي للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10 +869*C/T) مبيناً فيه الأليلين *t* و *c* في العينة القياسية, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 2% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين

اظهرت نتائج التوزيع التكراري للأليلين *t* و *c* للجين الطافر *TGF-β1* في الشفرة (Codon 10: +869*C/T), وباستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium نتائج متغايرة مابين عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية, إذ سجل الأليل *t* في عينة المصابين نسبة 71.4% بالمقارنة مع الأليل *t* الذي سجل نسبة 28.6%، بينما سجل الأليل *t* في العينة القياسية نسبة 56.7% بالمقارنة مع الأليل *c* الذي سجل نسبة 43.3% (الشكل 37). كذلك يبين الجدول (13) بان التوزيع التكراري للأليلين *t* و *c* كان غير معنوي بين عينة المصابين والعينة القياسية باستعمال اختبار فشر Fisher's test, وكانت النسبة الحرجة للأليل *t* هي 1.91 مع مدة ثقة تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين 0.80–4.60, وكانت نسبته كأليل مسبب ومرتبط مع المرض بلغت 0.341, بينما اظهر

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الأليل *c* نسبة حرجة بلغت 0.52 مع مدة ثقة تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين0.22–1.26، وكانت نسبته كأليل وقائي من المرض بلغت0.207.



شكل (37): تكرارات الأليلين *t* و*c* للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية.

جدول (13): تكرارات الأليلين *t* و*c* للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية.

الجين	الأليل	عينة المصابين العدد (%)	العينة القياسية العدد (%)	(95%CI) OR	P value
TGF-β1 (Codon 10: +869*C/T)	*t*	(%71.4)50	(%56.7)17	(4.60-0.80=CI) 1.91	0.110
	E.F	0.341			
	c	(%28.6)20	(%43.3)13	(1.26-0.22=CI) 0.52	
	P.F	0.207			

Odds ratio =OR (النسبة الحرجة)، Confidence Intervals =CI (مدة الثقة)، Preventive faction =P.F (نسبة الجزء الوقائي)، Etiological faction =E.F (نسبة الجزء المسبب).

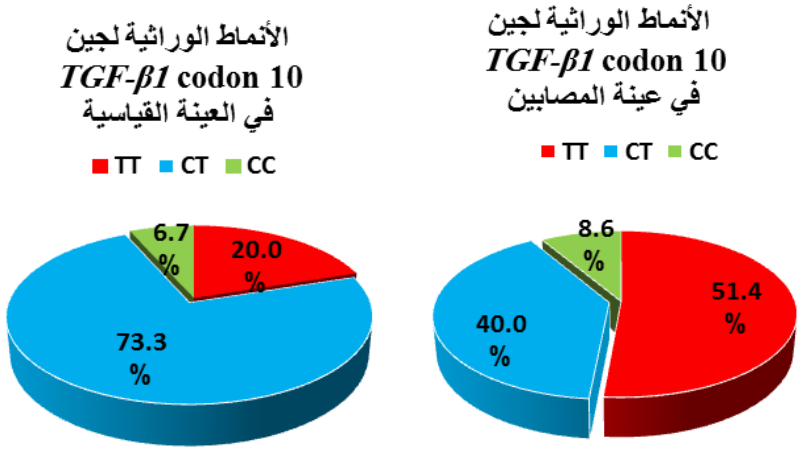
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ان هذه النتائج للتعدد الشكلي المظهري التي اظهرها الأليل T في عينة المرضى المصابين بداء السكري– النوع الاول تبين بان للآليل علاقة بالمرض, بينما يبين التعدد الشكلي المظهري الذي اظهره الأليل C في العينة القياسية بان هناك علاقة ما بين الأليل والجزء الوقائي من المرض. اتفقت هذه النتائج مع نتائج كل من (Jahromi *et al*., 2010; Javor *et al*., 2010 ; Bazzaz *et al*., 2014) من حيث حصولهم على تكرار للأليل T في المصابين بنسبة اعلى مما هو عليه في العينة القياسية, وكان تكرار الأليل C في العينة القياسية اعلى من تكراره في عينة المصابين بداء السكري النوع– الاول, بينما لم تتوافق هذه النتائج مع نتائج (Patel *et al*., 2005) لحصولهم على تكرار للأليل T في العينة القياسية بنسبة اعلى من عينة المصابين, وتكرار الأليل C في عينة المصابين كان اعلى بالمقارنة مع العينة القياسية.

اظهرت نتائج التحليل الوراثي لنتائج تقانة ARMS-PCR للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T), وباستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium ثلاث انماط وراثية لدى عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية وهي TT، CT وCC. بينت النتائج وجود تغاير في تكرار الانماط الوراثية ما بين عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية, إذ اظهر النمط الوراثي TT نسبة اعلى لدى عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول مقارنة بالعينة القياسية, وكانت النسب 51.4% و20.0% وعلى التوالي، وكان هناك اختلافاً معنوياً بلغت قيمته 0.038 عند مستوى احتمالية P<0.05 باستعمال اختبار فشر Fisher's test. كانت قيمة النسبة الحرجة 4.24, ومدة الثقة كانت قيمتها بين 1.06–16.93، كما ظهر النمط الوراثي TT كنمط وراثي مسبباً ومرتبطاً مع خطر الإصابة بداء السكري، إذ بلغت قيمته 0.393. اظهر الطراز الوراثي CT نسبة اعلى لدى العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين, وكانت النسب 73.3% و40.0% وعلى التوالي، وبين التحليل الاحصائي عند

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

استعمال اختبار فشر Fisher's test بان النمط الوراثي TA قد اختلف معنوياً بصورة اقل لدى عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية وعند مستوى احتمالية P<0.05 وكانت قيمته 0.031. كانت قيمة النسبة الحرجة 0.24 ومدة الثقة كانت قيمتها بين 0.07–0.88، كما ظهر النمط الوراثي CT كنمط وراثي مرتبطاً مع خطر الإصابة بداء السكري، إذ بلغت قيمته 0.556. اظهر النمط الوراثي CC نسبة اعلى لدى عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول بالمقارنة مع العينة القياسية وكانت النسب 8.6% و6.7% وعلى التوالي، ولم يكن هناك أي اختلاف معنوي. كانت قيمة النسبة الحرجة 1.31 ومدة الثقة كانت قيمتها بين 0.13–12.84، كما ظهر النمط الوراثي CC كنمط وراثي مرتبطاً مع خطر الإصابة بداء السكري، إذ بلغت قيمته 0.20، كما في الشكل (38) والجدول (14).



شكل (38): تكرارات الانماط الوراثية المشاهدة للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

جدول (14): الانماط الوراثية المشاهدة للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 10: +869*C/T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية

الجين	النمط الوراثي	عينة المصابين العدد 35 (%)	العينة القياسية العدد 15 (%)	(95%CI) OR	P value
TGF-β1 (Codon 10: +869*C/T)	TT	(%51.4)18	(%20)3	(16.93-1.06=CI) 4.24	*0.038
	P.F	0.393			
	CT	(%40.0)14	(%73.3)11	(0.88-0.07=CI) 0.24	*0.031
	P.F	0.556			
	CC	(%8.6)3	(%6.7)1	(12.84-0.13=CI) 1.31	0.654
	E.F	0.20			

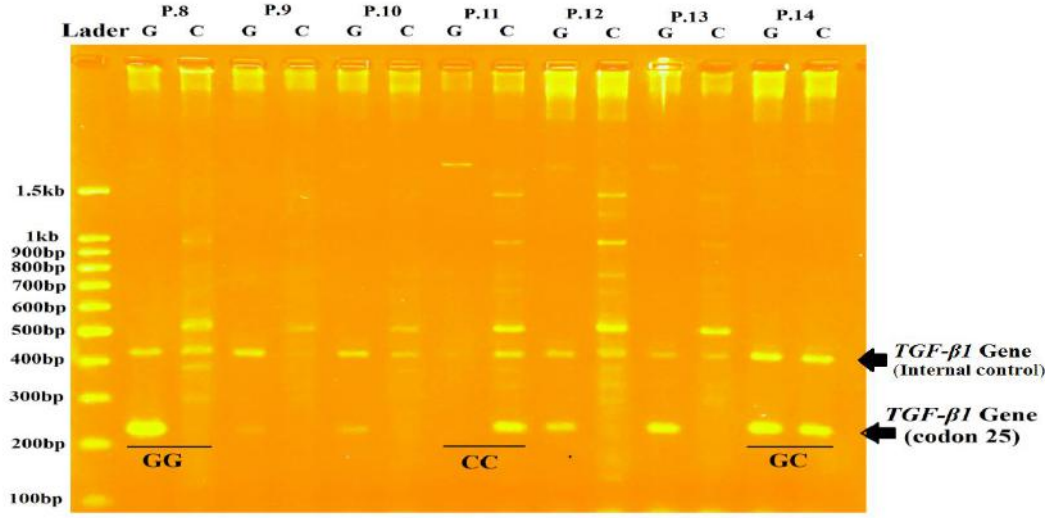
Odds ratio = OR (النسبة الحرجة)، Confidence Intervals =CI (مدة الثقة)، Preventive faction =P.F (نسبة الجزء الوقائي)، Etiological faction =E.F (نسبة الجزء المسبب)، *= اختلاف معنوي عند مستوى أحتمال P<0.05 وباستعمال اختبار فشر Fisher's test

نتائج التكرار المعنوي الذي اظهره النمط الوراثي TT في التعدد الشكلي المظهري للجين الطافر TGF-β1 (codon 10 +869*C/T) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول مقارنة بالعينة القياسية, والنسبة الحرجة والتي كانت أكبر من قيمة واحد تبين ان هناك ارتباط مابين الطراز الوراثي والجزء المسبب في خطر الإصابة بالمرض, ويمكن ان يعد النمط الوراثي TT كمؤشر وراثي مرتبطاً مع داء السكري– النوع الاول, وان التكرار المعنوي للنمط الوراثي CT في العينة القياسية والذي اظهر نسباً في عينة المصابين اقل من العينة القياسية, مع نسبة حرجة كانت اقل من واحد وتبين هذه القيمة مدى ارتباط النمط الوراثي كنمط وقائي من المرض. تتطابق هذه النتائج مع العديد من الدراسات, إذ تتفق مع ما حصل عليه كل من (Bazzaz *et al*., 2014; Jahromi *et al*., 2010 ; Javor *et al*., 2010; Patel *et al*.,

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

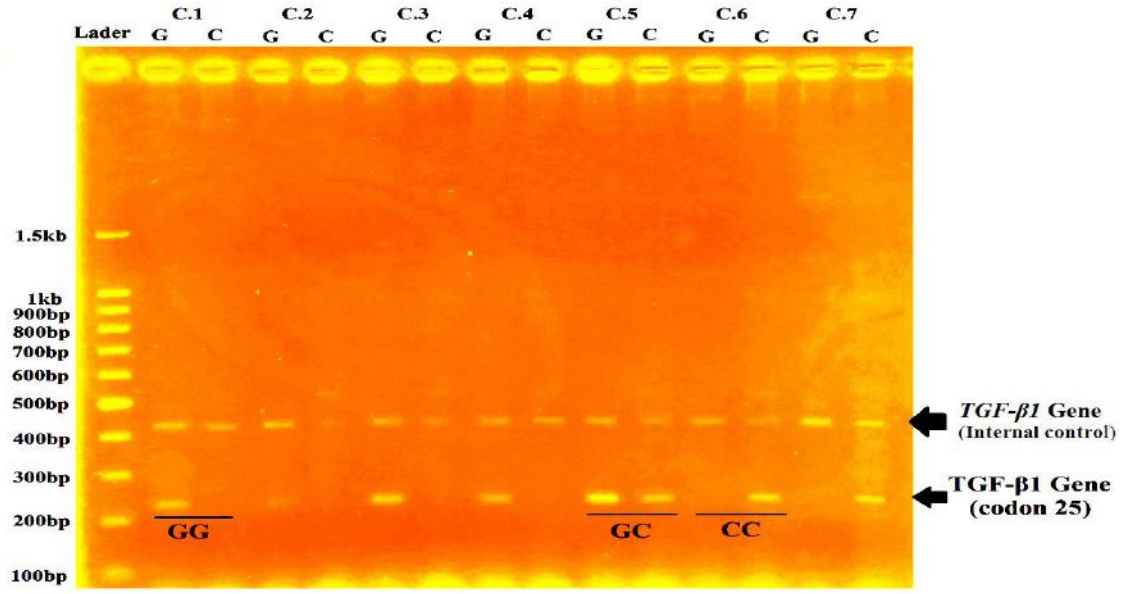
(2005 على تكرار النمطين الوراثيين TT وCC في عينة المصابين بنسبة اعلى من العينة القياسية, وكذلك نسبة اعلى للنمط الوراثي CT في العينة القياسية مما هو في عينة المصابين.

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للجين الطافر *TGF-β1* في لشفرة (Codon 25: +915*G/C) المتضخم بتقانة ARMS-PCR إلى وجود أليلين هما G وC وإلى وجود ثلاثة انماط وراثية هي GG، GC وCC في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية، كما تبين نتائج الترحيل الكهربائي وجود الشفرة Codon 25: +915*G/C الخاصة بالجين الطافر *TGF-β1* في مواقع جينية أخرى في عينة المصابين, بينما لم تظهر هذه المواقع في العينة القياسية, كما بينت نتائج الترحيل الكهربائي وجود الجين عند استعمال البادئ الخاص بالجين الطافر *TGF-β1* في جميع العينات المدروسة للمصابين والعينة القياسية, وكما مبين في الشكلين (39 و40).



شكل (39): الترحيل الكهربائي للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) مبيناً فيه الأليلين *c* و*g* في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 2% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

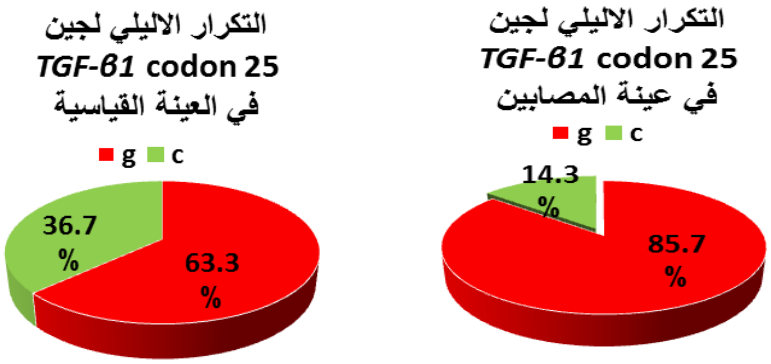


شكل(40): الترحيل الكهربائي للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) مبيناً فيه الأليلين *c* و *g* في العينة القياسية, وتم الترحيل باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 2% وتحت جهد فولتية 75 V لمدة ساعتين.

اظهرت نتائج التوزيع التكراري للأليلين *c* و *g* للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) وباستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium نتائج متغايرة مابين عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية, إذ سجل الأليل *g* نسبة 86.7% في عينة المصابين بالمقارنة مع الأليل *c* الذي سجل نسبة 14.3%، بينما سجل الأليل *g* نسبة 63.3% في العينة القياسية بالمقارنة مع الأليل *c* الذي سجل نسبة 36.7% كما في الشكل (41). كما يظهر الجدول (15) ان التوزيع التكراري قد أختلف معنوياً بين عينة المصابين والعينة القياسية, وتبين النتائج بان الأليل *g* اظهر تكراراً معنوياً لدى المصابين بنسبة اعلى من العينة القياسية باستعمال اختبار فشر Fisher's test, وكانت النسبة الحرجة هي 3.47 مع مدة ثقة تحت نسبة 95% سجلت قيمة تراوحت بين 1.29–9.32, وكانت نسبته كأليل مسببٍ ومرتبطٍ مع خطر الإصابة بالمرض بلغت 0.610, بينما اظهر الأليل *c* تكراراً معنوياً لدى

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

العينة القياسية بنسبة اعلى من عينة المصابين باستعمال اختبار فشر Fisher's test, وكانت النسبة الحرجة هي 0.29 مع مدة ثقة تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين 0.11–0.77، وكانت نسبته كأليل وقائي من المرض بلغت 0.261.



شكل (41): تكرارات الأليلين *c* و *g* للجين الطافر (Codon 25: +915*G/C) *TGF-β1* في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية

جدول (15): تكرارات الأليلين *c* و *g* للجين الطافر (Codon 25: +915*G/C) *TGF-β1* في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية.

الجين	الأليل	عينة المصابين العدد (%)	العينة القياسية العدد (%)	(95%CI) OR	P value
TGF-β1 (Codon 25: +915*G/C)	*g*	(%85.7)60	(%63.3)19	(9.32-1.29=CI) 3.47	*0.015
	E.F	0.610			
	c	(%14.3)10	(%36.7)11	(0.77-0.11=CI) 0.29	
	P.F	0.261			

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

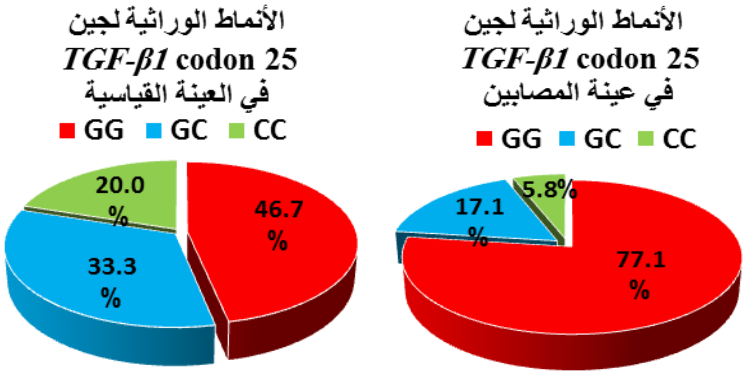
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

تبين هذه النتائج ان التعدد الشكلي المظهري للأليل *g* يظهر ارتباط قوي مع خطر الإصابة بداء السكري– النوع الاول, بينما نتائج التعدد الشكلي المظهري للأليل *c* تبين ان هناك ارتباطاً للأليل مع الجزء الوقائي من خطر الإصابة بالمرض, وهذه النتائج تتفق مع نتائج (Javor *et al.*,(2010, ولكنها لم تتفق مع نتائج (Bazzaz *et al.*, 2014; Masood *et al.*, 2012)، إذ حصلوا على تكرار للأليل *g* في العينة القياسية بنسبة اعلى من عينة المصابين, وتكرار للأليل *c* في عينة المصابين بنسبة اعلى من العينة القياسية.

اظهرت نتائج التحليل الوراثي لنتائج تقانة ARMS-PCR للجين الطافر *TGF-β1* في الشفرة (Codon 25: +915*G/C) وباستعمال قانون التوازن هاردي–واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium ثلاثة انماط وراثية لدى عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية وهي GG، GC وCC. بينت النتائج وجود تباين في تكرار الانماط الوراثية ما بين عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية, إذ اظهر النمط الوراثي GG نسبة بلغت 77.1% لدى عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول بالمقارنة مع العينة القياسية التي كانت نسبتها 46.7%, وكان هناك اختلافاً معنوياً لدى المصابين، إذ بلغت قيمته 0.039 تحت مستوى احتمالية P<0.05 عند استعمال اختبار فشر Fisher's test, كما كانت قيمة النسبة الحرجة تساوي 3.86 ومدة الثقة كانت قيمتها بين 1.10 – 13.48، وتبين هذه النتائج دور النمط الوراثي GG كنمط وراثي مرتبط مع خطر الإصابة بداء السكري– النوع الاول، إذ بلغت قيمته 0.571. اظهرت النتائج ايضاً نسبة اعلى للنمط الوراثي GC عند العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين وكانت النسب 33.3% و17.1%، وعلى التوالي. التحليل الاحصائي عند استعمال اختبار فشر Fisher's test قد بين بان تكرار النمط الوراثي GC لم يظهر فروقٍ معنوية لدى

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين وتحت مستوى احتمالية P<0.05, كما كانت قيمة النسبة الحرجة 0.41 ومدة الثقة اظهرت قيمة بين 0.11–1.60، وهذه النتائج تبين الدور الذي يؤديه النمط الوراثي GC كجانب وقائي من خطر الإصابة بالمرض, وكانت نسبته كعامل وقائي 0.195, كما ظهر النمط الوراثي CC كنمط وراثي وقائي من خطر الإصابة بداء السكري– النوع الاول، إذ بلغت نسبته كعامل وقائي من للمرض 0.152. وكانت نسبة النمط الوراثي CC في عينة المصابين اقل من العينة القياسية إذ بلغت 5.8% و 20.0%، وعلى التوالي. كانت قيمة النسبة الحرجة 0.24 مع مدة ثقة كانت قيمتها بين 0.40– 1.56. التحليل الاحصائي عند استعمال اختبار فشر Fisher's test قد بين بان تكرار النمط الوراثي CC قد اظهر فروقاً غير معنوية لدى عينة المرضى بالمقارنة مع العينة القياسية وعند مستوى احتمالية P<0.05, كما هو مبين في الشكل (42) والجدول (16).



شكل (42): تكرارات الانماط الوراثية للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

جدول (16): الانماط الوراثية للجين الطافر *TGF-β1*(Codon 25: +915*G/C) في عينة المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينة القياسية

الجين	النمط الوراثي	عينة المصابين العدد 35 (%)	العينة القياسية العدد 15 (%)	(95%CI) OR	P value
TGF-β1 (Codon 25: +915*G/C)	GG	(%77.1)27	(%46.7)7	(13.48-1.10=CI) 3.86	*0.039
	E.F	0.571			
	GC	(%17.1)6	(%33.3)5	(1.60-0.11=CI) 0.41	0.184
	P.F	0.195			
	CC	(%5.8)2	(%20)3	(1.56-0.40=CI) 0.24	0.152
	P.F	0.152			

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

هذه النتائج والتي اظهرت تكراراً عالياً ومعنوياً للنمط الوراثي GG في عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية تبين بان هناك ارتباط مابين الطراز الوراثي والجانب المسبب للمرض, ولكن ظهور نتائج النمط الوراثي CC وبنسبة اعلى في العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين مع نسبة حرجة اقل من قيمة واحد فقد تبين وجود ارتباط لهذا النمط الوراثي مع الجانب الوقائي من خطر الإصابة بالمرض. هذه النتائج تتفق مع نتائج ما حصل عليه (Javor *et al*., 2010) من حيث حصولهم على نتائج للانماط الوراثية GG ، GC وCC مطابقة مع نتائج هذه الدراسة, ولكن لم تتفق هذه النتائج مع ما حصلوا عليه (Bazzaz *et al*., 2014; Masood *et al*., 2012) من حيث حصولهم على تكرار للنمط GG في عينة

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المصابين بنسب اعلى من العينة القياسية, وتكرار للنمطين الوراثيين GC وCC في العينة القياسية بنسب اعلى من عينة المصابين.

تبين نتائج دراسة التعدد الشكلي المظهري للجين الطافر *TGF-β1* وجود ارتباط معنوي للنمط الوراثي TT مع ارتباطاً اقل للنمط الوراثي CC للشفرة 10 مع المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول, كذلك وجود ارتباط معنوي للنمط الوراثي GG في الشفرة 25 مع عينة المصابين مقارنة بالعينة القياسية, وهذه النتائج تبين وجود ارتباط للجين الطافر *TGF-β1* مع تطور داء السكري- النوع الاول, وهذه النتائج تعززها نتائج الجانب المناعي والتي اظهرت مستويات عالية ومعنوية في تركيز الحركي الخلوي TGF-β1 في مصل عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية, وهناك العديد من الدراسات الوراثية والمناعية قد اظهرت تبياناً في دور جين *TGF-β1* في الامراض المناعية الوراثية ومن بينها داء السكري- النوع الاول, وأغلب هذه الدراسات ليست بالحديثة لاسيما قبل 2009م والتي تظهر دوراً وقائياً للجين *TGF-β1* في داء السكري- النوع الاول, إذ بين Du *et al.*, (2006) و Li *et al.*, (2006) بان تعبير جين *TGF-β1* في داء السكري- النوع الاول يكون مانعاً من تطور المرض. وقد اوضح كل من Ichinose *et al.*,(2007) و Richer *et al.*, (2008) بان حث انتاج الحركي الخلوي TGF-β1 في خلايا الجزيرات يستطيع ان يثبط التحطم الذاتي الذي تتوسطه المناعة الذاتية, وان وجود TGF-β1 مع المستضدات الذاتية لخلايا بيتا في البنكرياس يكون مكملاً لحث الخلايا التائية المنظمة الوقائية والتي تكون مرتبطة مع الحماية من خطر تطور داء السكري- النوع الاول، لكن أغلب الدراسات الحديثة تبين ان دور TGF-β1 في الامراض المناعية والوراثية يكون دوراً مؤثراً وقوياً مع المرض, إذ بين Zorena *et al.*, (2013) و Gomes *et al.*, (2014) بان ارتفاع السكري في المصابين يصاحبه زيادة في انتاج TGF-β1 وان هذه

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الزيادة تكون مؤثرة في داء السكري, أي ان هذه الزيادة مع الوقت تؤدي إلى حدوث مضاعفات أخرى مصاحبة للمرض مثل اعتلال الاوعية الشبكية الدقيقة، كما بين Bazzaz *et al*., (2014) إلى وجود علاقة لجين *TGF-β1* مع داء السكري– النوع الاول, ووضح Zorena *et al*., (2013) ان هناك ارتباط قوي للجين *TGF-β1* مع تطور داء السكري– النوع الاول, وبين ان زيادة تعبير TGF-β1 في المصابين يعطي تأثيراً قوياً في المصابين, وان مستوياته العالية تكون مرتبطة مع تحطم الاوعية الشبكية في العين وانسجة الكليتين. تبين دراسة أخرى ان زيادة الانتاج لا يكون مرتبطاً مع المصابين بداء السكري– النوع الاول فقط, وانما يمكن ان يؤثر في امراض مناعية أخرى, فقد اظهرت دراسة AL-faradhi, (2015) إلى وجود علاقة معنوية للجين *TGF-β1* مع مرضى التصلب المتعدد Multiple sclerosis بالمقارنة مع العينات القياسية.

يبين الشكل (39) من نتائج الترحيل الكهربائي لعينة المصابين ظهور حزم اخرى في مواقع أخرى في المجين فضلاً عن الموقع المدروس للشفرة 25 للجين الطافر *TGF-β1*. هذه النتائج يمكن مناقشتها على ان درجة حرارة الالتحام Annealing قد تكون غير مضبوطة لدرجة تفادي ظهور مثل هذه الحزم.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

4-3-3: التسلسل التتابعي لمحث الجين الطافر *IL-10* في الموقعين 592- و 1082-

درس التسلسل التتابعي DNA sequencing للجين الطافر IL-10 في الموقعين 592- و-1082 في بعض من عينات المصابين والعينات القياسية، لاسيما للأطفال الذين وجدت لديهم تراكيز الحركي الخلوي IL-10 صفراً او كانت تراكيز عالية بالمقارنة مع متوسط تراكيز هذا الحركي الخلوي في عينة المصابين بداء السكري- النوع الاول والعينة القياسية واللذين كانا 0.068 و0.111 بيكوغرام/مليلتر، وعلى التوالي (جدول 5). أختيرت بعض عينات المصابين والعينات القياسية للجين الطافر *IL-10* في الموقعين -592 و1082-, وكما في الجدول (17).

جدول (17): تراكيز الحركي الخلوي IL-10 في عينات المصابين والعينات القياسية التي أختيرت في دراسة التسلسل التتابعي للجين الطافر IL-10 في الموقعين 592- و1082-

العينة	تركيز IL-10 في عينة المصابين(بيكوغرام/مليلتر)	العينة	تركيز IL-10 في العينة القياسية (بيكوغرام/مليلتر)
P1	0.0	C1	0.173
P5	0.129	C4	0.0
P19	0.09	C5	0.093
P25	0.0	C6	0.0
P32	0.02	C11	0.281
التركيز	*0.068	التركيز	*0.111

*= القيم تمثل معدل تركيز IL-10 في عينة المصابين والعينة القياسية مأخوذة من جدول (5)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

4-3-3-1: المقارنة بين التسلسل التتابعي لمحث الجين الطافر في الموقع 592- مع التسلسل القياسي Refseq لنفس المحث في عينة المصابين والعينة القياسية

قورنت نتائج التسلسل التتابعي لمحث الجين الطافر *IL-10* لقطعة الدنا المضخمة في الموقع 592- التي كان حجمها الجزيئي 300 زوج قاعدة مع التسلسل التتابعي القياسي للكروموسوم رقم 1 وكذلك للمحث نفسه المنشور في الموقع العالمي والذي هو المركز الوطني لمعلومات التقانة الأحيائية الاميركي NCBI الموجود على شبكة الانترنيت تحت عنوان .http://www.ncbi.nlm.nih.gov. ان رقم المدخل Accession number للتسلسل التتابعي القياسي للكروموسوم الاول هو NC_000001.11 ولمحث جين *IL-10* في بنك الجينات هو AB098711.1، وقد استعملت الرموز الخاصة بالاتحاد الدولي للكيمياء البحتة والتطبيقية International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (ملحق 2). انه من المعروف ان بداية ونهاية التسلسل التتابعي للقطع المدروسة بوساطة جهاز التحليل الوراثي تكون غير واضحة ومشوشة المعالم، لذلك أستغني عن بعض التسلسلات النيوكليوتيدية في طرفي القطعة المدروسة وقرأت التسلسلات الواضحة والمميزة فقط تجنباً لحدوث أية أخطاء حتى ولو كان في قاعدة نتروجينية واحدة وكذلك للمحافظة على دقة النتائج، علماً بانه ما فقد من القواعد النيكلوتيدية في الأطراف يعد غير معنوياً. أختيرت بعض عينات المصابين والعينات القياسية وبمعدل ثلاث عينات، علماً بانه قد أعتمدت النتائج في حالة تطابق الطفرات في التسلسلات النيكلوتيدية لجميع العينات المدروسة ومقارنتها مع التسلسل النيكلوتيدي القياسي Refseq في الكروموسوم 1 ومحث الجين *IL-10*. بينت النتائج وجود ثلاثة انواع من الطفرات الجينية هي الأضافة Addition، الحذف Deletion والاستبدال Substitution، كما كانت هناك مواقع هجينة. اظهرت نتائج تحليل التسلسلات النيكلوتيدية لمحث الجين 592- *IL-10* في عينات المصابين بداء

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

السكري– النوع الاول والعينات القياسية إضافة النيكلوتيدة الثايمين Thymine (T) في الموقع 1402 وكذلك حذف التسلسل النيكلوتيدي ACAGCT بشكل متسلسل في المواقع 1464–1468، وحذف القاعدتين الكوانين Guanine (G) والسايتوسين Cytosine (C) في الموقعين 1488 و1489، وعلى التوالي في عينات المصابين بداء السكري– النوع الاول (ملحق 3)، بالمقارنة مع العينات القياسية، إذ كان هناك إضافة النيكلوتيدة G في الموقع 1303 وكذلك إلى حذف القواعد T، الأدنين Adenine (A) و G في المواقع 1286، 1334 و1335 وعلى التوالي، وكذلك حذف التسلسل النيكلوتيدي TAGA بشكل متسلسل في المواقع 1352–1355 (ملحق 4). اظهرت النتائج بان هناك طفرات استبدال قواعد بيورينية Purines بأخرى بيورينية واستبدال قواعد بريمدنية Pyrimidines بأخرى بريمدنية، وكذلك استبدال قواعد بيورينية بأخرى بريمدنية وبريميدنية بأخرى بيورينية. كان هناك 57 طفرة استبدال في التسلسلات النيكلوتيدية لعينات المصابين بالمقارنة مع 66 طفرة استبدال في العينات القياسية عند مقارنتها مع التسلسلات النيكلوتيدية القياسية (جدول 18). يوضح الجدول وجود اعلى نسبة في طفرات الاستبدال هي G→A وبنسبة 17.54% بالمقارنة مع اقل نسبة طفرات استبدال والتي كانت A→T وبنسبة 1.75% في عينات المصابين بالمقارنة مع اعلى نسبة في طفرات الاستبدال هي C→T وبنسبة 15.15% واقل نسبة طفرات استبدال والتي كانت G→C وبنسبة 1.52% في العينات القياسية. هناك طفرات استبدال كانت نسبتها في عينات المصابين اعلى مما هي عليه في العينة القياسية مثل C→A، بينما كانت هناك طفرات استبدال نسبتها في عينات المصابين اقل مما هي عليه في العينة القياسية مثل G→T. كان هناك طفرات جينية أخرى مختلفة ولكنها وجدت في عينة دون الأخرى ولم تسجل لكثرتها، كما أعتمد على الطفرات التي تكررت في جميع العينات المدروسة (الشكلين 43 و44). لقد تكرر صندوق تاتاTATA box الذي يرتبط به عامل النسخ

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Transcription factor مرتين في التسلسل النيكلوتيدي القياسي وكذلك في العينة القياسية C5 ولكن في مواقع مختلفة بالمقارنة مع التسلسل النيكلوتيدي القياسي، بينما فقد هذا التسلسل TATA في عينات المصابين والعينتين القياسيتين C1 وC4، علماً بان عامل النسخ يكون مهماً في توجيه انزيم الرنا بوليميريز الثاني RNA Polymerase II إلى المحفز Promoter، وكذلك في فصل سلسلتي الدنا لتسهيل عملية نسخ mRNA.

جدول (18): النسبة المئوية لتكرار طفرات الاستبدال في محث الجين 592- *IL-10* لعينات المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينات القياسية*

طفرة الاستبدال	عينات المصابين		العينات القياسية	
	عدد مرات تكرارها	النسبة المئوية %	عدد مرات تكرارها	النسبة المئوية %
A → C	3	%5.26	4	%6.06
G → A	10	%17.54	14	%21.21
A → G	6	%10.53	5	%7.58
C → T	8	%14.04	10	%15.15
T → C	6	%10.53	8	%12.12
A → T	1	%1.75	-	-
G → T	4	%7.02	8	%12.12
C → G	3	%5.26	2	%3.03
T → G	4	%7.02	2	%3.03
C → A	7	%12.28	4	%6.06
G → C	2	%3.51	1	%1.52
T → A	3	%5.26	8	%12.12
المجموع	57	%100	66	%100

*= عينات المصابين التي درس فيها التسلسل التتابعي هي P1، P5 وP25، العينات القياسية= C1، C4 وC5.

A= الأدنين، T= الثايمين، G= الكوانين، C= السايتوسين.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

شكل (43): إصطفاف Alignment القواعد النتروجينية في محث الجين 592- *IL-10* في عينات المصابين بداء السكري– النوع الاول والتسلسل النيكلوتيدي القياسي*

*= عينات المصابين التي درس فيها التسلسل التتابعي هي P1، P5 و P25.

A= الأدنين، T= الثايمين، G= الكوانين، C= السايتوسين. *= مصدر التسلسل التتابعي للدنا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة. الأحرف الملونة تشير إلى وجود طفرات استبدال.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

شكل (44): إصطفاف Alignment القواعد النتروجينية في محث الجين 592- *IL-10* في العينات القياسية والتسلسل النيكلوتيدي القياسي*

*= العينات القياسية التي درس فيها التسلسل التتابعي هي C1، C4 وC5.

A= الأدنين، T= الثايمين، G= الكوانين، C= السايتوسين. *= مصدر التسلسل التتابعي للدنا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة. الأحرف الملونة تشير إلى وجود طفرات استبدال.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

4-3-3-2: المقارنة بين التسلسل التتابعي لمحث الجين الطافر في الموقع 1082- مع التسلسل القياسي Refseq للمحث نفسه في عينة المصابين والعينة القياسية

اظهرت نتائج تحليل التسلسلات النيكلوتيدية لمحث الجين 1082- *IL-10* في عينات المصابين بداء السكري- النوع الاول والعينات القياسية إضافة النيكلوتيدتين TG في الموقعين 1255 و1254، وعلى التوالي وكذلك حذف التسلسلات النيكلوتيدية AAT بشكل متسلسل في المواقع 1217-1215 والتسلسلات النيكلوتيدية ACAGG بشكل متسلسل في المواقع 1308-1312 في عينات المصابين بداء السكري- النوع الاول (ملحق 5)، بالمقارنة مع العينات القياسية، إذ لم توجد أية إضافة لأية نيكلوتيدة وكذلك حذف القواعد C وA في المواقعين 1093 و1172 وعلى التوالي، وكذلك حذف التسلسل النيكلوتيدي TTCTCA بشكل متسلسل في المواقع 1278-1283 والتسلسل النيكلوتيدي GG في الموقعين 1309-1310 (ملحق 6). اظهرت النتائج بان هناك طفرات استبدال قواعد بيورينية Purines بأخرى بيورينية واستبدال قواعد بريمدنية Pyrimidines بأخرى بريمدنية، وكذلك استبدال قواعد بيورينية بأخرى بريمدنية وبريميدنية بأخرى بيورينية. كان هناك 78 طفرة استبدال في التسلسلات النيكلوتيدية لعينات المصابين بالمقارنة مع 51 طفرة استبدال في العينات القياسية عند مقارنتها مع التسلسلات النيكلوتيدية القياسية (جدول 19). يوضح الجدول وجود اعلى نسبة في طفرات الاستبدال هي T→C وبنسبة 17.95% بالمقارنة مع اقل نسبة طفرات استبدال والتي كانت T→G وبنسبة 2.56% في عينات المصابين بالمقارنة مع اعلى نسبة في طفرات الاستبدال هي G→T وبنسبة 23.53% واقل نسبة طفرات استبدال والتي كانت C→G وبنسبة 1.96% ولاتوجد أية طفرة استبدال من نوع C →A في العينات القياسية. هناك طفرات استبدال كانت نسبتها في عينات المصابين اعلى مما هو عليه في العينة القياسية مثل A→G، C→T، T→C، C→G ، C→A وG→C، بينما كانت هناك

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

طفرات استبدال نسبتها في عينات المصابين اقل مما هي عليه في العينة القياسية مثل T→G، G→T وT→A. كان هناك طفرات جينية أخرى مختلفة ولكنها وجدت في عينة دون الأخرى ولم تسجل لكثرتها، كما أعتمد على الطفرات التي تكررت في جميع العينات المدروسة (الشكلين 45 و46). لقد تكرر صندوق تاتاTATA box مرتين في التسلسل النيكلوتيدي القياسي Refseq، بينما فقد هذا التسلسل TATA في عينات المصابين والعينات القياسية.

جدول (19): النسبة المئوية لتكرار طفرات الاستبدال في محث الجين 1082- *IL-10* لعينات المصابين بداء السكري– النوع الاول والعينات القياسية*

طفرة الاستبدال	عينات المصابين		العينات القياسية	
	عدد مرات تكرارها	النسبة المئوية %	عدد مرات تكرارها	النسبة المئوية %
A → C	3	%3.85	2	%3.92
G → A	7	%8.97	6	%11.76
A → G	10	%12.82	5	%9.81
C → T	11	%14.10	2	%3.92
T → C	14	%17.95	5	%9.81
A → T	6	%7.69	5	%9.81
G → T	8	%10.26	12	%23.53
C → G	4	%5.13	1	%1.96
T → G	2	%2.56	4	%7.84
C → A	4	%5.13	-	-
G → C	6	%7.69	3	%5.88
T → A	3	%3.85	6	%11.76
المجموع	78	%100	51	%100

*= عينات المصابين التي درس فيها التسلسل التتابعي هي P19، P25 وP32، العينات القياسية= C4، C6 وC11.

A= الأدنين، T= الثايمين، G= الكوانين، C= السايتوسين.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

```
Alignment: IL-10 -1082 Promoter\Patients

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1060       1070       1080       1090       1100
Refseq-Chr.1  TGGGAAGGGG AAGTAGGGAT AGGTAAGAGG AAAGTAAGGG ACCTCCTATC
Refseq-IL-10  -----AGGGG AAGTAGGGAT AGGTAAGAGG AAAGTAAGGG ACCTCCTATC
P19-1082      ---------- ---------- ---------- -CRGAAAAAG GGGGTTGCAG
P25-1082      ---------- ---------- --------TC AAGGAATAAG GGRTTTSAAA
P32-1082      ---------- ---------- --------CG GCTTTACCCG CGTTTTTTTC

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1110       1120       1130       1140       1150
Refseq-Chr.1  CAGCCTCCAT GGAATCCTGA CTTCTTTTCC TTGTTATTTC AACTTCTTCC
Refseq-IL-10  CAGCCTCCAT GGAATCCTGA CTTATTTTCC TTGTTATTTC AACTTCTTCC
P19-1082      GGGGAAAARK GGAGACTCGT TTTATC-TCC TGWTGT-CCC CATCTCCAGC
P25-1082      GAGAAAAAAA GAAAATTCGG AAAAMRTCAC TTTRRAAACW GATCTCMAGR
P32-1082      AAGGCCSCTG AGAATTTGGT CTCCTCACCC TACTGTACMC CATCCCCAGC

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1160       1170       1180       1190       1200
Refseq-Chr.1  ACCCCATCTT TTAAACTTTA GACTCCAGCC ACAGAAGCTT ACAACTAAAA
Refseq-IL-10  ACCCCATCTT TTAAACTTTA GACTCCAGCC ACAGAAGCTT ACAACTAAAA
P19-1082      -CTTAWAT-G AAACCTTGWA TMAACTTGCC TTTAGAGTTT CTTTTCGTTG
P25-1082      AAAAGGGT-- GGGCCCTGGA -AMMATAGGC CTTAAAGTAW AT----ARGG
P32-1082      AMATAWATTG AAACTTTGYC TTAACTTGGC TTTAAAGTTT CTTTTAGTTG

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1210       1220       1230       1240       1250
Refseq-Chr.1  GAAACTCTAA GGCCAATTTA ATCCAAGGTT TCATTCTATG TGCTGGAGAT
Refseq-IL-10  GAAACTCTAA GGCCAATTTA ATCCAAGGTT TCATTCTATG TGCTGGAGAT
P19-1082      TAAGCTTKGG TGGC---TGG AGWCAAAAGT TTAAAAGATG GGGTGGAAGA
P25-1082      AAGGGAGGGG RGGM---KGG ARTSAAAAGT TAAAAAGAAG GGGWGGAARA
P32-1082      TAAGCTTCTG GGGC---TGG AGTCAAAATT TAAAAAGATG GGGTGGAAAA

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1260       1270       1280       1290       1300
Refseq-Chr.1  GGT--GTACA GTAGGGTGAG GAAACCAAAT TCTCAGTTGG CACTGGTGTA
Refseq-IL-10  GGT--GTACA GTAGGGTGAG GAAACCAAAT TCTCAGTTGG CACTGGTGTA
P19-1082      ATTTGAAATA ACARGGAAAA GAAGTCAGGA TTCCATGGAG GCTGGATAGG
P25-1082      AGTTGAAATA AYGRGGAAAA GAAGKCRWGC TCTCAGGAAG GSAGGAYAGA
P32-1082      GTTTGAATTA ACRRGGAAAA GAAGKCRGGA TTCCATGGAG GCTGGATAGA

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1310       1320       1330       1340       1350
Refseq-Chr.1  CCCTTGTACA GGTGATGTAA TATCTCTGTG CCTCAGTTTG CTCACTATAA
Refseq-IL-10  CCCTTGTACA GGTGATGTAA CATCTCTGTG CCTCAGTTTG CTCACTATAA
P19-1082      AGGTCCC--- --TTACTTTC CTCTTACCTA TCCCTACTTC CCCCTCCCAA
P25-1082      AGGTCCC--- --TTACTTTC CTKTTACCT- TTCCTAGGTC CCCTTCCMAA
P32-1082      AGGTCCC--- --TTACTTTC CTCTTACCTA TCCCTACTTC CCCTTCCCAA

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                      1360       1370       1380       1390       1400
Refseq-Chr.1  AATAGAGACG GTAGGGGTCA TGGTGAGCAC TACCTGACTA GCATATAAGA
Refseq-IL-10  AATAGAGACG GTAGGGGTCA TGGTGAGCAC TACCTGACTA GCATATAAGA
P19-1082      AGGAGCCTTA SWATTGTTGC ACA------- ---------- ----------
P25-1082      AGGAGTCCTA ATATGGGTGC C--------- ---------- ----------
P32-1082      AGGAGCCTTA SWRGTGTTGC ACA------- ---------- ----------
```

شكل (45): إصطفاف Alignment القواعد النتروجينية في محث الجين 1082- *IL-10* في عينات المصابين بداء السكري– النوع الاول والتسلسل النيكلوتيدي القياسي*

*= عينات المصابين التي درس فيها التسلسل التتابعي هي P19، P25 وP32.

A= الأدنين، T= الثايمين، G= الكوانين، C= السايتوسين. *= مصدر التسلسل التتابعي للدنا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة. الأحرف الملونة تشير إلى وجود طفرات استبدال.

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

```
Alignment: IL-10 -1082 Promoter\Control

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1060       1070       1080       1090       1100
Refseq-Chr.1  TGGGAAGGGG AAGTAGGGAT AGGTAAGAGG AAAGTAAGGG ACCTCCTATC
Refseq-IL-10  -----AGGGG AAGTAGGGAT AGGTAAGAGG AAAGTAAGGG ACCTCCTATC
CO4-1082      ---TCATKTT TTTTAAGGGT TTCCCCAAGG A-AAACTGAA AC-TTCGGAA
CO6-1082      ----TACCTT AAAAAAGGKT TTTCCAAWGA ACACKGGAMA AT-TCCGKTT
CO11-1082     ---TGATGTT ATTCAGGGTT TTCAACGTGS A-ATW-TGGG AT-TT--GTR

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1110       1120       1130       1140       1150
Refseq-Chr.1  CAGCCTCCAT GGAATCCTGA CTTCTTTTCC TTGTTATTTC AACTTCTTCC
Refseq-IL-10  CAGCCTCCAT GGAATCCTGA CTTATTTTCC TTGTTATTTC AACTTCTTCC
CO4-1082      AACTCACTTT AMTGTACWGA ---TTT--CM AGCAAAAGCG GACCTTCGCC
CO6-1082      TCCCCACCCT GSTGTCCRCC ATCTCCRGCA MATGGAAGGG GGCTTCGGAT
CO11-1082     TCCCTCCCTT ASTGTCCACC ATCTTT--GC CATARAARGA AACTTTGRMT

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1160       1170       1180       1190       1200
Refseq-Chr.1  ACCCCATCTT TTAAACTTTA GACTCCAGCC ACAGAAGCTT ACAACTAAAA
Refseq-IL-10  ACCCCATCTT TTAAACTTTA GACTCCAGCC ACAGAAGCTT ACAACTAAAA
CO4-1082      TTAMAAGSCC TTAGAGTTTM T-TTAGGGTG GCGCCT-CAG G--CTGGAGA
CO6-1082      AAAATTGGYY TTAGAGTTTC T-TTTACAGG ACAAAAGCGG GGGMYGGAGT
CO11-1082     AACATTGSCC TTARAGTTTC T-TTCGTTGT ASGCTT-CGG GGGMTGGAGA

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1210       1220       1230       1240       1250
Refseq-Chr.1  GAAACTCTAA GGCCAATTTA ATCCAAGGTT TCATTCTATG TGCTGGAGAT
Refseq-IL-10  GAAACTCTAA GGCCAATTTA ATCCAAGGTT TCATTCTATG TGCTGGAGAT
CO4-1082      AAAAMGTTAA AAAGATGGGR RGGAAGAGTT TRAATTAAYR RGGAAAARAA
CO6-1082      CAAAAGTTAA AAAGATGGGG GGGAAGAAGT TSAATTAACA RGGAAAAGAA
CO11-1082     CAAACTTTAA AAAGATGGGG TGGAAGAGTT TGAATTAACA GGGAAAAGAA

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1260       1270       1280       1290       1300
Refseq-Chr.1  GGTGTACAGT AGGGTGAGGA AACCAAATTC TCAGTTGGCA CTGGTGTACC
Refseq-IL-10  GGTGTACAGT AGGGTGAGGA AACCAAATTC TCAGTTGGCA CTGGTGTACC
CO4-1082      GKYRGKTCCC AATRAGAGAA AAAAAWA--- ---GRAGGTT CTTTACTTTC
CO6-1082      GTCRGGATTC CRGGGGGGST GGCMA----- ----GAKGGT CCKTTGTTTC
CO11-1082     GTCGGGATTC CWTGGAGGCK GGCMA----- ---GGAGGTC CCTTACTTTC

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1310       1320       1330       1340       1350
Refseq-Chr.1  CTTGTACAGG TGATGTAATA TCTCTGTGCC TCAGTTTGCT CACTATAAAA
Refseq-IL-10  CTTGTACAGG TGATGTAACA TCTCTGTGCC TCAGTTTGCT CACTATAAAA
CO4-1082      GTCTTACC-- TWTCCCTACT TCCCCTTCCC AAAGGAGCCT TASAAGTGTT
CO6-1082      GTKGCCCT-- TGAAAGTGCG TCCATGTGCC TSGGGG---T CACAA-----
CO11-1082     CTCTTCCC-- TATCCCTACT TCCCCCTCCC AAAGGAGCCT TASWRGTGGT

              ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1360       1370       1380       1390       1400
Refseq-Chr.1  TAGAGACGGT AGGGGTCATG GTGAGCACTA CCTGACTAGC ATATAAGAAG
Refseq-IL-10  TAGAGACGGT AGGGGTCATG GTGAGCACTA CCTGACTAGC ATATAAGAAG
CO4-1082      GYAC------ ---------- ---------- ---------- ----------
CO6-1082      ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CO11-1082     GCC------- ---------- ---------- ---------- ----------
```

شكل (46): إصطفاف Alignment القواعد النتروجينية في محث الجين 1082- *IL-10* في العينات القياسية والتسلسل النيكلوتيدي القياسي*

*= العينات القياسية التي درس فيها التسلسل التتابعي هي C4، C6 و C11.

A= الأدنين، T= الثايمين، G= الكوانين، C= السايتوسين. *= مصدر التسلسل التتابعي للدنا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة. الأحرف الملونة تشير إلى وجود طفرات استبدال.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

تعد هذه الدراسة من اولى الدراسات التي تناولت التسلسل النيكلوتيدي لمحث جين *IL-10*، لاسيما على الاطفال العراقيين المصابين بداء السكري– النوع الاول. لقد وجد هناك العديد من الطفرات الجينية من نوع الاستبدال في عينات المصابين والعينة القياسية عند مقارنتها مع التسلسل النيكلوتيدي القياسي والمنشور في الموقع الرسمي للمركز الوطني لمعلومات التقانة الأحيائية الاميركي NCBI. قد يكون لهذه الطفرات علاقة بانخفاض او عدم انتاج الحركي الخلوي *IL-10* وذلك لكون لمحث الجين *IL-10* علاقة بارتباط انزيم RNA polymerase II والذي له علاقة بأستنساخ mRNA الخاص بانتاج هذا الحركي الخلوي، ولكن ظهور عدد من طفرات الاستبدال في العينة القياسية قد يكون له علاقة بالتركيب الجيني في مجين العراقيين، علماً بان معظم طفرات الاستبدال في العينة القياسية لم تتطابق مع طفرات الاستبدال في عينة المصابين، مما يستوجب أجراء دراسات أخرى معمقة لغرض فهم وتفسير وجود العديد من طفرات الاستبدال في العينات المدروسة.

يقع جين *IL-10* على الذراع الطويل لكرموسوم رقم 1 في الانسان, وان التعدد الشكلي المظهري قد وصف ضمن منطقة المحث Promoter, متضمنة وجود تعددين شكليين من Microsatellite وثلاث تعددات شكلية ثنائية الأليل Biallelic في المواقع 1082–، 592– و819– من موقع بدء الاستناخ (Eskdale *et al*., 1998; Turner *et al*., 1997). التباينات الفردية في انتاج الحركيات الخلوية تكون مرتبطة بالتعدد الشكلي المظهري الأليلي لجينات الحركيات الخلوية (D'Alfonso *et al*., 2000). تكرار النمط الوراثي Genotype والنمط الفرداني (الأليلي) Haplotype على مستوى عديد التكوين وحيد النيكلوتيدة SNP لمحث جين *IL-10* تظهر توزيعات مختلفة اعتماداً على الانتماء العرقي Ethnicity (Urcelay *et al*.,2004 ;Moraes *et al*., 2003 ; Pyo *et al*.,2003).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وجد تكرار النمط الوراثي في جين *IL-10* المتعدد الأشكال مختلفاً في القوقازيين والأسيويين (D'Alfonso *et al*., 2000; Mok *et al*., 1998)، وان توزيع الأليلات SNP في المجتمع الأسباني كان مشابهاً لبعض القوقازيين (Urcelay *et al*., 2004). التكرار الأليلي للمواقع 1082G/A-، 819C/A- و592C/A- لجين IL-10 درس 128 مريضاً يابانياً مصاباً بداء السكري- النوع الاول و107 شخصاً من الاصحاء, وظهرت تكرارات النمط الفرداني (الأليلي) Haplotype في منطقة المحث Promoter متساوية في كل من عينات المصابين بداء السكري- النوع الاول وعينات الاصحاء, من ناحية أخرى فان النمط الفرداني ATA كان اعلى نسبة في المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول لدى اليابانيين مما هو عليه عند المصابين في شمال اوروبا، وهذه النتائج قد أقترحت بان التعدد الشكلي المظهري لجين *IL-10* في موقع المحث يكون مرتبطاً مع المرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول (Ide *et al*., 2002). بين Tegoshi *et al*., (2002) بان الموقع A/C 592- لجين *IL-10* في منطقة المحث يظهر ارتباط مع التباينات الوراثية السريرية للمرضى المصابين بداء السكري- النوع الاول. التباينات في مناطق المحث لجين *IL-10* تعود إلى الاستعداد الوراثي للإصابة بمرض داء السكري- النوع الاول في الاطفال اليافعين (Reynier *et al*., 2006). نتائج Settin *et al*., (2008) اظهرت اختلافاً معنوياً بين المصابين بداء السكري- النوع الاول وعلاقته بالنمط الوراثي والأليلي في مناطق المحث في الموقع (G/A) 1082- لجين *IL-10* كما انه ليس له علاقة بتاريخ العائلة مع المرض. ان التعدد الشكلي المظهري لجين *IL-10* في مواقع المحث ربما يساهم في ظهور الأعراض السريرية لداء السكري- النوع الاول (Mohebbatikaljahi *et al*., 2009). بين AL-Shehmany *et al*.,(2014) بان هناك ارتباط وثيق بين التعدد الشكلي المظهري في الموقع 1082G/A- في منطقة المحث لجين *IL-10* وداء السكري- النوع الاول.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الاستنتاجات Conclusions

1. أظهرت الحركيات الخلوية IFN-γ وTGF-β تراكيز عالية لدى المصابين بداء السكري– النوع الأول بالمقارنة مع العينات القياسية، كما أن لهذه الحركيات الخلوية ارتباطاً موجباً مع المرض, بينما الحركيات الخلوية IL-4، IL-10 وIL-17A ليس لهما أية تأثيرات موجبة في الأشخاص المصابين بداء السكري– النوع الأول.
2. هناك علاقة بين ارتفاع تركيز الحركي الخلوي TGF-β ووقت حدوث الإصابة بالمرض بعد مرور سنة أو أكثر، بينما أنخفض التركيز عند الأطفال الذين حدثت الأصابة بالمرض لديهم لأقل من سنة.
3. أن الأليل A والنمطين الوراثيين AA وTA لجين *IFN-γ* +874 لهم أرتباط معنوي مع الجزء المسبب لداء السكري– النوع الأول, بينما الأليل T والنمط الوراثي TT قد أظهرا ارتباطاً مع الجزء الوقائي من خطر الإصابة بالمرض.
4. أن الأليل C والنمط الوراثي CC لجين *IL-4* -590 لهما ارتباط معنوي مع داء السكري– النوع الأول, بينما الأليل T والنمطين الوراثيين TT وCT قد أظهروا ارتباطاً مع الجزء الوقائي من المرض, ولم يظهر النمط الوراثي TT أية نسبة لدى عينات المرضى وكانت النسبة مساوية إلى صفر.
5. أن الطفرتين 592– و 1082- لمحث الجين *IL-10* موجودة في جميع عينات المصابين والعينات القياسية.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

6. أن الأليل T والنمط الوراثي TT لطفرة 869+ Codon 10 في جين *TGF-β* أظهرا تكراراً معنوياً مرتبطاً مع داء السكري– النوع الأول, وأن الأليل C والنمط الوراثي CT قد أظهرا تكراراً معنوياً مرتبطاً مع الوقاية من خطر الإصابة بداء السكري– النوع الأول، كما أن الأليل G والنمط الوراثي GG للطفرة 915+ Codon 25 في الجين نفسه قد أظهرا تكراراً معنوياً مرتبطاً مع خطر داء السكري– النوع الأول, بينما الأليل C والنمط الوراثي CC و GC أظهرا أرتباط مع الجزء الوقائي من المرض.
7. أن استعمال البادئ الخاص بطفرة 915+ Codon 25 في جين *TGF-β1* قد ضخم قطع دنا أخرى في مجين عينات المصابين ولم تظهر هذه القطع في مجين العينات القياسية.
8. أظهر التسلسل التتابعي لمحث الجين *IL-10* العديد من طفرات الاستبدال في عينات المصابين والعينات القياسية وأن عدداً من هذه الطفرات ربما ليس لها علاقة بانخفاض تركيز الحركي الخلوي IL-10 وأنما قد تكون حالة طبيعية خاصة بمجين العراقيين ولا توجد دراسات أخرى في العراق حول جين *IL-10* وتسلسله التتابعي تسند نتائج هذه الدراسة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

التوصيات Recommendations

1. الاعتماد على النمط الوراثي TA لجين 874+ *IFN-γ* والنمط الوراثي CC لجين 590- *IL-4* والنمطين الوراثيين TT وGG لجين *TGF-β1* كانماط وراثية مرتبط مع زيادة خطر الإصابة بداء السكري– النوع الأول.
2. يمكن اعتماد الكشف عن مستوى تركيز *TGF-β1* في تحديد وقت حدوث الإصابة بداء السكري- النوع الأول, لوجود علاقة ما بين ارتفاع مستوى تركيز *TGF-β1* ووقت حدوث الإصابة بالمرض.
3. اجراء دراسات وراثية أخرى لقطع الدنا التي ظهرت عند اجراء الترحيل الكهربائي للجين *TGF-β1* لغرض معرفة نوع وموقع الطفرة في مجين المصابين عن طريق اجراء التسلسل التتابعي لهذه القطع ومقارنتها مع التسلسل النيكلوتيدي القياسي الموجود في بنك الجينات والمنشور في بعض المواقع العالمية.
4. اجراء دراسات التسلسل التتابعي للجينات المدروسة ومقارنتها مع بنك الجينات لغرض الحصول على معلومات أضافية عن مجين العراقيين لاسيما الجينات التي لها علاقة بالأمراض الوراثية.
5. رفع عدد العينات الى 50 لكي تعتمد من قبل بنك الجينات او المواقع كـ NCBI كبيانات معتمدة للمجتمع العراقي وممثلة له.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

REFERENCES

Abbasi, P., Amiri, F. A. and Sayahpour, A. (2012). TGF-*β* and IL-23 gene expression in unstimulated PBMCs of patients with diabetes, Endocrine. 41(3):430–434.

Abdullah M. A. (2005). Epidemiology of type I diabetes mellitus among Arab children. J. Saudi Med; 26(6):911-917.

Ahlawat, A., Sharma, R., Maitra, A., Roy, M. and Tantia, M. S. (2014). Designing, optimization and validation of tetra-primer ARMS PCR protocol for genotyping mutation in caprine Fec genes. Meta. Genet. J. 2:439-449.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002). Molecular Biology of The cell. 4th edition. New York. Garland Science. USA.1-75.

Al-Faradhi, H, Q. (2015). Study of some immunological parameters in Iraqi patients with multiple sclerosis.M.SC. thesis. Dep.biol. Coll Educ pure sci. (Ibn Al-Haitham). Univ. Bag.1-114.

Alizadeh, B. Z., Hanifi-Moghaddam, P., Eerligh, P., Slik, A. R., Kolb, A., Kharagjitsingh A. V., Arias, A. M., Ronkainen, M., Knip, M., Bonfanti, R., Bonifacio, E., Devendra, D., Wilkin, T., Giphart, M. J., Koeleman, P. C. and Mandrup, T. (2006). Association of interferon and interleukin-10 genotypes and serum levels with partial clinical remission in type1 diabetes. J. Compilation Soc. Immunol. Clin. Exp. Immunol. 145:480–484.

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.

Al-Shehmany, A. S., El-Kafoury, A. A., Haroun, M. A. and Embaby, A. M. (2014). Contribution of *IL-10* (SNP -819 C/T and SNP -1082 G/C) polymorphism variants to the risk of type 1 diabetes in Egyptian population. J. Biotechnol. 13(1):54-60.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Alviggi, L., Johnston, C., Hoskins, P. J., Tee, D. E. H., Pyke, D. A., Leslie, R. D. G. and Vergani, D. (1984). Pathogenesis of insulin-dependent diabetes: a role for activated T lymphocytes. Lancet. 2:4-6.

Aly, H. and Gottlieb, P. (2009). The honeymoon phase: Intersection of metabolism and immunology. J. Curr. Opin. Endocrinol. Diab. Obes. 16(4):286-292.

Akalin, E. and Murphy, B.(2001). Gene polymorphisms and transplantation. J. Curr. Opin. Immunol; 13(5)**:**572-6.

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. J. Allergy Clinc. Immunol. 127:701-721.

American Diabetes Association. (2004). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 31 supplement. 1.S10.

American Diabetes Association. (2008). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 27 supplement. 1.S60.

American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 33 supplement.1.S062.

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.

Amrani, A., Verdaguer, J., Thiessen, S., Bon, S. and Santamaria, P. (2000). IL-1α; IL-1β and IFN-γ mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic $CD4^+$ T-lymphocytes. J. Clin. Invest. 105:459-468.

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. Iran. J. 12(2):100-104.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Arif, S., Moore, F., Marks, K., Bouckenooghe, T., Dayan, C., Planas, R., Vives-Pi, M., Powrie, J., Tree, T., Marchetti, P., Huang, C., Gurzov, E., Pujol-Borrell, R., Eizirik, D. and Peakman, M. (2011). Peripheral and Islet Interleukin-17 Pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-Mediated b-Cell death. J. Diabetoloyg. 60:2112-2119.

Atkinson, M. A. and Maclaren, N. K. (1994). The pathogenesis of insulin-dependent diabetes. Diabetes/Metabolism Rev. 14(1):31-67.

Awad, M. R., El-Gamel, A., Hasleton, P., Turner, D. M., Sinnott, P. J. and Hutchinson, I. V. (1998). Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. Transplantation. 66:1014–1020.

Azar, S. T., Salti, I., Mira ,S., and Major, A. (2000). Alterations in Plasma transforming growth factor b in Normoalbuminuric Type 1 and Type 2 diabetic patients.J. Clin. Endocrinol. Metabol. 85(12):4680-4682.

Babel, N., Gabdrakhmanova, L., Hammer, M., Schoenemann, C., Skrypnikov, V., Poliak, N., Volk, H. and Reinke, P. (2006). Predictive value of cytokine gene polymorphisms for the development of end-stage renal disease. J. Nephrol. 19:802-807.

Bach, J. F. (1994). Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. Endocr. Rev.15(4):16-42.

Bakker, S. F., Tushuizen, M. E., Blomberg, M. E., Mulder, C. J. and Simsek, S. (2013). Type 1 diabetes and celiac disease in adults glycemic control and diabetic complication. Acta Diabetologic J. 50(3):319-324.

Barrett, J. C., Clayton, D. G., Concannon, P., Akolkar, B., Cooper, J. D., Erlich, H. A., Julier, C., Morahan, G., Nerup, J., Nierras, C., Plagnol, V., Pociot, F., Schuilenburg, H., Smyth, D. J., Stevens, H., Todd, J. A., Walker, N. M. and Rich, S. S. (2009). Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. Nature Genet. 41(6):703-7.

Barton, D., Foellmer, B., Du, J., Tamm, J., Derynck, R. and Francke, U. (1988). Chromosomal mapping of genes for transforming growth factor beta2 and

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

beta3 in man and mouse: dispersion of TGF-beta gene family. Oncogene Res. 3(4):323-331.

Bazzaz, J. T., Amoli, M. M., Taheri, Z., Larijan, B., Pravica, V.and Hutchinson, I. V. (2014). *TGF*-β1 and *IGF*-I gene variation and genetic susceptibility in type 1 diabetes and its microangiopathic complications. J. Diabetes and Metabolic Disorders. 13(46):45-53.

Bell, R. (2009). Diabetes in Non-Hispanic White Youth. Diabetes Care. 32(S2):S101-111.

Belle, T. V., CoppIeters, K. and Herrath, M. V. (2011). Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. Amer. Physiol. Soc. 91:79–118.

Bergerot, I. and Fabien, N. (1994). Oral administration of human insulin to NOD mice generates CD4+T cell that suppress adoptive transfer of diabetes. J. Autoimmune. 7(7):655-663.

Berwary, N. J., Majid, F., Hamdan, S., Khangholi, S. and Waheda, N. (2013).Viruses induce TypeI diabetes mellitus in the presence of HLA-DR3,DR4 genes. J. Sci. Res. 18(7):916-925.

Betterle, C. and Zanette, F. (1984). Clinical and subclinical organ-specific autoimmune manifestations in type1 (insulin-dependent) diabetic patient and their fist-degree relatives. Diabetology. 26(6):431-436.

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.

Bingley, P., Christie, M. and Bonifacio, E. . (1994). Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relative. Diabetes. 43:1304-1310.

Blobe, G. C., Schiemann, W. P. and Lodish, H. F. (1998). Role of transforming growth factor beta in human disease. N. Engl. J. Med. 342:1350–1358.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Border, W. A. and Ruoslahti, E.(1992). T transforming growth factor-β in disease: the dark side of tissue repair. Clinc. Invest. J. 90:1-7.

Borg, H., Gottsater, A., Landin-Olsson, M., Fernlund, P.and Sundkvist, G. (2001). High levels of antigen-specific islet antibodies predict future beta-cell failure in patients with onset of diabetes in adult age. J Clini. Endocrinol. Metab.86:3032–3038.

Boyman, O., Letourneau, S., Krieg, C. and Sprent, J. (2009). Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. European J. Immunol. 39(8):2088-2094.

Campbell, L., Wong, G. H., Schrader, J. W. and Harrison, L. C. (1985). Interferon-gamma enhances the expression of the major histocompatibility class I antigens on mouse pancreatic beta cells. J. Diabetes. 34:1205–1209.

Cantor, M. J., Nickerson, P. and Bernstein, C. N. (2005). The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. Am. J. Gastroenterol.100:1134–1142.

Cernea, S. and Herold, K. C. (2010). Monitoring of antigen-specific CD8 T cells in patients with type 1 diabetes treated with anti-CD3 monoclonal antibodies. Clin. Immunol.134:121-129.

Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A. and Seve, M. (2004). Identification and cloning of a beta-cellspecific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. Diabetes. 53(9):2330-2337.

Choo, S. Y. (2007). The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. Yonsei Med. J. 48:11-23.

ChromasPro version 1.6. (2012). Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia.

Cilensek, L., Hercegovac, A., Starcevic, J., Vukojevic, K., Babic, M. and Zivin, A. (2011). Polmorphism of interleukin-4, interleukin-10 and interleukin-12B gene and diabetes retinopathy. J. Biol. 6(4):558-564.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Clark, M. S. (1997). In: Plant Molecular Biology - A Laboratory manual, pp. 305-328, Springer-Verlog Berlin Heidelberg, New York.

Cooke, D. W. and Plotnick, L. (2008). Type 1 diabetes mellitus in pediatrics. Pediatr. Rev. 29:374-385.

Cope, A. P., Liblau, R. S., Yang, X. D., Congia, M., Laudanna, C., Schreiber, R. D., Probert, L., Kollias, G. and Mcdevitt, H. O. (1997). Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling. J. Exp. Med. 185(9):1573–1584.

Couri, C. E., Foss, M. C. and Voltarelli, J. C. (2006). Secondary prevention of type1 diabetes mellitus stopping immune destruction and promoting β-cell regeneration.Brazilian J. Med. Biol. Res. 39(10):1271-1280.

Curfs, J., Meis, J. F. and Korstanje, J. A. (1997). A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. Clini. Microbiol. Rev. 10(2):742-780.

Dabelea , D., Pihoker, C., Tlaton, W., Agostin, B., Fujimoto, W., Klingensmith, G., Lawrence, J., Linder, B., Marcovina, S., Mayer-Davis, E., Imperatore, G. and Dolan, L. (2011). Etiological approach to characterization of diabetes type. Diabetes Care. 34(7):1628–1633.

D'Alfonso, S., Rampi, M., Bocchiom, D., Colombo, G., Scorza-Smeraldim, R. and Momigliano-Richardi, P. (2000). Systemic lupus erythematosus candidate genes in the Italian population evidence for a significant association with interleukin-10. J. Arthritis. Rheum. 43(1):120-128.

Daneshamandi, S., Pourfathollah, A., Arababadi, M. K., Hassanshahi, G., Razaeian, M. and Asiabanha, M. (2008). Evaluation of relation between IL-4 and IFN- γ polymorphism and type 2 diabetes. J. Maz. Univ. Med. Sci. 18(66):35-41.

Dang, M., Rockell, J., Wagner, R., Wenzlau, J. M., Yu, L., Hutton, J. C., Gottlieb, P. A. and Davidson, H. W. (2011). Human type 1 diabetes is associated with T cell autoimmunity to zinc transporter 8. J. Immunol. 186(10):6056-6063.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. and Liu, Z. G. (2000). The Distinct Roles of Traf2 and Rip in Ikk Activation by Tnf-R1: Traf2 Recruits Ikk to Tnf-R1 While Rip Mediates Ikk Activation. Immunity. 12 (4):419-429.

Dinarello, C. A. (2007). Historical Review Cytokines. J. Immunol. 37(suppl 1):S34-S45.

Doan, T., Melvold, R., Viselli, S. and Waltenbaugh, C. (2008). Lppincotts IIIustrated Review: Immunology, Lippincott Williams and Wilkins. pp 67.

Dong, C. (2008). Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. J. Immunol. 226:80-86.

Du, W. F., Wong, S., Li, M. O., Peng, R., Qi, H., Flaveii, R. A., Sherwin, R. and Wen, L. (2006). TGF-β Signaling is required for the function of insulin-reactive T regulatory cells. J. Clin. Investig. 116(5):1360-1370.

Duta-Cornescu, G., Simon-Gruita, A., Constantin, N., Stanciu, F., Dobre, M., Banica, D.,Tuduce, R., Cristea, P. and Stoian,V. (2009). A comparative study of ARMS-PCR and RFLP-PCR as methods for rapid SNP identification. Biotechnological. 14(6):4845-4850.

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. Genet. Immun. 5(1):36-40.

Eizirik, D. L., Colli, M. L. and Ortis, F. (2009). The role of inflammation in insulitis and betacell loss in type 1 diabetes. Nat. Rev. Endocrinol. 5:219–226.

Eizirik, D. L. and Darville, M. I. (2001). Beta-Cell apoptosis and defense mechanisms: Lessons from Type 1 diabetes. Diabetes. 50(1):S64-S69.

Eizirik, D. L. and Mandrup-Poulsen, T. (2001). A choice of death: the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. J. Diabetol. 44(12):2115–2133.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Elgert, K. D., (2009). Immunology: Understanding the immune system. (2009). 2nd edition. John Wiley and Sons. pp.1-726.

EL-Kafoury, A., Haroun, M., Embaby, A. and Dawoods, A. S. (2014). The association of polymorphic sites in some genes with type 1 diabetes mellitus in a sample of Egyptian children. Egyptian J. Med. Human Genet. 15:265-272.

Elsaid, A., Helaly, M. A., Hatata, E., Fouda, E. Z. and Settin, A. (2012). *TNF-a* -308 and *INF-γ* +874 gene polymorphisms in relation to susceptibility and severity of type 2 diabetes mellitus among Egyptian cases. J. Gen. Med. 9(3):173-177.

El-Sherbini, S. M., Shahen, S. M., Mosaad, Y. M., Abdelgawad, M. S. and Talaat, R. M. (2013). Gene polymorphism of transforminggrowth facter-β1 in Egyptian patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy.J. Acta Biochim. Biophys. Sin. 45:330–338.

Emamaullee, J. A., Davis, J., Merani, S., Toso, C., Elliott J. F., *et al*. (2009). Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. J. Diabetes. 58:1302–1311.

Erlander, M. G., Tillakaratne, N. J. Feldblum, S., Patel, N. and Tobin, A. J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. Neuron. **7**(1):91-100.

Eskdale, J., Gallagher, G., Verweij, C. L. Keijsers, V., Westendorp, R. G. and Huizinge, T. W. (1998). Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. J. Pro. Nat. Acad. Sci. USA. 95:9465-9470.

Faustman, D. L and Davis, M. (2009).The primacy of CD8 T lymphocytes in type1 diabetes and implications for therapies. J. Mol. Med.87(12):1173-1178.

Feghali, C. A. and Wright, M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. Frontiers in Biosci. J. 2(1):12-26.

Ferraro, A., Socci, C., Stabilini, A. and Vallem, A. (2011). Expansion of Th17 cell and functional defects in T regulatory cell are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. J. Diabetes. 60(11):2903-2913.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Fidan, I., Yuksel, S., Kalkanci, A., Imir, T. and Kustimus, S. (2005). Evaluation of cytokines in rats with type1 diabetes mellitus. Med. Microbiol. 100(8):883-887.

Forouhi, N. G. and Wareham, N. J. (2006). Epidemiology of diabetes. Medicine. 34(2):57-60.

Foulis, A. K., McGill, M. and Farquharson, M. A. (1991). Insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man: Macrophages, lymphocytes, and interferon-γ containing cells. J. Pathol. 165(2): 97-103.

Fujii, D., Brissenden, J. E., Derynck, R. and Francke, U. (1986). Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. Somat Cell Mol. Genet.12(3):281–288.

Gaffen, S. L. (2009). Structure and signaling in the IL-17 receptor family. Nature Rev. Immunol. 9(8):556-567.

Gianani, R. and Eisenbarth, G. S. (2005). The stages of type 1A diabetes: 2005. Immunol. Rev. 204:232–49.

Gleissner, C. A., Zastrow, A., Klingenberg, R., Kluger, M. S., Konstandin, M., Celik, S., Haemmerling, S., Shankar, V., Giese, T., Katus, H. A. and Dengler, T. J. (2007). IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells. Eur. J. Immunol. 37(1):177–192.

Gomes, K. B., Rodrigues, K. F. and Fernander, A. P. (2014). Role of transforming growth factor-β in diabetes nephropathy. Hindawi Pub.Corp. 2014:1-6.

Green, A., Gale, E. A. and Patterson, C. C. (1992). Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the Eurodiabetes study. Lancet. 339(8798):905-909.

Greidinger, E. L., and Hoffman, R. W. (2001).The appearance of UI RNP antibody specificities in seguential autoimmune human antisera follows a characteristic order that implicates the UI 70-KD and B/B protein as predominant UI RNP immunogens. Arthritis Rheum. 44(2):368-375.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Grieco, F. A., Moore, F., Vigneron, F., Santin, I., Villate, O., Marselli, L., Rondas, D., Korf, H., Overbergh, L. and Dotta, L. (2014). 1L-17A increases the expression of proinflammatory chemokines in human pancreatic islets. J. Diabetologia 57(3):502–511.

Hagopian, W. A., Michelsen, B., Karlsen, A. E., Larsen, F., Moody, A., Grubin, C. E., Rowe, R., Petersen, J., McEvoy, R. and Lernmark, A. (1993). Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M(r) rather than the 67,000-M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase. Diabetes. 42(4):631-636.

Hagopian, W., Sanjeevi, C. and Kockum, L. (1995).Glutamate decarboxylase-insulin and islet cell antibody and HLA typing to detect diabetes in a general population based study of swedish children. J. Clin Invest. 95(4):1505-1511.

Hakbani, M. (2002). The study of the immunological with Type I diabetes in Saudi Children.Ph.D. Thesis. University of King Saud. College of Medicine. King Saud. K. A. S. pp:1-235.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Halminen, M., Simell, O., Knip, M. and Ilonen, J. (2001). Cytokine expression in unstimulated PBMC of children with type 1 diabetes and subjects positive for diabetes associated autoantibodies. J. Immunol. 53(5):510-513.

Hardy, M. P., Owczarek, C., Jermiin, L., Ejdeback, M. and Hertzog, P. (2004). Characterization of the type1 interferon locus and identification of novel genes. J. Genomics. 84(2):331-345.

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.

Harrison, L. C. and Dempsey-Collier, M. (1996). Aerosol insulin induce regulatory CD8+ gamma delta T cell that prevent murine insulin dependent diabetes. J. Exp. Med. 184(6):2167-2174.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Hartwall, L., Honkanen, J., Salo, H., Nieminen, J., Luopajarvi, K., Harkonen, T., Veijola, R., Simell, O., Ilonen, J., Peet, A., Tillmann, V., Knip, M. and Vaarala. Q. (2015). Th1/Th17 plasticity is a marker of advanced β cell autoimmunity and impaired glucose tolerance in Humans. J. Immunol. 194:68-75.

Hasham A. and Tomer Y. (2011). The recent rise in the frequency of type 1 diabetes: who pulled the trigger?. J. Autoimmun.37(1):1–2.

Hayashi, R., Tahara, T., Shiroeda, H., Matsue, Y., Minato, T., Nomura, T., Yamada, H., Saito, T., Matsunaga, K., Fukuyama, T., Hayashi, N., Otsuka, T., Fukumura, A., Nakamura, M., Tsutsumi, M., Shibata, T. and Arisawa, T. (2012). Association of Genetic Polymorphisms in *IL17A* and *IL17F* with Gastro-Duodenal Diseases. J Gastrointestin Liver Dis. 21(3):243-249.

He, J., Xie, P., Luo, D., Sun, C., Y.Zhang, Y. and Liu, F. (2014). Role of immune dysfunction in pathogenesis of type 1 diabetes mellitus in children. Asian Pacific J. Trop. Medici.17(10):823-826.

Hedman, M., Ludviqsson, J. and Faresjo, M. (2006). Nicotine amide reduces high secretion of IFN-y in high risk relative even though it does not prevent type 1 diabetes. Interferon Cytokine Results. 26(4):207-213.

Herder C, M. Carstensen , and Ouwens, D. (2013). Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. Diabetes Obes. Metabol. 15(3):39–50.

Hiersch, M. D. (1999). Type1 Diabetes mellitus and the use of flexible insulin egimens. Amer. Family Physician. 60(8):2343-2352.

Holmberg, H., Vaarala, O., Sadauskaite-Kuehne, V., Ilonen, J., Padaiga, Z. and Ludvigsson, J. (2006). Higher prevalence of autoantibodies to insulin and GAD65 in Swedish compared to Lithuanian children with type 1 diabetes. Diabetes Res. Clini. Pract. 72(3):308-314.

Holthofer, D. H. (2000). Role of IA-2 antibodies in clinical and preclincal type 1 diabetes. PhD. Thesis. Oulu University.p1-73. Finland.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Honkanen, J., Nieminen, J., Gao, R., Luopajarvi, K., Salo, H., Ilonen, J., Knip, M., Otonkoski, T. and Vaarala, H. (2010). IL-17 immunity in human type 1 diabetes. J. Immunol. 185:1959–1967.

Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R. C., Bruford, E. A., Khodiyar, V. K., Lush, M. J. Povey, S., C. C. Talbot, C. C., Jr., Wright, Jr. M. W., Wain, H. M., Trowsdale, J., Ziegler, A. and Beck, S. (2004). Gene map of the extended human MHC. Nature Rev. Genet. 5(12):889-899.

Hummel, M., Bonifacio, E., Schmid, S., Walter, M., Knopff, A. and Ziegler, A. G. (2004). Early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type1 diabetes in offspring of diabetic parents. Ann. Inter. Med. 140:882-886.

Hussain, M. J., Peakman, M. and Gallat, H.(1996). Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. J. Diabetologia. 39:60-69.

Ichinose, K., Kawasaki, E., Eguchi, K. (2007). Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes mellitus and potential relevance to diabetes nephropathy. J. Nephrol. 27:554-564.

Ide, A., Kawasaki, E., Abiru, N., Sun, F., Takahashi, R., Kuwahara, H., Fujita, N., Kita, A., Oshima, K., Sakamaki, H., Uotani, S., Yamasaki, H., Yamaguch,Y. and Eguchi, K. (2002). Genetic association between interleukin-10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-onset. J. Hum. Immunol. 63(8):690-695.

Ilonen, J., Sjoroos, M., Knip, M., Veijola, R., Simell, O., Akerblom, H.K., Paschou, P., Bozas, E., Havarani, B., Malamitsi-Puchner, A., Thymelli, J., Vazeou, A. and Bartsocas, C. S. (2002). Estimation of genetic risk for type 1 diabetes. Amer. J. Med. Genet. 115(1):30-36.

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.

Jaidane, H. and Hober, D. (2008). Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of Type1 diabetes. J. Diabetes.10:5-10.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Jain, R., Tartar, D., Gregg, R., Divekar, R., Bell, J., Lee, L., Yu, P., Ellis, J., Hoeman, C., Franklin, C. and Zaghouani, H. (2008). Innocuous IFN gamma induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. J. Exp. Med. 205(1):207–218.

Jasem, M. A. (2013). Autoantibodies and cytokines levels in type1 diabetes patients. Iraqi Postgrad. Med. J. 12(3):351-358.

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(5):385-393.

Jin, W. and Dong, C. (2013). IL-17 Cytokinesin immunity and inflammation. Emerging Microbes and Infection. 60(18):1-5.

Joseph, J., Bittner, S., Kaiser, F., Wiend, H. and Kissler, S. (2011). IL-17 Silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes. J. Immunol. 188(1):216-221.

Jung, M. R., Min, Y. L., Pseung, P. Y. and Ho, J. H. (2010).“High glucose regulates cyclin D1/E of human mesenchymal stem cells through TGF-β1 expression via Ca2+/PKC/MAPKs and PI3K/Akt/mTOR signal pathways,”. J. Cellular Physiol. 224(1):59–70.

Kallmann, B., Huther, M., Tubes, M., Feldkamp, J., Bertams, J., Gries, A., Lampeter, E. and Kolb, H. (1997). Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in graves diseases. J. Diabetes. 46(2):237-243.

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(2):171-178.

Kaprio, J., Tuomilehto, J., Koskenvuo, M., Romanv, K., Reunanen, A., Eriksson, J., Stengard, J. and Kesaniemi, Y. (1992). Conordance for type 1 (insulin

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

dependent)diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. Diabtology.nov. 35(11):1060-1070.

Karlson, A. E., Pavlovic, D. and Nielsen, K. (2000). Interferon-γ induce interleukin-1 converting enzyme expression in pancreatic islets by an interferon regulatory factor-1 dependent mechanism. J. Clini. Endocrinol. Metabolism. 85: 830-836.

Karvonen, M. Viik-Kajander, M., Moltchanova, E., Libman, I., LaPorte, R. and Tuomilehto, J. (2000). Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Care. 23:1516-1526.

Katavetin, P. (2009). Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. New England J. Medic. 361(14):1410-1411.

Kaur, K., Dhingra, S., Slezak, J., Sharma, A. K., Bajaj, A. and Singal, P. K. (2009). Biology of TNF-α and IL-10, and their imbalance in heart faiure. Heart Failure Rev. 14:113-123.

Kawaguchi, M., Adachi, M., Oda, N., Kokubu, F. and Huang, S. K. (2004). IL-17 cytokine family. J. Allergy Clin. Immunol. 14:1265-1274.

Kelly, M. A., Mijovic, C. H. and Barnett, A.H. (2001). Genetics of type 1 diabetes. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol Metab.15(3): 279-291.

Khazai, M. H., Afshari, B., Khazai, J., Akbarzadeh, J., Khazai, L., Abbaszadegan, M. R. and Khadivizand, F. (2007). IL-4 and interferon gamma in recently diagnosed type I diabetes, a cases-control study. Atherosclerosis J. 3(1):1-7.

Kikodze, N., Pantsulaia, I., Rekhviashvili, K., Iobadze, M. and JAkhutashvili, N. (2014). Cytokines and T regulatory cell in the pathogenesis of type1 diabetes. Georgian Med. News J. 222:29-35.

Kim,Y. G., Ihm, C., Lee, T. W., Jeong, K. H., Moon, J. Y., Chung, J., Kim, S. K. and Kim,Y. K. (2012). Association of genetic polymorphisms of interleukin with new-onset diabetes after transplantation in renal transplantation. Transplantation. 93(9):901-907.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Kimpimaki, T., Kupila, A., Hamalainen, A. M., Kukko, M., Kulmala, P., Savola, K., Simell, T., Keskinen, P., Ilonen, J., Simell, O. and Knip, M. (2001). The first signs of beta-cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: the Finnish Type 1 diabetes prediction and prevention study. J. Clinic. Endocrinol. Metabol. 86(10):4782-4788.

Klein, J. and Sato, A. (2000). The HLA system. First of two parts. N. Engl. J. Med. 343:782-786.

Knip, M., Kukko, M., Kulmala, P., Veijola, R., Simell, O., Akerblom, H. K. and Ilonen, J. (2002). Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA-defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes. Amer. J. Med. Genet. 115(1):48-54.

Kolls, J. K. and Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity.21:467–476.

Kondrashova, A., Reunanen, A., Romanov, A., Karvonen, A., Viskari, H., Vesikari, T., Ilonen, J., Knip, M. and Hyoty, H. (2005). A six-fold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. Ann. Med. 37(1):67-72.

Kukreja, A. and Maclaren, N. (1999). Autoimmunity and diabetes. J. Clinical. Endocrinol. Metabolism. 84: 4371-4378.

Kulmala, P., Savola, K., Reijonen, H., Veijola, R., Vahasalo, P., Karjalainen, J., Tuomilehto-Wolf, E., Lionen, J., Tuomilehto, J., Akerblom, H. and Knip, M. (2000). Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of Type1 diabetes in Siblings of affected children. Diabetes.49:48-58.

Kyvik, K. O., Nystrom, L., Gorus, F., Songini, M., Oestman, J., Castell, C., Green, A., Guyrus, E., Ionescu-Tirgoviste, C., McKinney,P. A., Michalkova, D., Ostrauskas, R. N. and Raymond, T. (2004). The epidemiology of Type 1 diabetes mellitus is not the same in young adults as in children. Diabetologia. 47:377–384.

Lammi, N., Karvonen, M. ,Tuomilenhto, J. (2005). Do microbes have a causal role in type1 diabetes. Sci. Monit. 11(3):63-69.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Lan, H. Y. (2012). Transforming growth factor-β/ Smad signalling in diabetes nephropathy. Pharmacol. physiol. J. 39(8):731-738.

Lan, M. S., Wasserfall, C., Maclaren, N. K. and Notkins, A. L. (1996). IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93(13):6367-6370.

Landin-Olsson, A., Karlsson, G., Dahlauist, L., Blom, A., Lerumark, and Sundkrist. G. (1989). Islet cell and other organ-specific autoantibody in all children developing Type1 diabetes mellitus in Sweden during one year and in matched control children. Diabetologia J. 32:(6):387-395.

Lee, H. S. (2013). Pathogenic role of TGF-β in diabetes nephropathy. Diabetes and Metabolism J.S9:1-7.

Leslie, R. D., Atkinson, M. A. and Notkins, A.L. (1999). Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulindependent) diabetes. Diabetologia.42(1):3-14.

Levisetti, M. G., Suri, A., Petzold, S. J. and Unanue, E. R. (2007). The insulin specific T cells of nonobese diabetic mice recognize a weak MHC-binding segment in more than one form. J. Immunol. 178:6051–6057.

Li, M. O. and Flavell, R. A. (2008a). Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. J. Immunity. 28:468-476.

Li, M. O. and Flavell, R. A. (2008b). TGF-beta: a master of all T cell trades. J. Cell. 134:392-404.

Li, M.O., Sanjabi, S. and Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and independent mechanisms. J. Immunity. 25(3):455-471.

Li, M., Song, L. and Qin, x. (2014). Advance in the cellular immunology pathogenesis of type 1 diabetes. J. Cell. Mol. 18(2):749-758.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Lieberman, S. M., Evans, A. M., Han, B., Takaki, T., Vinnitskaya, Y., Caldwell, J. A., Serreze, D. V., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Nathenson, S. G., Santamaria, P. and DiLorenzo, T. P. (2003). Identification of the Cell Antigen targeted by a prevalent population of pathogenic $Cd8^{+}$ T Cells in autoimmune diabetes. Proc.Nat. Acad. Sci. USA.100 (14):8384-8388.

Lindley, S., Dayan, C. and Bishop, A.(2005). Defective suppressor function in CD4+, CD25+, T cells form patients with type 1 diabetes. J. Diabetes. 54:92-99.

Loukovaara, S., Robciuc, A. and Holopainen ,J. (2013). Ang-2 upregulation correlates with increased levels ofMMP-9, VEGF, EPO and TGFβ1 in diabetic eyes undergoing vitrectomy," Acta Ophthalmologica. 91(6):531–539.

Maahs, D., West, N., Lawrence, J., Mssa, M. and Mayer-Davis, E.(2010). Epidemiology of type 1 diabetes. Endocrinol Metab Clin North Am. 39(3):481-497.

Marner, B., Agner ,T., Binder, C., Lernmark, A., Nerup, J., Mandrup-Poulsen, T. and Walldorffm S.(1985). Increased reduction in fasting C-peptide is associated with Islet cell antibodies in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. J. Diabetologia. 28(12):875-880.

Marwaha, A., Crome, S., Panagiotopoulos, C., Berg, K., Qin, H., Ouyang, Q., Xu, L., Priatel, J., Levings, M. and Tan, R.. (2010). Cutting edge: increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. J. Immunol. 185:3814–3818.

Masood, M., Salehi, I., Sheykh, N., Vojgani, M., Rajab, A. and Mssoud, A.(2012). Survey the single nucleotide polymorphism of TGFβ at codon 25 in type1 diabetes patients. J. Med. Sci.138(2):1-6.

Mauer, S. M., Steffes, M. W. and Ellis, E. N. (1984). Structural functional relationships in diabetic nephropathy. J. Clini. Investigation. 74(4):1143–1155.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Metcalfe, K. A., Hitman, G. A., Rowe, R. E., Hawa, M., Huang, H., Timothy, N, Stewart, T. and David, R. (2001).Concordance for Type1 diabetes in identical twins is affected by insulin genotype. Diabetes Care. 24:838-842.

Ming, O. L., Richard, A. and Flavell, A. (2008). TGF-β A master of all T cell trades. INH J. 134(3):392-404.

Miossec, P., Korn, T. and Kuchroo,V. (2009). Interleukin-17 and 17 Helper T cell. J. Medicin. 361(9):888-898.

Mohebbatikaljahi, H., Menevse, S., Yetkin, I. and Demirci, H. (2009). Study of interleukin-10 promoter region polymorphisms (-1082A/G, -819T/C and -592A/C) in type 1 diabetes mellitus in Turkish population. J. Genet. 88(2):245-248.

Mok, C. C., Lanchbury, J. S., Chan, D. W. and Lau, C. S. (1998). Interleukin-10 promoter polymorphism in southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. J. Arthritis. Rheum. 41:1090-1095.

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu. Rev. Immunol. 19:683–765.

Moraes, M. O., Santos, A. R., Schonkeren, J. J., Vanderborght, P. R., Ottenhoff, T. H. and Moraes, M. E. (2003). Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. Immunogenetics. 54:896-899.

Morran, M. P., Omenn, G. S., and Pietropaolo, M. (2008). Immunology and genetics of type1 diabetes. J. Medicine.75:314-327.

Mysliwska, J., Zorena, K., Semetkowske-Jurkiewicz, E., Rachon, D., Suchanek, H. and Mysliwski A. (2005). High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients. Cytokine Netw. 16:117-122.

Nakayama, M., Abiru, N., Moriyama, H., Babaya, N., Liu, E., Miao, D., Yu, L., Wegmann, D. R., Hutton, J. C., Elliott, J. F. and Eisenbarth, G. S. (2005).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Prime role for an insulin epitope in the development of Type [Thinsp]1 diabetes in Nod Mice. Nature. 435(7039):220-223.

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2008). National diabetes statistics, 2007 fact sheet. Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health.

Nejentsev, S., Howson, J. M. M., Walker, N. M., Szeszko, J., Field, S. F., Stevens, H. E., Reynolds, P., Hardy, M., King, E., Masters, J., Hulme, J., Maier, L. M., Smyth, D., Bailey, R., Cooper, J. D., Ribas, G., Campbell, R. D., Clayton, D. G. and Todd, J. A. (2007). Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. Nature, 450: 887-892.

Newton, C. R., Graham, A., Powell S. J., Summers, C., KalSheker, N. and Smith, J. C. (1989). Analysis of any point mutation in DNA the amplification refractor mutation system. Nucleic Acids Res. 17:2503-2516.

Noble, J. A. and Valdes, A. M. (2011). Genetics of the HLA Region in the prediction of Type I Diabetes . Curr. Diabetes Reports. 11(6):533-542.

Nordwall, M., Arnqvist, H. J., Bojestig,M. and Ludvigsson, J. (2009). Good glycemic control remains crucial in prevention of late diabetic complications the Linkoping Diabetes Complications Study. Pediatric diabetes. 10(3):168-176.

Notkins, A. L. (2002). Immunology and genetic factors in type1 diabetes. J. Biol. Chem. 277(46):43545-43548.

Notkins, A. L. and Lernmark, A. (2001). Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. J. Clini. Invest. 108(9):1247-1252.

Novak, J., Beaudoin, L., Park, S., Griseri, T., Teyton, L., Bendelac, A. and Lehuen, A. (2007). Prevention of Type 1 diabetes by invariant NKT Cells is independent of peripheral CD1d expression. Immunology J. 178:1332-1340.

Olivieri, A., de Angelis, S. and Dionisi, A. (2010). Serum transforming growth factor $\beta 1$ during diabetes development in non-obese diabetic mice and humans," Clini. Exp. Immunol. 162(3):407–414.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Padgett, L. E., Broniowska, K. A., Hansen, P. A., Corbett, J. A. and Tse, H. M. (2013). The role reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type1 diabetes pathogenesis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1281:16-35.

Pakala, S. V., Kurrer, M. D. and Katz, J. D.(1997). T helper 2 (Th2) T-cells induce acute pancreatic and diabetes in immune compromised non-obese diabetic (NOD) mice. J. Exp. Med. 186:299-306.

Palmer, J. P., Asplin, C. M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P. K. and T. L. (1983). Paquette, insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. National Library of Medicine. Nat. Inst. Health. 222(4630):1337-1339.

Patel, A., Scott, W., Lympany, P., Rippin, J., Gill, G., Barnett, A. and Bain, S.(2005). The TGF-beta1 gene codon 10 polymorphism contributes to the genetic predisposition to nephropathy in type 1 diabetes. 22(1):69-73.

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.

Pedicino, D., Liuzzo, A., Trotta, F., Giglio, A., Giubilato, S., Martini, F., Zaccardi, F., Scavone, G., Previterom, M., Massaro, G., Cialdella, P.,Cardillo, M., Pitocco, D., Ghirlanda, G. and Crea, F. (2013). Adaptive immunity inflammation and cardiovascular complication in type1 and type2 diabetes mellitus. Hindawi Pub. Corp. J. Diabetes Res.10:1-11.

Pietropaolo, M., Towns, R. and Eisenbarth, G. S. (2012). Humoral Autoimmunity in type1 Diabetes prediction, significance, and Detection of Disease subtypes. J. CSH. Perspectives.10:1-11.

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.

Pyo, C. W., Hur, S. S., Kim, Y. K., Choi, H. B., Hong, Y. S., Kim, D.W., Kim, C. C. and Kim, H. K. (2003). Polymorphism of *IL-1B*, *IL-1RN*, *IL-2*, *IL-4*, *IL-*

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

6, *IL-10* and IFN gamma gene in the Korean population. J. Hum. Immunol. 64:979-989.

Qi, Z., Zhang, Q., Wang, Z., Zhao, W., and Gao, Q. (2015). Cloning of Interleukin-10 from African Clawed Frog (*Xenopus tropicalis*), with the finding of IL-19/20 homologue in the IL-10 Locus. J. Immunol. Res. 215:1-10.

Rabinovitch, A. and Suarez-Pinzon, W. (1998). Cytokines and their roles in pancreatic islet b-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. J. Bioch. Pharmacol. 55(8):1139-1149.

Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W., Sorensen, O., Bleackley, R. and Power, R. (1995). IFN-γ gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. J. Immunol. 154:4874-4882.

Rafinejed, A., Niknam, M. H. Amirzargar, A. A., Khosravi, F. and Larijani, B. (2004). Association of *INF-γ* gene polymorphism with type1 diabetes in Iranian patients. Med. Sci. 1(2):130-132.

Rai, M. F. (2008). Application of IL-4 transgene expression in a chondrodyte based 3D model of inflammatory arthritis. Ph.D. thesis. Institute of immunology and molecular biology. Institute of chemistry and biochemistry, Free University Berlin, Germany.

Reynier, F., Cazalis, M., Lecoq, A., Paye, M., Rosa, A., Durand, A., Jhumka, U., Mougin, B., Miossec, P., Bendelac, N. and Thivolet, C. (2006). Lack of association of IL-10 Promoter gene variants with type 1 diabetes in a French population. J. Hum. Immunol. 67:311-317.

Rich, S., Akolkar, B., Concannon, P., Erlich, H., Julier, C., Morahan, G. Nerup., J., Nierr, C., Pociot, F. and Todd, J. (2009). Overiew of the Type I diabetes genetics consortium. Genes Immun.10:1-4.

Richard, I. G. (2004). Diabetes epidemiology and pathogenesis of diabetes mellitus an update psychiatrists.British J. Psych.184(47):55-63.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Richer, M., Straka, N., Fang, D., Shanina, I. and Horwitz, M. (2008). Regulatory T-cells protect from type1 diabetes after induction in the context of transforming growth factor-beta. J. Diabetes. 57(5):1302-1311.

Roohi, A., Tabrizi, M., Abbasi, F., Jafari, A. and Nikbin, B. (2014). Serum IL-17, IL-23, and TGF-B levels in type1 and type2 diabetic patients and age-matched healthy controls. Biomed Res. Inter.Accepted 14 May:p1-7.

Rothenberg, E. V. (2011). T cell lineage commitment: identity and renunciation. J. Immunol. 186(12):6649-6655.

Russell, M. A. and Morgan, N. G. (2014). The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic β-cell. Taylor and Francis group. 6(3):1-10.

Rutitzky, L. I., Lopes da Rosa, J. R. and Stadecker, M. J. (2005). Severe CD4 T cellmediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. J. Immunol.175:3920-3926.

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.

Saleh, E. M. (2009). Cytokines profile in newly diagnosed children with type1 diabetes mellitus. J. Fas. Med. Baghdad. 51(3):295-299.

Saour, M. Y, Saleh, E. and Mall-Allah, Z. T. (2011). Serum levers of cytokines (TNF-a, INF-γ, IL-10) in type-2 diabetes patients with HCV infection. Fac. Med. Baghdad. 53(2):198-200.

Sass, G., Koerber, K., Bang, R. Guehring, H. and Tiegs, G. (2001). Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice. J. Clini. Investi.107:439-447.

Schindler, H., Lutz, M. B., Rollinghoff, M. and Bogdan, C. (2001). The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. J. Immunol., 166:3075-3082.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Schlosser, M., Strebelow, M., Rjasanowski, I., Kerner, W., Wassmuth, R. and Ziegler, M. (2004). Prevalence of diabetes-associated autoantibodies in schoolchildren: the Karlsburg Type 1.Diabetes Risk Study. Ann. of the New York Acad. Sci.1037:114-117.

Schroder, K., Hertzog, P., Ravasi, T. and Hume, D. (2004). Interferon-*y*: an overview of signals, mechanism and functions. J. Leukocyte Biol. 75:163-189.

Schmidi, R., Deaizpurua, H., Harrison, L. and Colman, P. (1994). Antibodies to glutamic acid decarboxylase in at-risk and clinical insulin-dependent subjects: relationship to age.sex and islet cell antibody status, and temporal profile. J. Autoimmun. 7:55-66.

Schmitt, E., Hoehn, P., Huels, C., Goedert, S., Palm, N., Rude, E. and Germann, T. (1994). T helper type 1 development of naïve CD4+ T cell requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon- gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta. J. Immunol. 24(4):793-798.

Seewaldt, S., Thomas, H. S. and Ejrnaes, M. (2000). Virus induced autoimmune diabetes. Most β-cells die through inflammatory cytokines and not perforin from autoreactive (anti-viral) cytotoxic T-lymphocytes. J. Diabetes. 49:1801-1809.

Settin, A., Ismail, A., El-Magd, M., Baz, R. and Kazamel, A. (2008). Gene polymorphisms of *TGF-α* -308(G/C), *IL-10* -1082(G/C), *IL-6* -174(G/C) and IL-1Ra(VNTR) In Egyptian cases with type 1 diabetes mellitus. J. Autoimmuni. 10:50-55.

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.

Siekiera, U., Jarosz-Chobot, P. and Janusz, J. (2002). Polymorphism of TNF-alpha (308 A/G), IL-10 (1082 A/G, 819 C/T 592 A/C), IL-6 (174 G/C), and IFN-gamma (874 A/T); genetically conditioned cytokine synthesis level in children with diabetes type 1. J. Diabetologai. 8(1):29-34.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Sky T. H., Graham, J., Elaine, V., Verhagen, J., Bronwen R. and David, C. (2013). Regulation of adaptive immunity; the role of IL-10. Immunology. 4:1-13.

Solimena, M., R. Dirkx, Jr., Hermel, J. M., Pleasic-Williams, S., Shapiro, J. A., Caron, L. and D.U. Rabin, D. U. (1996). ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. EMBO J.15(9):2102-2114.

Southam, L., Heath, O., Chapman, K. and Loughlin, J. (2006). Association analysis of interleukin 17 genes IL17A and IL17F as potential osteoarthitis susceptibility loci. Ann. Rheum. Dis. 65:556-557.

Stadinski, B., Kappler, J. and Eisenbarth, G. S. (2010). Molecular targeting of islet autoantigens. Immunity. 32:446-456.

Stalenhoef, J. E., Alisjahbana, B., Nelwan, E. J., van der Ven-Jongekrijg, J., Ottenhoff, T. H., van der Meer, J. W., Nelwan, R. H., Netea, M. G. and van Crevel, R. (2008). The role of interferon-gamma in the increased tuberculosis risk in type 2 diabetes mellitus. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis. 27:97-103.

Stalenhoef, J. E., Alisjahbana, B., Nelwan, E. J., Ven-Jongekrijg, V. , Ottenhoff, T. H., Meer, J. W., Nelwan , R. H., Netea, M. G. and Crevel, R .(2008).The role of interferon-gamma in the increased tuberculosis risk in type 2 diabetes mellitus. Eur. J. of Clin. Microbiol. 27(2):97-103.

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.

Suk, K., Kim, S., Kim, Y.-H., Kim, K.-A., Chang, I., Yagita, H., Shong, M. and Lee, M.-S. (2001). Ifn-Synergism as the final effector in autoimmune diabetes: A key role for Stat1/Ifn regulatory factor-1 pathway in pancreatic cell death. J. Immunol. 166(7):4481-4489.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Szelachowska, M., Kretowski, A. and Kinalska, I. (1998). Decreased *in vitro* IL-4 [corrected] and IL-10 production by peripheral blood in first degree relatives at high risk of diabetes type-1. Horm. Metab. Res. 30:526–530.

Tegoshi, H., Hasegawa, G., Obayashi, H., Nakano, K., Kitagawa, Y., Fukui, M., Matsuo, S., Deguchi, M., Ohta, M., Nishimura, M., Nakamura, N. and Yoshikawa, T. (2002). Polymorphisms of interferon-γ gene C/A-Repeat and interleukin-10 promoter region (-592A/C) in Japanese type 1 diabetes. J. Hum. Immunol. 63(2): 121-128.

Ten, D. P. and Hill, C. S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signaling. Trends Biochem. Sci. 29:265–273.

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.

Tesch, J. H. (2007). "Role of macrophages in complications of Type 2 diabetes," Clini. Exp. Pharmacol. Physiol. 34(10):1016-1019.

Thanabalasingham, G. and Owen, K. R. (2011). Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). BMJ. 343: p. d6044.

Tisch, R. and McDevitt, H. (1996). Insulin- dependent diabetes mellitus. J. Cell. 85(3):291-297.

Trinchieri, G. (2010). Type1 interferon: friend or for published. J. Exp. Medici. 207(10):2053-2063.

Turner, D. M., Williams, D. M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P. J. and Hutchinson, I. V. (1997). An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. J. Immunogenet. 24:1-8.

Undlien, D. E. and Thorsby, E. (2001). HLA associations in type 1 diabetes: merging genetics and immunology. Trends Immunol. 22:467-469.

Urcelay, E., Santiago, J. L., de la Calle, H., Martı´nez, A., Figueredo, A., Ferna´ndez-Arquero, M. and de la Concha, E. G. (2004). Interleukin-10

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

polymorphisms in Spanish type 1 diabetes patients. Genes Immun. 5:306-309.

Valdes, A. M., Erlich, H. A. and Noble, J. A. (2005). Human leukocyte antigen class I B and C loci contribute to type 1 diabetes (T1D) susceptibility and age at T1D onset. Hum. Immunol. 66:301–313.

Van der Werf, N., Kroese, F. G. M., Rozing, J. and Hillebrands, J. L. (2007). Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. Diabetes Metab. Res. Rev. 23:169-183.

Wahbi, D. S. (1998). Screening for autoantibodies and viral antibodies in diabetes mellitus. M.Sc. Thesis, College of Medicine. University of Baghdad. Iraq.

Wajchenberg, B. L. (2007). Beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. Endocrine Rev. 28(2):187-218.

Wan, Y. Y and Flavell, R. A. (2006). The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells, Immunol. Rev. 212:114–130.

Weiner, H. (1997). Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diabetes. J. Immunol. Today. 18:335-343.

Wenzlau, J. M., Juhl, K., Yu, L., Moua, O., Sarkar, S. A., Gottlieb, P., Rewers, M., Eisenbarth, G. S., Jensen, J., Davidson, H. W. and Hutton, J. C. (2007). The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 104(43):17040-17045.

Westendorp, R. G., Langermans, J. A., Huizinga, T. W., Elouali, A. H., Verweij, C. L., Boomsma D. I. *et al*. (1997). Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*. 340, 170–173. Erratum in: 1997 Lancet 349, 656.

WHO. (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications.

WHO. (2006). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. WHO Press, World Health Organization, Switzerland. pp. 5-8.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

WHO. (2015). Diabetes. Fact sheet, N312.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care.27:1047–1053.

Williams, A. J., Bingley, P. J., Bonifaco, E., Palmer, J. P. and Gala, E. A. (1997). A Novel Micro-assay for Insulin Autoantibody. J. Autoimmun. 10(5):473-478.

Williams, A. J., Norcross, A. J., Dix, R. J., Gillespie, K. M., Gale, E. A. and Bingley, P. J. (2003). The prevalence of insulin autoantibodies at the onset of Type 1 diabetes is higher in males than females during adolescence. Diabetologia. 46(10):1354-1356.

Yi, Z., Li, L., Garland, A., He, Q., Wang, H., Katz, J., Tisch, R. and Wang, B. (2012). INF-γ receptor deficiency prevents diabetes induction by diabetogenic $CD4^+$, but not $CD8^+$, T cells. J. Immunol. 42:2010-2018.

You, F. M., Hon, N., Gu, Y. Q., Luo, M., Ma, Y., Hane, D., Lazo, G. and Anderson, O. D. (2008). BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. Bioinformation. 9:1-13.

You, S., Thieblemont, N., Alyanakian, M., Bach, J. and Chatenoud, L. (2006). Transforming growth factor-β and T-cell mediated immune regulation in the control of autoimmune diabetes. Immunol.Rev. 212:185–202.

Zareian, P. and Dizgah, I. M. (2014). Serum Interleukin 17 in Type 2 Diabetes Mellitus. J. Arch. Mil. Med. 2(4): e24689.

Ziegler, D. and Sohr, C. G. (2004). Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetes polymorphism and cardiovascular autonomic neuropathy. Diabetes Care. 27(9):2178-2183.

Zorena, K., Raczynska, D., Wisniewski, P., Malinowska, E., Mysliwiec, M., Raczynska, K. and Racho, N. D. (2013). Relationship between Serum transforming growth factor β1 concentrations and the duration of Type 1 diabetes mellitus in Children and Adolescents. Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation. pp:1-6.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

INTERNET SITES: مواقع الأنترنت

1. http:// www.genecardes.org .
2. http://www.had2know.com.
3. http://www.atlasgeneticsnology.org.
4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ملحق (1): استمارة المعلومات الخاصة بجمع المعلومات عن عينة الأطفال المصابين بداء السكري– النوع الأول والعينة القياسية

استمارة معلومات

اسم المريض :

العمر : | الجنس | ذكر ☐ | انثى ☐

عدد افراد العائلة : | ذكور ☐ | أناث ☐

اسم ونوع المرض :

التشخيص المعتمد للمرض :

تاريخ حدوث الإصابة بالمرض :

العلاج المستخدم | حقن ☐ | حب ☐ | اخرى ☐

نوع الانسولين المستخدم | صافي ☐ | خابط ☐ | مخلوط ☐

هل توجد امراض وراثية اخرى لدىالمريض | نعم ☐ | لا ☐

اسم المرض :

هل توجد امراض وراثية لدىافراد العائلة : | ذكور ☐ | اناث ☐

الملاحظات :

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ملحق (2): رموز النيكلوتيدات الخاصة بالاتحاد الدولي للكيمياء البحتة والتطبيقية IUPAC والمستعملة في دراسات التسلسل التتابعي للدنا

رمز النيكلوتيدة بنظام IUPAC	القاعدة النايتروجينية
Y	T or C (Pyrimidine)
R	G or A (Purine)
M	A or C (Amino)
K	G or T (Keto)
S	G or C (Strong interaction: 3 H bonds)
W	A or T (Weak interaction: 2 H bonds)
B	G or T or C (Not A)
V	G or C or A (Not T, Not U)
D	G or A or T (Not C)
H	A or C or T (Not G)
N	G or A or T or C (Unknown nucleotide)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ملحق (3): أهم الطفرات الجينية الموجودة في محث الجين الطافر *IL-10* −592 لعينات المصابين بداء السكري− النوع الأول*

نوع الطفرة الجينية	رقم القاعدة أو التسلسل النيكلوتيدي	أسم القاعدة الطافرة في العينة	أسم القاعدة في Refseq
اضافة	1402	T	-
حذف	1464-1468	-	ACAGCT
	1488	-	G
	1489	-	C
أستبدال	1331	A	C
	1335	G	A
	1336	A	G
	1339	C	T
	1341	T	C
	1342	A	T
	1347	G	T
	1350	C	T
	1354	G	A
	1358	G	A
	1360	G	A
	1362	C	G
	1363	A	G
	1372	G	A
	1375	T	G
	1378	C	A
	1384	C	A
	1386	T	C
	1388	T	G
	1391	C	T
	1392	C	A
	1393	C	G
	1394	G	C
	1397	T	A
	1401	T	G
	1406	A	C
	1409	C	T
	1410	T	C
	1412	A	G
	1414	G	A
	1417	C	T
	1418	A	G
	1419	T	C

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

A	G	1420	
C	T	1423	
T	C	1424	
A	C	1425	
T	C	1427	
T	C	1430	
A	T	1431	
C	T	1432	
C	G	1434	
A	G أو T	1435	
T	G	1438	
A	C	1444	
G	C	1446	
A	C	1448	
G	A	1451	
T	C	1452	
T	G	1453	
G	T	1459	
A	G	1474	
T	G	1477	
A	G	1481	
C	A	1483	
A	C	1484	
G	A	1494	

*= عينات المصابين التي درس فيها التسلسل التتابعي هي P1، P5 وP25.

A= الأدنين، T= الثايمين، G= الكوانين، C= السايتوسين، Refseq= مصدر التسلسل التتابعي للدنا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ملحق (4): أهم الطفرات الجينية الموجودة في محث الجين الطافر *IL-10* −592 للعينات القياسية*

نوع الطفرة الجينية	رقم القاعدة أو التسلسل النيكلوتيدي	أسم القاعدة الطافرة في العينة	أسم القاعدة في Refseq
اضافة	1303	G	-
حذف	1286	-	T
	1334	-	A
	1335	-	G
	1355-1352	-	TAGA
أستبدال	1365	-	G
	1366	-	G
	1380	-	T
	1463	-	G
	1519	-	C
	1520	-	T
	1237	C	T
	1249	T	A
	1260	C	T
	1261	T	A
	1263	A	G
	1268	T	G
	1276	T	A
	1283	G	A
	1285	G	T
	1289	T	C
	1293	A	G
	1294	A	G
	1297	A	T
	1298	A	C
	1300	T	C
	1302	G	T
	1312	A	T
	1314	G	A
	1315	G	T
	1317	G	T
	1322	G	T
	1326	C	T
	1327	C	G
	1336	C	T
	1338	C	T
	1343	G	A
	1345	C	T

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

A	G	1348	
A	G	1351	
C	A	1358	
G	C	1360	
A	G	1375	
C	A	1377	
C	T	1383	
C	A	1387	
T	G	1388	
A	G	1389	
T	G	1393	
A	G	1397	
C	G	1411	
C	T	1415	
T	C	1420	
T	C	1423	
T	C	1425	
C	T	1432	
A	G	1440	
A	G	1441	
G	A	1455	
G	A	1458	
A	C	1462	
C	T	1464	
A	C	1476	
A	T	1477	
A	G	1480	
G	T	1482	
T	C	1496	
A	T	1497	
A	T	1498	
T	G	1499	
A	G	1502	
C	T	1505	
A	G	1513	
A	G	1523	
A	C	1526	
A	C	1528	
C	T	1531	

*= العينات القياسية التي درس فيها التسلسل التتابعي هي C1، C4 وC5.

A= الأدنين، T= الثايمين، G= الكوانين، C= السايتوسين، Refseq= مصدر التسلسل التتابعي للدنا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ملحق (5): أهم الطفرات الجينية الموجودة في محث الجين الطافر *IL-10* −1082 لعينات المصابين بداء السكري− النوع الأول*

نوع الطفرة الجينية	رقم القاعدة أو التسلسل النيكلوتيدي	أسم القاعدة الطافرة في العينة	أسم القاعدة في Refseq
اضافة	1254-1255	TG	-
حذف	1215-1217	-	AAT
	1308-1312	-	ACAGG
أستبدال	1095	T	C
	1096	T	C
	1117	T	C
	1143	T	C
	1144	C	T
	1148	A	T
	1158	T	C
	1164	C	A
	1168	G	T
	1176	T	C
	1182	T	C
	1183	T	A
	1187	T	C
	1192	T	C
	1200	G	A
	1204	G	A
	1210	G	A
	1213	G	C
	1219	G	T
	1220	G	A
	1227	A	G
	1234	A	T
	1235	A	T
	1236	A	C
	1237	G	T
	1241	G	T
	1243	G	C
	1256	A	G
	1257	A	T
	1259	T	C
	1261	A	G
	1267	A	T
	1268	A	G
	1270	A	G
	1274	G	A
	1275	G	C
	1279	G	A
	1287	G	T

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

G	A	1289	
T	G	1294	
G	A	1296	
G	A	1298	
T	G	1299	
C	A	1301	
C	G	1302	
C	G	1303	
T	C	1305	
G	C	1306	
T	C	1307	
G	T	1314	
T	C	1316	
G	T	1317	
A	T	1319	
A	C	1320	
A	T	1322	
T	C	1323	
C	T	1324	
C	A	1326	
T	C	1327	
T	C	1328	
G	C	1329	
C	T	1331	
T	C	1333	
A	T	1335	
G	A	1336	
G	C	1340	
T	C	1342	
C	T	1345	
T	C	1346	
A	C	1347	
T	C	1358	
A	G	1352	
T	G	1353	
G	C	1357	
C	T	1359	
G	A	1360	
C	G	1369	
A	C	1370	

*= عينات المصابين التي درس فيها التسلسل التتابعي هي P19، P25 و P32.

A= الأدنين، T= الثايمين، G= الكوانين، C= السايتوسين، Refseq= مصدر التسلسل التتابعي للدنا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ملحق (6): أهم الطفرات الجينية الموجودة في محث الجين الطافر *IL-10* −1082 للعينات القياسية*

نوع الطفرة الجينية	رقم القاعدة أو التسلسل النيكلوتيدي	أسم القاعدة الطافرة في العينة	أسم القاعدة في Refseq
حذف	1093	-	C
	1172	-	A
	1278-1283	-	TTCTCA
	1309-1310	-	GG
أستبدال	1059	T	G
	1060	T	G
	1071	T	A
	1072	T	G
	1103	C	G
	1113	T	A
	1114	G	A
	1137	A	T
	1138	G	T
	1139	G	T
	1148	G	T
	1150	T	C
	1157	G	T
	1171	T	G
	1173	T	C
	1190	G	T
	1191	G	A
	1196	G	T
	1197	G	A
	1199	G	A
	1207	T	C
	1211	A	G
	1212	A	G
	1213	A	C
	1214	G	C
	1216	T	A
	1217	G	T
	1218	G	T
	1219	G	T
	1222	G	T
	1223	G	C
	1224	A	C
	1226	G	A
	1227	A	G
	1236	T	C

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

T	A	1237	
C	G	1243	
T	A	1244	
G	A	1245	
G	A	1246	
T	A	1250	
T	G	1255	
A	G	1256	
T	C	1260	
T	A	1286	
G	T	1294	
A	T	1298	
C	T	1299	
A	T	1317	
T	C	1323	
T	G	1335	

*= العينات القياسية التي درس فيها التسلسل التتابعي هي C4، C6 و C11.

A= الأدنين، T= الثايمين، G= الكوانين، C= السايتوسين، Refseq= مصدر التسلسل التتابعي للدنا من بنك الجينات الذي قورن مع العينة المدروسة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

البحوث المستلة من الرسالة والمقبولة للنشر

حسين، إحسان عرفان، خليل، حازمة موسى وناصر، أنور عبد. (2016). التعدد الشكلي للجين *IFN-γ* T/A +874 في الأطفال العراقيين المصابين بداء السكري- النوع الأول. مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية. 29(1): مقبول للنشر.

حسين، إحسان عرفان، خليل، حازمة موسى وناصر، أنور عبد. (2016). التعدد الشكلي للجين - *IL-4* (C>T) 590 في الأطفال العراقيين المصابين بداء السكري- النوع الأول. مجلة كلية التربية الأساسية. مقبول للنشر.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Abstract

This study was included 50 blood serum samples were 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 concentrations of some pro-inflammatory interleukins like IFN-γ and IL-17 were detected. Anti-inflammatory interleukins like IL-4, IL-10 and TGF-β were also detected by using Elisa instrument. The results revealed high concentrations of IFN-γ in T1D patient's blood serum with 1.575 Pg/ml in comparison with 0.921 Pg/ml in control sample. The statistically results by using Mann-Whitney U test revealed significant differences between T1D patients and control samples. The results also revealed decreasing in IL-17 concentrations in T1D patient's blood serum with 0.010 Pg/ml in comparison with the control sample with 0.029 Pg/ml. No significant differences were detected in concentration of this interleukin between the studied samples when they analyzed with the same statistical test. The results showed increasing in TGF-β concentration in T1D patient's blood serum in comparison with the control sample. The concentration was 1.659 Pg/ml in patients, whereas the concentration of TGF-β in control sample was 0.444 Pg/ml. The results of Mann-Whitney U test showed significant differences in TGF-β concentrations between both samples. The results revealed decreasing in IL-4 concentration in blood serum of T1D patients in comparison with the control sample. The concentration was 0.015 Pg/ml in patients, whereas the concentration of IL-4 in control sample was 0.021 Pg/ml. No significant differences were found in concentration of this interleukin between the studied samples when they analyzed with the same statistical test. The results also revealed decreasing in IL-10 concentration in T1D patient's blood serum in

www.manaraa.com

comparison with the control sample, with 0.068 Pg/ml in patient sample and 0.111 Pg/ml in control sample. No significant differences were found in concentration of this interleukin between the studied samples when they analyzed with the Mann-Whitney U test. The results of correlation coefficients by using Person Correlation test between the studied interleukins showed significant differences among some interleukins, but no significant differences were detected with the other interleukins.

The polymorphism of *IFN-γ* T/A +874 gene, which amplified by using amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) was showed increasing in T allele frequency of T1D patients in comparison with the A allele frequency, whereas the T allele frequency was higher from the A allele frequency in control sample. The A allele revealed as Etiological faction (EF) and correlated with the disease in T1D patients sample, whereas the T allele revealed as Preventive faction (PF). The TT genotype showed higher percentage in control sample in comparison with T1D patients sample when Hardy-Weinberg equilibrium was used, and this genotype revealed as preventive faction from infection by this disease. The TA and AA genotypes revealed as etiological faction with risk by having this disease. The gel electrophoresis of *IL-17A* and *IL-17F* genes revealed the presence of both genes in all studied samples. The polymorphism of *IL-4* -592 (C>T) gene which amplified by ARMS-PCR technique was showed high 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 this 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 TC genotypes revealed as preventive faction from infection by this disease, whereas

www.manaraa.com

the CC genotype revealed as etiological faction with risk by having this disease. The promoter of *IL-10* gene in -592 and -1082 positions were detected in both of the studied samples. The results of polymorphism of *TGF-β1* gene in Codon 10: +869*C/T position showed that the T allele revealed as etiological faction with risk by having this disease, whereas the C allele revealed as preventive faction from infection by this disease. The TT and CC genotypes revealed as etiological faction with risk by having this disease, whereas the CT genotype revealed as preventive faction from infection by this disease. The results of polymorphism of *TGF-β1* gene in Codon 25: +915*G/C position showed that the G allele revealed as etiological faction with risk by having this disease, whereas the C allele revealed as preventive faction from infection by this disease. The GG genotype revealed as etiological faction with risk by having this disease, whereas the GC and CC genotypes showed no significant correlation with the T1D disease, and these genotypes revealed as preventive faction from infection by this disease. The DNA sequences of the *IL-10* gene promoter were recorded many gene mutations with addition, deletion and substitution types, with high percentage of the last type of gene mutations in all of the studied samples and for both -592 and -1082 positions.

www.manaraa.com

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education

and Scientific Research

University of Baghdad

College of Education for Pure Sciences/Ibn-Alhaitham

Immunological and genetic study of type I diabetes mellitus in a sample of Iraqi patients

A thesis

Submitted to the College of Education for Pure Sciences/Ibn-Alhaitham University of Baghdad in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Science of Biology / Zoology /Immunogenetics

By

Anwar Abed Nasser

M.Sc. in Biology/Cytogenetic – College of Education for Pure Science
Al-Anbar University
2009

Supervisor

Assist. Prof. Dr. Ihsan A. Hussein and Assist. Prof. Dr. Hazyma M. Khalil

April, 2016 A.D **Jumada al-Thani 1437 A.H**

www.manaraa.com