

التعدد الشكلي للجين +874 T/A $IFN-\gamma$ في الأطفال العراقيين المصابين بداء السكري- النوع الأول

أحسان عرفان حسين

حازمة موسى خليل

أنور عبد ناصر*

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

استلم في: 1 تشرين الثاني 2015 قبل البحث: 15 كانون الاول 2015

الخلاصة

شملت الدراسة على 50 عينة دم مأخوذة من أطفال تراوح متوسط أعمارهم من 7-12 سنة، 35 عينة منها كانت دم لأطفال مصابين بداء السكري- النوع الأول (Type 1 Diabetes Mellitus (T1D)، إذ كان متوسط أعمارهم 9.4 ± 0.34 سنة، فضلاً عن 15 عينة دم لأطفال أصحاء التي عدت كعينات قياسية وكان متوسط أعمارهم 10.9 ± 0.38 سنة. أجريت دراسة مناعية وراثية على عينات الدم المأخوذة من الأطفال المصابين والعينة القياسية. فُدرت مستويات للتركيز الحركي الخلوي $IFN-\gamma$ في العينات المدروسة باستعمال جهاز الأليزا Elisa، إذ بلغ التركيز في مصل دم المصابين 1.575 بيكوغرام/ملييلتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.921 بيكوغرام/ملييلتر. نتائج التحليل الأحصائي باستعمال اختبار Mann-Whitney U قد أظهر وجود فروق معنوية في تركيز الأنترفيرون- كما بين الأطفال المصابين والعينة القياسية وتحت مستوى احتمالية $P < 0.05$. درس تعدد الأشكال الوراثية Genetic polymorphism لجين $IFN-\gamma$ T/A +874 في العينات المدروسة باستعمال تقانة نظام الممانعة للتضخيم Amplification refractory mutation system (ARMS-PCR). أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لجين $IFN-\gamma$ T/A +874 المتضخم بهذه التقانة إلى وجود أليلين هما T و A وإلى وجود ثلاثة أنماط وراثية هي TT، TA و AA، إذ سجل الأليل T نسبة أعلى من الأليل A في عينة المصابين، وكذلك في العينة القياسية. تبين النتائج بأن الأليل A أظهر تكراراً معنوياً لدى المصابين بنسبة أعلى من العينة القياسية باستعمال اختبار Fisher's test، وبالاعتماد على النسبة الحرجة (OR) ومدة الثقة Confidence Intervals (CI) ظهر الأليل A كأليل مسبب Etiological faction (EF) ومرتبطة مع المرض. بينما أظهر الأليل T تكراراً معنوياً لدى العينة القياسية بنسب أعلى من عينة المصابين باستعمال اختبار Fisher's test، وظهر هذا الأليل كأليل وقائي من المرض Preventive faction (PF). حللت نتائج تقانة ARMS-PCR للجين $IFN-\gamma$ T/A +874 باستعمال قانون التوازن هاردي-واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium، إذ أظهر النمط الوراثي TT نسبة أعلى لدى العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول، وكان هناك اختلافاً معنوياً باستعمال اختبار Fisher's test، كما ظهر النمط الوراثي TT كنمط وراثي وقائي من خطر الإصابة بداء السكري، بينما أظهر الطراز الوراثي TA نسبة أعلى لدى عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية، وبين التحليل الاحصائي عند استعمال اختبار Fisher's test بأن النمط الوراثي TA قد اختلف معنوياً لدى عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية، كما ظهر النمط الوراثي TA كنمط وراثي مرتبط مع خطر الإصابة بداء السكري. أظهر النمط الوراثي AA نسبة أعلى لدى عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول بالمقارنة مع العينة القياسية ولم يكن هناك أي اختلاف معنوي، كما ظهر النمط الوراثي AA كنمط وراثي مرتبط مع خطر الإصابة بداء السكري.

الكلمات المفتاحية: أنترفيرون-كما، داء السكري- النوع الأول، +874 T/A $IFN-\gamma$ ، T1D

المقدمة

داء السكري (Diabetes mellitus (DM) يعرف على أنه مجموعة اضطرابات أيضية تنتهي بفرط السكري Hyperglycemia, وتنتج إما من خلل في إفراز هرمون الأنسولين أو فعالية الأنسولين أو كلاهما [1]. يحدث داء السكري- النوع الأول نتيجة عجز خلايا بيتا β cells الموجودة في البنكرياس عن إنتاج مادة الأنسولين بكمية كافية أو توقفها عن الإنتاج بشكل نهائي وهذا يعرف بداء السكري المعتمد على الأنسولين (IDDM) Insulin-dependent diabetes mellitus, أو عندما يعجز الجسم عن استعمال تلك المادة بشكل فعال وهذا يمثل داء السكري- النوع الثاني غير المعتمد على الأنسولين (NIDDM) Noninsulin-dependent diabetes mellitus. داء السكري- النوع الأول هو مرض وراثي مناعي ذاتي، ويعد من أخطر الأنواع ويحدث في مرحلة الطفولة ومع بداية مرحلة المراهقة والأطفال المصابين بهذا النوع يتوقف لديهم إنتاج هرمون الأنسولين بسبب تحطم خلايا بيتا في البنكرياس، ويحتاجون إلى حقن الأنسولين كعلاج رئيس على مدى الحياة [2]. يصنف داء السكري- النوع الأول على نوعين هما Type 1a و Type 1b. النوع الأول a يعود إلى تحطم مناعي ذاتي لخلايا بيتا في البنكرياس مسببة نقص الأنسولين ويشكل نسبة 90% من الحالات المرضية، بينما النوع الثاني b فيكون مجهول السبب Idiopathic ويشكل حوالي 9% من داء السكري- النوع الأول T1DM ولا يوجد أي دليل يثبت ارتباطه بأمراض المناعة الذاتية [3,4]. ويعد داء السكري- النوع الأول من الأمراض المناعية الوراثية الناتجة من اضطرابات أيضية لفرط الكلوكوز مع اضطرابات في أيض الدهون والكاربوهيدرات والبروتينات، وأن حدوث الداء مرتبط بالأجسام المضادة الذاتية Autoantibodies الموجهة ضد خلايا بيتا، وتطور الداء يزداد بسبب تحطم خلايا بيتا في البنكرياس المنتجة لهرمون الأنسولين مما يسبب نقصاً في إنتاج هرمون الأنسولين، عدم التحسس في الاستجابة لأفراز الأنسولين بصورة طبيعية يسبب فرط السكري Hyperglycemia [5]. الأصابة لمدة طويلة بداء السكري تصاحبها مضاعفات وتطورات خطيرة مثل تلف شبكية العين Retinopathy والتي تؤدي إلى ضعف في النظر ثم العمى Blindness، والمرض الكلوي Nephropathy الذي يؤدي إلى العجز الكلوي Kidney deficit، وأمراض عصبية محيطية أو مركزية تؤدي إلى تقرحات القدم والبتر Amputation وضمور المفاصل Charcot joints الذي قد يصاحبه زيادة خطر الإصابة بمرض وعائي قلبي Cardiovascular وعائي محيطي Peripheral vascular ووعائي شوكي Cerebrovascular مع اضطرابات معوية معدية حادة [6]. وتؤدي الحركات الخلوية Cytokines دوراً مهماً في حث أو تفاقم داء السكري- النوع الأول، من خلال ميكانيكيات مباشرة أو غير مباشرة تقود إلى تحطم خلايا بيتا المنتجة للأنسولين، ويكون دورها المباشر من خلال فعالية الخلايا السمية Tc ، لكن دورها غير المباشر يكون من خلال فعالية ووظيفة الخلايا المؤثرة قبل الألتهايبية Proinflammatory cells والخلايا الألتهايبية Inflammatory cells. كما تؤدي الحركات الخلوية دوراً وسطياً في تنظيم الاستجابة المناعية وإنتاجها من قبل الخلايا المناعية يعتمد على عوامل عدة مثل الأصابة Infection، الألتهايب Inflammation، تأثير الهرمونات Hormonal effects وله علاقة بظاهرة تعدد الأشكال للجين الواحد Gene polymorphism [7]. يعرف الأنترفيرون-كاما (IFN- γ) Interferon-gamma على أنه بروتين سكري ذو وزن جزئي يتراوح بين 17-25 كيلو دالتون [8]، ويميز لأول مرة عام 1965م كوحدة كاملة في خلايا Murine kupffer cell والخلايا البلعمية Macrophages، ويسمى عامل الحث IFN- γ inducing factor (IGIF) [9]، ويعرف أيضاً بأنترفيرون النوع الثاني Type II interferon أو عامل تفعيل الملتهمات الكبيرة Macrophage-activating factor (MAF). الأنترفيرون-كاما يدعم الجهاز المناعي لغرض انجاز التحلل الخلوي للخلايا المستهدفة وكذلك وثق بأنه يزداد في مرضى داء السكري- النوع الأول [10]. يحفز إنتاج الأنترفيرون-كاما بواسطة خلايا Th1 الفعالة وخلايا $CD4^+$ وخلايا $CD8^+$ ، كما تنتج بواسطة خلايا NK cell وخلايا Cytotoxic T cells (CTLs) وأيضاً يحث إنتاجه بواسطة IL-12 و IL-18 [11]. أن الأمراض Pathogenesis لداء السكري لها علاقة بالوسيط IFN- γ المنتج من قبل Th1، بينما الحماية من هذا المرض فله علاقة مع خلية Th2 التي تنتج الوسائط من الحركات الخلوية مثل الأنترولوكين الرابع (IL-4) Interleukin-4 والأنترولوكين العاشر (IL-10) Interleukin-10 [12,13,14]. يعد بروتين الأنترفيرون-كاما (IFN- γ) Interferon-gamma والذي يعرف أيضاً بأنترفيرون النوع الثاني Type II interferon أو عامل تفعيل الملتهمات الكبيرة (MAF) Macrophage-activating factor من الحركات الخلوية الناتجة من خلايا T المساعدة النوع الأول (TH1) Type 1 helper cells والذي يدعم الجهاز المناعي لانجاز التحلل الخلوي للخلايا المستهدفة وكذلك وثق بأنه يزداد في مرضى داء السكري [10]. يؤدي مستضد البيضاويات Human Leukocyte Antigen (HLA) المكافئ لمعقد التوافق النسيجي Major histocompatibility (MHC) complex دوراً رئيسياً في وراثه داء السكري- النوع الأول مع وجود علاقة للخلفية الوراثية للمصابين بهذا الداء، وأن خطورة وتطور الداء تكون مرتبطة مع معقد HLA الذي يكون مكافئاً لمعقد التوافق النسيجي الواقع على الذراع القصير لكروموسوم رقم 6 بمسافة 21.1-21.3 [15]. أظهرت الدراسات الوراثية بأن الجين المسؤول عن السيطرة الوراثية للأنترفيرون-كاما IFN- γ يقع على الذراع الطويل للكروموسوم 12 في الموقع 12q15 [16]. لظاهرة تعدد الأشكال المظهرية Polymorphism للجين دوراً في تنظيم تعبير الحركات الخلوية، ويعتقد من خلال دراسة تعدد الأشكال المظهرية أن جين الأنترفيرون-كاما IFN- γ له القابلية في التأثير في الأمراض المناعية Immune diseases [17]. تعدد الأشكال المظهرية في الأنترون الأول Intron-1 لجين IFN- γ بأن له القابلية في التأثير في مرض المعقد المناعي Immune complex disease، والذي شخص بواسطة عدم التوازن في أنظمة التنظيم المناعي Immunoregulatory systems [17]. الدراسات الوراثية في العراق قليلة نوعاً ما لاسيما في جانب تعدد الأشكال المظهرية Polymorphism

للجينات المسببة للأمراض الوراثية وأمراض المناعة الذاتية Autoimmune diseases، ولأجل إجراء هذه الدراسة أستخدمت في الدراسة تقانة نظام الممانعة للتضخيم (ARMS-Amplification refractory mutation system) PCR لتحليل تعدد الأشكال للطراز الوراثي للفرد باستعمال بادئات خاصة ويتم من خلالها تحديد الأليل مع حساب تكراراتها في الجين للعينات المدروسة [18] وتهدف الدراسة إلى تعيين تركيز بروتين الحركي الخلوي Cytokines هو IFN- γ باستعمال طريقة الامتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم (ELISA) Enzyme linked immunosorbent assay بعد فصل المصل من دم العينات المدروسة، ومعرفة تعدد الأشكال المظهرية للجين IFN- γ T/A +874 باستعمال نظام الممانعة للتضاعف بتقانة ARMS-PCR بعد عزل الدنا DNA من العينات المدروسة لمعرفة مدى علاقتها بذلك الداء.

المواد وطرائق العمل

جمع عينات دم المرضى المصابين بداء السكري-النوع الأول

جمعت 35 عينة دم من الأطفال المصابين بداء السكري- النوع الأول و15 عينة من الأطفال الأصحاء (المجموعة القياسية) من مستشفيات الطفل المركزي ومركز مرضى السكري في بغداد-العراق للمدة من تموز من عام 2014 ولغاية تشرين الأول من العام نفسه وتتراوح أعمار الأطفال من 7-12 سنة. جمع الدم في أنابيب خاصة بجمع الدم بحجم 5 مليلتر بدون مانع للتخثر والتي أستخدمت في دراسات تعيين تركيز الحركيات الخلوية بجهاز ELISA وفي أنابيب بحجم 2.5 مليلتر حاوية على EDTA كمانع لتخثر الدم والتي أستخدمت في استخلاص الدنا DNA، وشخصت العينات من قبل المختصين في وحدة السكري في مستشفى الطفل المركزي وفي مركز مرضى السكري. تضمنت أستمارة خاصة جمعت فيها معلومات عن الأطفال المرضى والأصحاء.

عدة تشخيص الحركيات الخلوية Interleukins kits

استعملت عدة عدد تشخيصية خاصة بالكشف عن الحركي الخلوي الأنترفيرون- كما Interferon gamma (IFN- γ) mini ELISA development kit والمصنعة من قبل شركة Peprotech الأمريكية.

خليط تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR mix

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

البادئات Primers

صنعت ثلاث من البادئات الخاصة في شركة Alpha DNA الكندية وبحسب الطلب في الكشف عن جين IFN- γ T/A +874 وبحسب المصدر [19]. البادئ Specific A تسلسله النيكلوتيدي هو 5'- TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3' والبادئ Specific T تسلسله النيكلوتيدي هو 5'- TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3' بينما البادئ Antisense تسلسله النيكلوتيدي هو 5'- TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'. أذيت جميع البادئات في أعلاه باستعمال الماء الخالي من أنزيم النيوكليز Nuclease-Free water وبحسب النشرة المرفقة من قبل الشركة المصنعة.

معلومات الوزن الجزيئي للدنا DNA molecular weight markers

استعمل المعلم الجزيئي Molecular marker المصنوع من قبل شركة Promega بحجم كلي 1.5 كيلو قاعدة (1500 زوج قاعدة) وبدرجات 100 زوج قاعدة.

تعيين تركيز بروتين الحركي الخلوي IFN- γ باستعمال جهاز ELISA

1. عزل المصل من العينات المدروسة

وضع 2.5 مليلتر من كل عينة دم مسحوبة حديثاً في الأنابيب الخالية من المادة المانعة لتخثر الدم ونبذت مركزياً بجهاز النبذ المركزي وبسرعة 1500 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق. عزل المصل Serum من جميع الأطفال المصابين بداء السكري-النوع الأول والأطفال الأصحاء (العينة القياسية) المشمولين بالدراسة، ووضع المصل في أنابيب نظيفة وجديدة محكمة الغلق وخن تحت درجة 20-° م لحين الأستعمال.

2. قياس تركيز الحركي الخلوي IFN- γ في مصل المصابين

عين تركيز الحركي الخلوي IFN- γ باستعمال جهاز ELISA، واتبعت طريقة العمل المعتمدة على المعايرة القياسية المجهز من قبل شركة Biotech الأمريكية وبحسب النشرة المرفقة مع العدة. قبل إجراء عملية تعيين تراكيز الحركي الخلوي IFN- γ وضعت المحاليل والعينات بدرجة حرارة الغرفة 25° م ولمدة 30 دقيقة قبل بدء القياس بجهاز ELISA. حصل على الكثافة البصرية (O.D) Optical density للحركي الخلوي IFN- γ المدروس في أمصال عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية باستعمال جهاز ELISA، وسجلت نتائج العينات المدروسة بواسطة تسقيط القراءات على المنحنى القياسي Standard curve لغرض استخراج تركيز IFN- γ المشمولة بهذه الدراسة، ويبين الشكل (1) المنحنى القياسي ومعدلاته المستعملة لاستخراج تراكيز الحركي الخلوي IFN- γ .

استخلاص الدنا الكلي من دم عينات المرضى المصابين بداء السكري-النوع الأول والعينة القياسية

عزل الدنا من عينات الدم المأخوذة من الأطفال المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية باستعمال العدة ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System والخاصة بعزل الدنا DNA والمصنعة من قبل شركة Promega الأميركية وبحسب النشرة المرفقة. عين تركيز ونقاوة الدنا باستعمال جهاز Nanodrop باستخراج نسبة A₂₆₀/A₂₈₀ وأن الدنا النقي تكون قيمة نسبة الامتصاص له هي 1.8 ± 0.1 [20]. حفظت العينات بعد ذلك تحت حرارة - 20 °م لحين الاستعمال.

الكشف عن جين +874 *IFN-γ* T/A

استعملت في هذه الدراسة طريقة ARMS-PCR في الكشف عن جين +874 *IFN-γ*. حضر الخليط الأساسي Master Mix للبوادئ المستعملة وبحسب طريقة [19] مع بعض التحوير. استعمل Go Taq® Green Master Mix المزود من شركة Promega الأميركية بحجم 12.5 مايكرو لتر وبتركيز 1X والبادئ Primer بحجم 1 مايكرو لتر وبتركيز 1 مايكرومولر ولكل بادئ وقالب الدنا DNA template بحجم 2 مايكرو لتر وبتركيز 100 نانوغرام وكان الحجم الكلي للتفاعل 25 مايكرو لتر. استعمل البادئ A Specific و Antisense للكشف عن الأليل A والبادئ T Specific و Antisense للكشف عن الأليل T. وضعت العينات في جهاز التدوير الحراري Thermocycler لغرض تضخيم الدنا وضبط برنامج الجهاز للحصول على ظروف التفاعل. مرحلة مسخ قالب الأول Denature template بدرجة حرارة 95 °م ولمدة 3 دقائق والمسخ الأبتدائي الأول First initial denaturation بدرجة حرارة 95 °م لمدة 15 ثانية والتحام البادئ الأول First annealing بدرجة حرارة 65 °م ولمدة 50 ثانية والاستطالة الأولى First extension بدرجة حرارة 72 °م لمدة 40 ثانية وكانت مراحل المسخ الأبتدائي والتحام البادئ والاستطالة الأولى كانت لـ 10 دورات. والمسوخ الأبتدائي الثاني Second initial denaturation بدرجة حرارة 95 °م لمدة 50 ثانية والتحام البادئ الثاني Second annealing بدرجة حرارة 55 °م ولمدة 50 ثانية والاستطالة الثانية Second extension بدرجة حرارة 72 °م لمدة 50 ثانية وكانت مراحل المسخ الأبتدائي والتحام البادئ والاستطالة الثانية كانت لـ 20 دورة. الاستطالة النهائية Final extension بدرجة حرارة 72 °م لمدة 7 دقائق. حملت نواتج تضخيم الدنا الناتج من استعمال البادئات أعلاه لعينات الدنا للأطفال المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية في المكان المخصص لها في هلام الأكاروز بتركيز 1.5% (حضر هلام الأكاروز بأذابة 0.6 غرام من الأكاروز في 40 مليلتر من دارئ Tris-borate buffer (TBE) بتركيز 1X. سخن الخليط عند درجة حرارة 60 °م باستعمال الصفيحة الساخنة Hot plate وحتى ذوبان الخليط وصب في حوض الترحيل المخصص). حمل الواصم الجزئي الوراثي بحسب النشرة المرفقة معه الذي كان بحجم 1.5 كيلو قاعدة. أضيفت صبغة التحميل البروموفينول الأزرق الخاصة بالترحيل الكهربائي Bromophenol blue في كل عينة بحجم 3 مايكرومليلتر (حضرت صبغة التحميل بأذابة 25 ملليغرام من صبغة البروموفينول الأزرق في 6.7 مليلتر من الماء المقطر. أضيف 25 ملليغرام من صبغة Xylene cyanol FF و 3.3 مليلتر من الكليسرول Glycerol ليصبح الحجم النهائي 10 مليلترات. حفصت الصبغة تحت درجة -20 °م لغرض الاستعمال الطويل الأمد). رحلت العينات كهربائياً من القطب الأسود السالب باتجاه القطب الأحمر الموجب تحت جهد كهربائي 75 فولتاً ولمدة من 3-4 ساعات وباستعمال دارئ Tris-borate buffer (TBE) (حضر 10X من هذا الدارئ لغرض استعماله في عملية الترحيل الكهربائي وذلك بأذابة 108 غرام من مادة Tris base و 55 غراماً من حامض البوريك Boric acid و 40 مليلتر من مادة Ethelene diamine tetra acetic acid (EDTA) بتركيز 0.5 مولاري. أضيف الماء المقطر المعقم وصولاً إلى لتر واحد مع تعديل الأس الهيدروجيني pH إلى 8). صبغ هلام الأكاروز بصبغة الأثيديوم برومايد Ethidium bromide (EtBr) لمدة 15 دقيقة (حضرت صبغة الأثيديوم برومايد من المحلول الخزين للصبغة الذي يكون بتركيز 10 ملليغرام/مليلتر وحضرت بأذابتها في الماء المقطر للحصول على تركيز 0.5 مايكروغرام/مليلتر). شوهدت وصورت قطع الدنا المتضخمة بواسطة جهاز توثيق الهلام Gel documentation system المزود بكاميرا خاصة.

التحليلات الإحصائية

حللت البيانات باستعمال البرنامج الاحصائي (SPSS) Statistical Package for Social Sciences، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبارات Mann-Whitney U وفشر Fisher's تحت مستوى احتمالية $P < 0.05$. حللت تكرارات الأنماط الوراثية وأليلاتها والنسبة الحرجة Odds ratio (OR) ومدة الثقة Confidence Intervals (CI) باستعمال البرنامج Compare 2 Ver.3.04 والمصنع من قبل J. H. Abramson عام 2003-2013، وكما حللت النتائج باستعمال قانون التوازن هاردي-واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium وبحسب البرنامج الموجود في الموقع الإلكتروني www.had2know.com.

النتائج والمناقشة

عينات المصابين بداء السكري النوع الأول والعينة القياسية

شملت الدراسة على 50 عينة دم مأخوذة من أطفال تراوح متوسط أعمارهم من 7-12 سنة، وشملت الدراسة على 35 عينة دم (18 ذكراً و17 من الإناث)، لأطفال مصابين بداء السكري- النوع الأول، إذ كان متوسط أعمارهم 9.4 ± 0.34 سنة، كما شملت الدراسة على 15 عينة دم (9 ذكور و6 من الإناث) لأطفال أصحاء ظاهرياً التي عدت كعينات قياسية وكان متوسط أعمارهم 10.9 ± 0.38 سنة. أجريت دراسة مناعية ووراثية على عينات الدم المأخوذة من الأطفال المصابين والأصحاء (العينة القياسية).

تعيين تركيز الأنترفيرون- كما (Interferon-gamma (IFN- γ)

فُدرت مستويات تركيز الحركي الخلوي IFN- γ في العينات المدروسة باستعمال جهاز الأليزا Elisa. يبين الجدول (1) ارتفاعاً ملحوظاً في تركيز الأنترفيرون- كما في مصل المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية (الأصحاء)، إذ بلغ التركيز في مصل دم المصابين 1.575 بيكوغرام/مليتر، بينما كان تركيزه في العينة القياسية 0.921 بيكوغرام/مليتر (الشكل 2). نتائج التحليل الاحصائي باستعمال اختبار Mann-Whitney U قد أظهر وجود فروق معنوية في تركيز للأنترفيرون- كما بين الأطفال المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية وتحت مستوى احتمالية $P < 0.05$ ، إذ بلغت قيمة الاحتمالية 0.035. توضح نتائج هذه الدراسة التي بينت وجود مستويات عالية في تركيز الأنترفيرون- كما لدى المصابين بداء السكري- النوع الأول مدى الدور الذي يؤدي في تحطم خلايا بيتا في الأطفال المصابين بداء السكري- النوع الأول، وهذه النتائج تتوافق مع النتائج التي حصل عليها كل من [24,23,22,21]، إذ حصلوا على تراكيز عالية من الأنترفيرون- كما لدى عينات المرضى بالمقارنة مع العينات القياسية (الأصحاء). هناك العديد من الدراسات التي تدعم هذه النتائج وتبين مفهوماً واضحاً في أن خلية بيتا المتحطمة مرتبطة مع زيادة تعبير الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب مثل IL-12، IL-1، IL-2، TNF- β ، TNF- α ، IFN- γ ، TNF- α ، INF- α [25]، كما تبين الدراسات أن هناك حركيات خلوية معينة يكون دورها الوظيفي دوراً سميماً لخلايا بيتا في البنكرياس مثل IFN- γ ، TNF- β و IL-1، وتسبب هذه الحركيات الخلوية الركود الخلوي Cytostatic لخلايا الجزيرات في البنكرياس مثل تثبيط صناعة الأنسولين وأفراده، لكن إذا تم التخلص وأزالة هذه الحركيات الخلوية فإن الوظائف المؤثرة في خلايا الجزيرات سوف تزال، فضلاً عن أن هذه الحركيات الخلوية يمكن أن تؤدي دوراً خلوياً قاتلاً Cytocidal لخلايا بيتا في جزيرات البنكرياس، مما ينتج عنه تحطماً لخلايا بيتا عند الأطفال المصابين بداء السكري- النوع الأول [26].

الحركيات الخلوية ومن ضمنها الأنترفيرون- كما تعمل على حث وتعجيل تحطم خلايا بيتا في داء السكري- النوع الأول، وتكون ميكانيكية التحطيم أما بصورة مباشرة أو غير مباشرة ميكانيكية التحطم المباشر تحت حركيات الخلوية Th1 والمتضمنة الأنترفيرون- كما التي تظهر تأثيراتها أما بصورة أولية 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 أكسيد النتريك Nitric oxide وجذور الأوكسجين Oxygen radicals [27]، أو من خلال زيادة حث ترشيح خلايا CD8⁺T داخل cell نسيج البنكرياس، وأن الأنترفيرون- كما ينظم تعبير MHC calls I الذي يميز للقتل الذي تتوسطه خلايا TCD8⁺ المتفعلة ضد الذات التي تؤدي إلى تحطم نسيجي حاد لخلايا بيتا في الإنسان [29,28]. يسرع IFN- γ من تحطم خلايا بيتا بألية مباشرة أو غير مباشرة. في الألية المباشرة تظهر وسائط Th1 من ضمنها IFN- γ تأثيرات في الخلايا البلعمية Microphage وبحثها على الترشيح في خلايا جزيرات البنكرياس، إذ سوف يسرع من تدمير خلايا بيتا من خلال الوسائط المصنعة في المسلك الجديد مثل جذور الأوكسجين الحرة وأوكسيد النتريك، أو يستحث الخلايا التائية لتميز الجزيرات الحاملة للـ MCHI وتميز من قبل خلايا CD8 حصراً، ونظراً لزيادة تعبير الوسائط IFN- γ و TNF مما يؤدي إلى زيادة التدمير في النسيج لخلايا بيتا في كل من الإنسان والفئران [30]. وهناك عدة آليات تشترك في تثبيط مستوى منتوج وفعالية Th2 وذلك من خلال زيادة أعداد الخلايا التائية المفعلة ضد الذات وتثبط منتوج الوسائط المضادة لفعال IFN- γ مما يزيد التعبير عن هذا الوسيط الخلوي المدمر لخلايا بيتا [31]. هذه النتائج لم تتوافق مع [24] وذلك لعدم حصوله على فروق معنوية في تركيز الأنترفيرون- كما لدى المصابين بداء السكري- النوع الأول، وقد أوضح الباحث وجماعته بأن الحركي الخلوي الأنترفيرون- كما يكون تركيزه غير متغير في مرضى داء السكري- النوع الأول.

التعدد الشكلي لجين الأنترفيرون- كما (Interferon-gamma (IFN- γ)

درس تعدد الأشكال الوراثية Genetic polymorphism لجين IFN- γ في المرضى المصابين بداء السكري النوع- الأول ومقارنتها بعينات الأصحاء (العينات القياسية) باستعمال تقانة ARMS-PCR. أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لجين +874 T/A IFN- γ المتضخم بهذه التقانة إلى وجود أليلين هما T و A وإلى وجود ثلاثة أنماط وراثية هي TT، TA و AA في عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية، فعند 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 3 و 4 على التوالي، ولم نضع جميع الأشكال لعينات المصابين والعينات القياسية لكثرتها وتشابهها ونكتفي بوضع شكل واحد لكل من عينات المصابين والعينات القياسية لغرض توضيح كيفية تعيين الأليلات والأنماط الوراثية في العينات المدروسة. أظهرت نتائج التوزيع التكراري للأليلين T و A لجين +874 T/A IFN- γ وباستعمال قانون التوازن هاردي-

واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium نتائج متغيرة ما بين عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية، أذ 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 5). كذلك يبين الجدول (2) أن التوزيع التكراري قد اختلف معنوياً بين عينة المصابين والعينة القياسية، وتبين النتائج بأن الأليل A أظهر تكراراً معنوياً لدى المصابين بنسبة أعلى من العينة القياسية باستعمال اختبار فشر Fisher's test، وكانت النسبة الحرجة Odds ratio (OR) هي 2.60 مع فترة ثقة Confidence Intervals (CI) تحت نسبة 95% قيمة تراوحت بين 1.03-6.53، وكانت نسبته كأليل مسبب Etiological faction (EF) (عندما تكون النسبة الحرجة أكثر من واحد) ومرتبطة مع المرض بلغت 0.299، بينما أظهر الأليل T تكراراً معنوياً لدى العينة القياسية بنسبة أعلى 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 faction (PF) (عندما تكون النسبة الحرجة أقل من واحد) بلغت 0.451. تتفق هذه النتائج مع ما حصل عليها كل من [19, 32, 33, 34] من حيث حصولهم على نتائج متوافقة مع نتائج الدراسة الحالية التي تظهر أن نسبة الأليل A كان أعلى لدى المرضى بالمقارنة مع العينة القياسية، بينما أظهر الأليل T نسبة أعلى لدى العينة القياسية. أن التكرار العالي للأليل A وبصورة معنوية لدى المصابين يبين مدى الدور الكبير الذي يؤديه هذا الأليل مع خطر الإصابة بداء السكري- النوع الأول، بينما أنخفاض تكرار الأليل T لدى المصابين وأرتفاعه لدى العينة القياسية يبين مدى أهمية هذا الأليل كعامل وقائي من خطر الإصابة بهذا الداء. أن هذه النتائج قد أكدتها العديد من الدراسات التي تبين بأن الأليل A ربما يكون مؤشراً مهماً في خطر تطور المرض وتحطم خلايا بيتا، واقترح أن التعدد الشكلي للأليل T ربما ليس مهماً مع تطور داء السكري- النوع الأول وإنما يمكن أن يكون كمؤشر وقائي من خطر الإصابة بالمرض [34]. دراسة أخرى أهتمت بمدى ارتباط التعدد الشكلي للجين $IFN-\gamma$ +874 T/A مع داء السكري- النوع الأول أظهرت وجود تكرار معنوي للأليل A وارتباطه مع خطر الإصابة بداء السكري، بينما أظهرت تلك الدراسة تكراراً عالياً للأليل T في العينة القياسية، واقترح أن يكون هذا الأليل كأليل وقائي من خطر الإصابة بهذا الداء [35]. لا تتفق هذه النتائج مع نتائج الدراسة التي قام بها أرابابادي وآخرون [36] الذين بينوا أن تكرار الأليل T ربما يرتبط مع خطر الإصابة بداء السكري- النوع الأول، والأليل A يكون مرتبطاً مع الجانب الوقائي من داء السكري، لكن هذه النتائج لا تتفق مع أغلب الدراسات التي أجريت على جين $IFN-\gamma$ T/A +874 في داء السكري- النوع الأول.

أظهرت نتائج التحليل الوراثي لنتائج تقانة ARMS-PCR للجين $IFN-\gamma$ T/A +874، وباستعمال قانون التوازن هاردي-واينبرك Hardy-Weinberg equilibrium ثلاثة أنماط وراثية لدى عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية وهي TT، TA و AA. بينت النتائج وجود تباين في تكرار الأنماط الوراثية ما بين عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية، إذ أظهر النمط الوراثي TT نسبة أعلى لدى العينة القياسية بالمقارنة مع عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول وكانت النسب 60% و 22.9% 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. أظهر الطراز الوراثي TA نسبة أعلى لدى عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية وكانت النسب 57.1% و 26.7% وعلى التوالي، وبين التحليل الأحصائي عند استعمال اختبار فشر Fisher's test بأن 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 مرتبط مع خطر الإصابة بداء السكري، إذ بلغت قيمته 0.416. أظهر النمط الوراثي AA نسبة أعلى لدى عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول بالمقارنة مع العينة القياسية وكانت النسب 20% و 13.3% 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 مرتبط مع خطر الإصابة بداء السكري، إذ بلغت قيمته 0.770، كما في الشكل (6) والجدول (3).

من خلال النتائج أعلاه يتبين أن الطراز الوراثي متباين الزيجة TA والطراز الوراثي متمائل الزيجة AA يرتبطان مع خطر وتطور الإصابة بداء السكري- النوع الأول لدى عينة المصابين، ولكن نسبة ارتباط الطراز الوراثي TA مع خطر الإصابة بداء السكري كانت أعلى من نسبة ارتباط الطراز الوراثي AA مع هذا الداء. لذا يتبين أن الطراز الوراثي TA يمكن أن يعتمد عليه كمؤشر مع خطر الإصابة بالداء، وهذه النتائج ربما تكون مرتبطة مع النتائج المناعية للمستويات العالية والمعنوية لمستوى تركيز $IFN-\gamma$ في مصل دم عينات المصابين بداء السكري- النوع الأول المدروسة مقارنة بالعينة القياسية، وبصورة عامة تبين النتائج الوراثية والمناعية مدى أهمية جين $IFN-\gamma$ مع خطر تطور الإصابة بداء السكري- النوع الأول، ويتبين من النتائج أيضاً أن النمط الوراثي TT المتمائل الزيجة Homozygote يكون أقل خطورة في مرضى السكري- النوع الأول، وهذه النتائج تدل على أهمية دور الطراز الوراثي TT كنمط وراثي وقائي من الإصابة بداء السكري، بالمقارنة مع النمط الوراثي TA الذي أظهر كنمط وراثي مرتبط مع خطورة الإصابة بالداء. هذه النتائج جاءت لتؤكدها العديد من الدراسات وتتفق معها، إذ أتفقت مع نتائج كل من [33, 34] من حيث حصولهم على نسب عالية من الأنماط الوراثية AA و TA لدى عينة المصابين بالمقارنة مع العينة القياسية، وأن تكرار النمط الوراثي TT لدى

العينة القياسية أعلى من عينة المصابين، وأن العديد من الدراسات تبين أن زيادة تعبير جين $IFN-\gamma$ في المصابين بداء السكري- النوع الأول يعمل على زيادة تقدم وظهور المستضدات الذاتية في خلايا بيتا المستهدفة بواسطة الخلايا البلعمية الكبيرة Macrophages والخلايا المتفرعة DCs [37]. كذلك هناك دراسات أخرى أظهرت أن الحركيات الخلوية بادئة الالتهاب مثل $IFN-\gamma$ ، $IL-1\beta$ و $TNF-\alpha$ تمتلك استجابة مناعية موجهة ضد خلايا بيتا في البنكرياس وزيادة تعبيرها يعمل على تفاقم موت خلايا بيتا [39,38]. وكذلك تظهر البيانات في دراسات أخرى أن زيادة التعبير لجين $IFN-\gamma$ يكون له دور كبير في أحداث وتطور داء السكري- النوع الأول [40]. هناك أدلة كثيرة تدعم هذه الدراسات، فإذا تم غلق تعبير جين $IFN-\gamma$ من خلال غلق مستقبلات $IFN-\gamma$ فإن خطر الإصابة بالداء سوف يقل [41]. وفي دراسة أخرى لجين $IFN-\gamma$ عند الموقع +5644 UTR في المرضى الأيرانيين المصابين بداء السكري- النوع الأول، وجد أن التعدد الشكلي لهذا الموقع الجيني يمتلك ارتباطاً سلبياً مع الداء، ويعد هذا الموقع كمؤشر وقائي في المقاومة من داء السكري- النوع الأول [42]. لكن أظهرت دراسات أخرى أن زيادة تعبير أنتاج $IFN-\gamma$ في المصابين بداء السكري- النوع الأول يكون له فعالية سمية لخلايا بيتا، كذلك حث أنتاج $IL-2$ ويعمل $IFN-\gamma$ على تنشيط الخلايا البلعمية Macrophage لغرض تحطيم خلايا بيتا [43].

المصادر

1. American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care.33 supplement.1.S062.
2. 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.
3. Betterle, C. and Zanette, F. (1984). Clinical and subclinical organ-specific autoimmune manifestations in type1 (insulin-dependent) diabetic patient and their first-degree relatives. Diabetology. 26(6):431-436.
4. Atkinson, M. A. and Maclaren, N. K. (1994). The pathogenesis of insulin-dependent diabetes. Diabetes/metabolism reviews. 14(1):31-67.
5. American Diabetes Association. (2008). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care.27 supplement. 1.S60.
6. Cooke, D. W. and Plotnick, L. (2008). Type 1 diabetes mellitus in pediatrics. Pediatr. Rev. 29:374-385.
7. Daneshmandi, S. ; Pourfathollah, A. ; Arababadi, M. K. ; Hassanshahi, G. ; Razaecian, M. and Asiabanha, M. (2008). Evaluation of relation between $IL-4$ and $IFN-\gamma$ polymorphism and type 2 diabetes. J. Maz. Univ. Med. Sci. 18:35-41.
8. Curfs, J. ; Meis, J. F. and Korstanje, J. A. (1997). A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. Clini. Microbiol. Revi. 10(2):742-780.
9. Feghali, C. A. and Wright, M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. Frontiers in Biosci. J. 2(1):12-26.
10. 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.
11. Schroder, K. ; Hertzog, P. ; Ravasi, T. and Hume, D. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanism and functions. J. Leukocyte Biol. 75:163-189.
12. 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.
13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. Hardy, M. P. ; Owczarek, C. ; Jermin, L. ; Ejdeback, M. and Hertzog, P. (2004). Characterization of the type1 interferon locus and identification of novel genes. *J. Genomics.* 84(2):331-345.
17. 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.
18. Duta-Cornescu, G. ; Simon-Gruitu, 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.
19. Elsaid, A. ; Helaly, M. A. ; Hatata, E. ; Fouda, E. Z. and Settin, A. (2012). *TNF- α* -308 and *IFN- 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.
20. Clark, M. S. (1997). In: *Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual*, pp 305-328, Springer-Verlog Berlin Heidelberg, New York.
21. Findan, 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.
22. 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.
23. Jasem, M. A. (2013). Autoantibodies and cytokines levels in type1 diabetes patients. *Iraqi Postgrad. Med. J.* 12(3):351-358.
24. 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.
25. 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.
26. 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: 97-103.
27. 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. Clin. Endocrinol. Metabolism.* 85: 830-836.
28. Kukreja, A. and Maclaren, N. (1999). Autoimmunity and diabetes. *J. Clinical. Endocrinol. Metabolism.* 84: 4371-4378.
29. 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.

30. Amrani, A. ; Verdaguer, J. ; Thiessen, S. ; Bon, S. and Santamaria, P. (2000). IL-1 α ; IL-1 β and IFN- γ mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4⁺ T-lymphocytes. J. Clin. Invest. 105: 459-468.
31. Faust, A. ; Rothe, H. ; Schade, U. ; Lampeter, E. and Kolb, H. (1996). Primary non function of islet grafts in autoimmune diabetic nonobese diabetic mice is prevented by treatment with interleukin-4 and interleukin-10. J. Transplantation. 62: 648-652.
32. Rafinejed, A. ; Niknam, M. H. ; Amirzargar, A. A. ; Khosravi, F. and Larijani, B. (2004). Association of IFN- γ gene polymorphism with type1 diabetes in Iranian patients. Med. Sci. 1(2):130-132.
33. 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- β 1, TNF- α , and IL-6 Show association with Type 1 diabetes mellitus in the Slovak population. J. Immunol. 58:385-393.
34. Bazzaz, J. T. ; Amoli, M. M. ; Taheri, Z. ; Larijan, B. ; Pravica, V. and Hutchinson, I. V. (2014). TGF- β 1 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.
35. 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.
36. Arababadi, M. K. ; Pourfathollah, A. ; Daneeshmandi, S. ; Hassanshi, G. ; Rezazadeh, E. ; Shamsizadeh, A. ; Rezaei, M. and Eigder, S. (2009). Evaluation of relation between IL-4 and IFN- γ polymorphism and type2 diabetes. Iranian J. 12(2):100-104.
37. 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.
38. Eizirik, D. L. and Mandrup-Poulsen, T. (2001). A choice of death: the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. J. Diabetol. 44:2115-2133.
39. Eizirik, D. L. ; Colli, M. L. and Ortis, F. (2009). The role of inflammation in insulinitis and betacell loss in type 1 diabetes. Nat Rev Endocrinol. 5:219-226.
40. 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.
41. 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. 185:1573-1584.
42. Akalin, E. and Murphy, B. (2001). Gene polymorphisms and transplantation. J. Curr. Opin. Immunol. 13(5):572-6.
43. 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. Endokrynol. Diabetol. Chor. Przemiany Materii Wieku Rozw. 8(1):29-34.

جدول (1): تركيز IFN- γ في مصل العينات المدروسة

الأحتمالية P	حدود الثقة		العينة القياسية المتوسط±الخطأ القياسي بيكو غرام/مليتر	حدود الثقة		العينة المرضية المتوسط±الخطأ القياسي بيكو غرام/مليتر	الحركي الخلوي
	أعلى قيمة	أقل قيمة		أعلى قيمة	أقل قيمة		
*0.035	1.102	0.405	0.178±0.921	1.778	1.076	0.179±1.575	IFN- γ

* = اختلاف معنوي عند مستوى احتمالية أقل من 0.05 بأستعمال اختبار Mann-Whitney U

جدول (2): تكرارات الأليلين T و A للجين IFN- γ T/A +874 في عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية

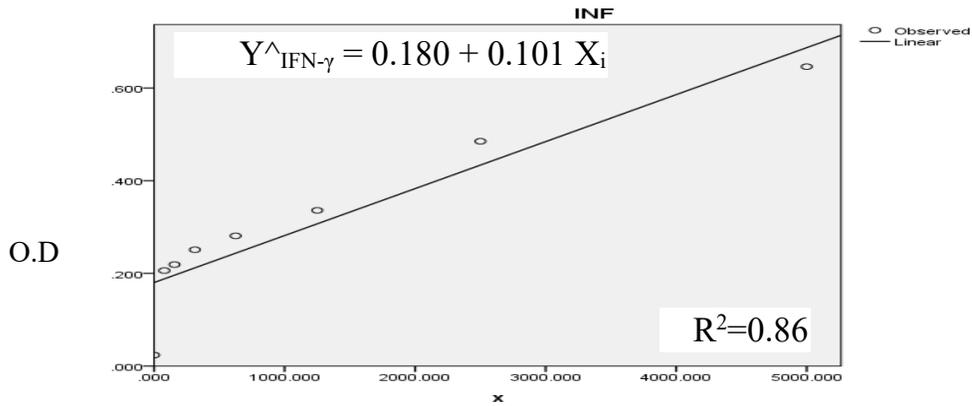
P value	(95%CI) OR	العينة القياسية العدد (%)	عينة المصابين العدد (%)	الأليل	الجين
*0.034	(97.0-0.15=CI) 0.39	(%73.3) 22	(%51.4) 36	T	IFN- γ T/A +874
	0.451			P.F	
	(53.6-1.03=CI) 2.60	(%26.7) 8	(%48.6) 34	A	
	0.299			E.F	

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

جدول (3): الأنماط الوراثية للجين IFN- γ T/A +874 في عينات المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية

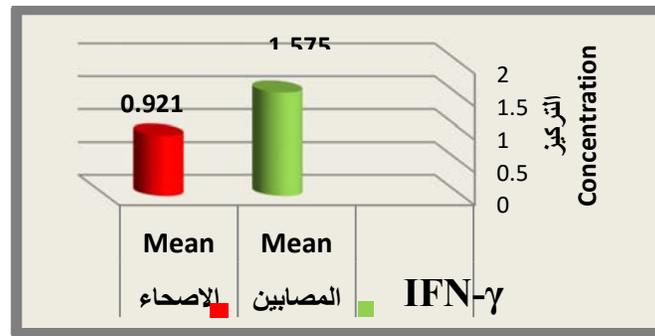
P value	(95%CI) OR	العينة القياسية العدد (%)	عينة المصابين العدد (%)	النمط الوراثي	الجين
*0.014	(0.70-0.06=CI) 0.20	(%60)9	(%22.9)8	TT	IFN- γ T/A +874
	0.481			P.F	
*0.047	(13.29-1.01=CI) 3.67	(%26.7)4	(%57.1)20	TA	
	0.416			E.F	
0.45	(8.49-0.31=CI) 1.63	(%13.3)2	(%20)7	AA	
	0.770			E.F	

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

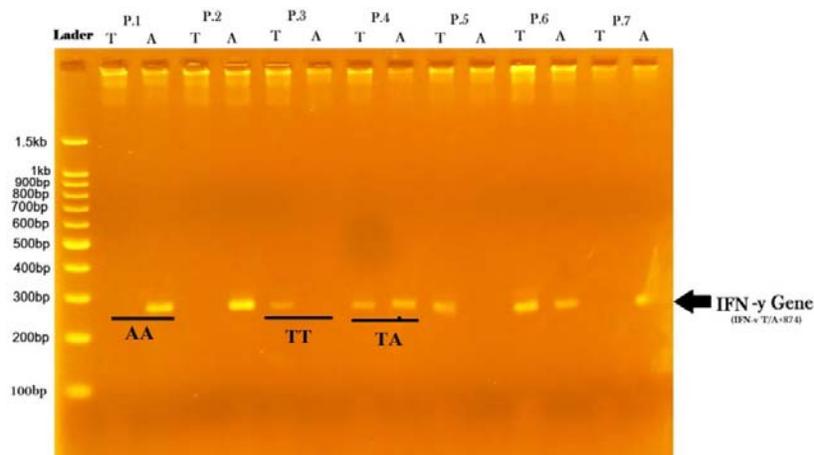


التركيز بيكوغرام/مليتر

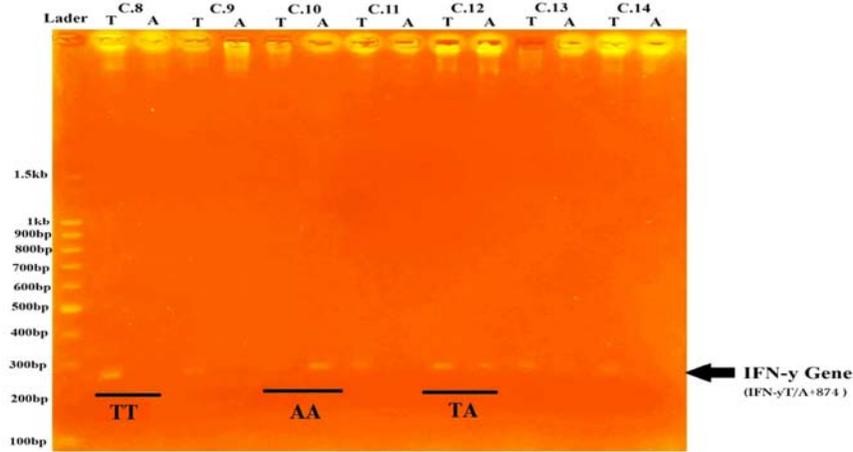
شكل (1): المنحنى القياسي الخاص بقياس تركيز IFN-γ



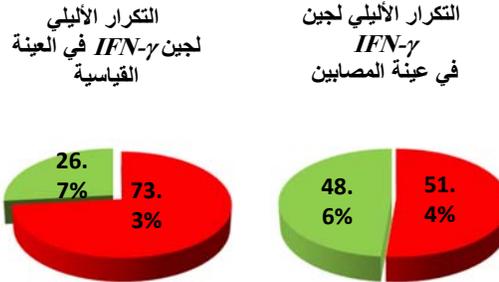
شكل (2): متوسط تركيز IFN-γ في مصل العينات المدروسة



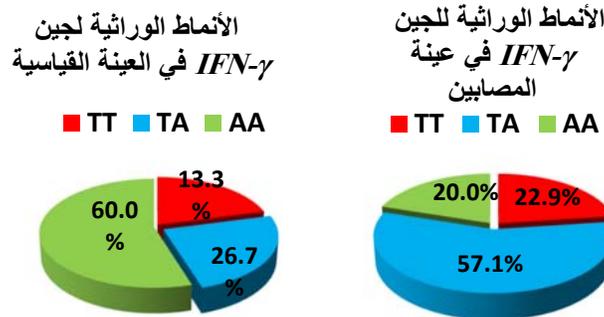
شكل (3): الترحيل الكهربائي لجين T/A +874 IFN-γ مبيناً فيه الأليلين T و A في عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول



شكل (4): الترحيل الكهربائي لجين $IFN-\gamma$ T/A +874 مبيناً فيه الأليلين T و A في العينة القياسية



شكل (5): تكرارات الأليلين T و A في عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية



شكل (6): تكرارات الأنماط الوراثية للجين $IFN-\gamma$ T/A +874 في عينة المصابين بداء السكري- النوع الأول والعينة القياسية

***IFN- γ* T/A +874 Gene Polymorphism in Type 1 Diabetes Mellitus of Iraqi Children**

Ihsan A. Hussein

Hazima M. AL-Abassi

Anwar A. Nasser*

Dept. of Biology, College of Education for Pure Science (Ibn - Al-Haithim),
University of Baghdad

Received in :1November 2015 Accepted in :15 December 2015

Abstract

This study included 50 blood samples collected from children with mean age 8-12 years. Thirty five blood samples were collected from children with Type 1 Diabetes Mellitus (T1D) with mean age 9.4 ± 0.34 years, and 15 blood samples collected from healthy children as a control sample with mean age 10.9 ± 0.38 years. Immunogenetic study was done on collected blood samples. Concentrations of *IFN- γ* were estimated from T1D patient and control samples by using Elisa instrument. The concentration of this interferon was 1.575 pg/ml in T1D patient sample in comparison with 0.921 pg/ml in control sample. Significant differences of this interferon concentration were found between T1D patient and control samples when Mann-Whitney U test was used. Gene polymorphism of *IFN- γ* T/A +874 gene was studied by using Amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) technique. The results of gel electrophoresis for *IFN- γ* T/A +874 gene revealed the presence of two alleles, A and T and three genotypes TT, TA and AA. The percentage frequency of T allele was higher from the A allele in T1D patient sample, whereas the percentage frequency of T allele was higher from A allele in control sample. The frequencies of A allele in T1D patient sample was significantly different with the same allele in control sample when Fisher's test was used. The odds ratio (OR) and confidence Intervals (CI) values showed that the A allele was etiological faction (EF) and correlated with the disease, whereas the T allele was significantly different in control sample in comparison with T1D patient sample when Fisher's test was used and become as preventive faction (PF). The results of ARMS-PCR technique for the *IFN- γ* T/A +874 gene were analyzed by using Hardy-Weinberg equilibrium. The TT genotype percentage in control sample was higher in comparison with the T1D patient sample and significant difference was found by using Fisher's test. The TT genotype revealed as preventive faction from the disease, whereas the TA genotype percentage was significantly different in T1D patient sample in comparison with control sample. The TA genotype also revealed as etiological faction and correlated with the disease. The percentage of AA genotype in T1D patient sample was higher in comparison with control sample with no significant differences and this genotype revealed as etiological faction and correlated with the disease.

Keywords: Interferon-gamma, Type 1 Diabetes Mellitus (), *IFN- γ* T/A +874, T1D

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