جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة مستوى بعض الحركيات الخلوية في المصل، تعدد اشكال الوراثية للنيكلوتيدة المفردة و الاصابة بالفايروس المضخم للخلايا في مرضى التهاب المفاصل الرثوي

اطروحة دكتوراه

مقدمة الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل

شهادة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة

تقدمت بها

ليلى حسن خيون

بأشراف

أ.د عباس عبود فرحان

أ.د دنيا فريد سلوم

1445 هـ

2023 م

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education And Scientific Research
University of Diyala
College of Education for Pure Science
Department of Biology

A study of some cytokines in serum, single nucleotide gene polymorphism and infection with cytomegalovirus in a Rheumatoid arthritis patients

A Dissertation Submitted to the Council of College of Education for Pure Science, University of Diyala in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biology

by

Layla Hassan Khayoun

Supervisor by

Prof.Dr Abbas Aboud Farhan **Prof.Dr Dunya Fareed Salloom**

1445 A.H 2023 A.D

1-المقدمة Introduction

التهاب المفاصل الرثوي Rheumatoid Arthritis(RA) :

التهاب المفاصل الرثوي (RA) هو اضطراب مناعي ذاتي التهابي مزمن يؤثر بشكل رئيسي على المفاصل الزليليّة في اليد والقدمين. يؤدي المرض إلى تدمير الغضاريف وتآكل العظام و يسبب تلفاً تدريجياً في المفاصل يمكن أن يؤدي إلى إعاقة مدى الحياة (Kuroda وآخرون ، 2012).

العوامل البيئية و الوراثية تعمل سوية على عدم توازن النظام المناعي وبدء المناعة الذاتية وهناك عدة عوامل تشكل خطورة في تطويرِ RA منها التدخين والجنس اذ يكون اكثر في النساء من الذكور (Littlejohn و Monrad ،2018).

يمكن ان تؤدي العدوى بالفايروس الى الاصابة بأمراض مختلفة منها تصلب الشرايين arteriosclerosis والتهاب القالون colitis ، التهاب المريء esophagitis ، سرطان القالون و المستقيم colorectal cancer ، سرطان المعدة gastric cancer ، الذئبة الاحمرارية الجهازية systemic lupus erythematosus و التصلب الجهازي systemic sclerosis ، مرض نسيج الضام المناعي الذاتي autoimmune connective tissue ، ورم عصبي neuroglioma و التهاب الشبكية retinitis (Moussawi وآخرون ،2018).

الفايروس المضخم للخلايا Cytomegalovirus، أحد أفراد عائلة فيروس الهربس بيتا β-herpesviruses ، الحامض النووي من نوع الدنا Deoxyribonucleic acid (DNA) ثنائي الشريط Double strand ولديه عدة مسميات مثل فايروس الغدد اللعابية ، المضخم

للخلايا البشري و فايروس الهربس البشري الخامس يصيب حوالي 60٪ من سكان العالم (Cannon وآخرون ، 2010) .

يتفاوت الانتشار المصلي للفايروس المضخم للخلايا ، حيث يتراوح بين 36 و 77٪ في الولايات المتحدة الأمريكية و أوروبا وأستراليا. بينما في البلدان النامية وخاصة أفريقيا و آسيا، تصل نسبة الاصابة بالفايروس تصل إلى 100 ٪ (Adland وآخرون،2015).

تلعب الحركيات الخلوية دوراً مركزياً في تنظيم الاستجابة المناعية، وقد تمنح طبيعة التعدد الشكلي SNP لجينات الحركيات الخلوية مرونة في الاستجابة المناعية ومنها الحركي الخلوي IL-12 و الحركي الخلوي IL-35. يتكون الحركي الخلوي IL-12 ، وهو سايتوكين مهم للالتهابات من وحدتين فرعيتين مرتبطتين بثنائي كبريتيد IL-12A و IL-12B ، ويوفر رابطاً وظيفياً بين الاستجابات المناعية الفطرية و المكتسبة ، IL-12 قد يكون عامل خطر مهماً للأمراض الالتهابية و أحد الجينات المرشحة في التسبب في التهاب المفاصل الرثوي (Carrion وآخرون، 2013).

اما الحركي الخلوي IL-35 يتكون من جزئيين , وهو حركي الخلوي مثبط anti-inflammatory cytokine ، قادر على قمع بشكل فعال زيادة الخلايا التائية وتحفيز إنتاج الخلايا التائية التنظيمية المستحثة (iTr35) للحد من الاستجابات الالتهابية. كما يلعب دوراً مهماً في السيطرة على الاضطرابات المرتبطة بالمناعة بما في ذلك أمراض المناعة الذاتية و الأمراض المعدية و السرطان (Ye وآخرون ،2021).

بروتين Resistin هو عامل مرتبط بمقاومة الانسولين والامراض المرتبطة بالسمنة وله دور في العمليات الالتهابية اذ يحفز خلايا البلعمة على انتاج IL-12 و TNF-α و له علاقة بأمراض المناعة الذاتية ومنها التهاب المفاصل الرثوي وداء الذئبة الاحمرارية الجهازية ، يرتبط

التهاب المفاصل الرثوي ارتباطًا وثيقًا بمستوى Resistin في مصل الدم (Huang وآخرون ،2015).

1-2 الهدف من الدراسة :-

هدفت هذه الدراسة الى :-

1-التحري عن الفايروس المضخم للخلايا Cytomegailovirus لدى المرضى المصابين بالتهاب المفاصل الرثوي ومجموعة السيطرة من خلال قياس وجود الاضداد IgM وIgG بتقنية الاليزا كعامل ممرض.

2-قياس مستوى الحركيات الخلوية IL-12 وIL-35 لدى المصابين بالتهاب المفاصل الرثوي ومجموعة السيطرة بتقنية الاليزا لغرض دراسة دورها في الامراضية المناعية للمرض، دراسة تعدد الاشكال للنيكلوتيدة المفردة Single Nucleotide Polymorphism للحركيات الخلوية IL-12 وIL-35 بطريقة Taq Man real time.

3-قياس مستوى بروتين Resistin لدى المجاميع الدراسية وعلاقته بالتهاب المفاصل الرثوي بتقنية الاليزا لكونه عامل مهم في العمليات الالتهابية .

Summary

The study samples were collected from Baghdad Teaching Hospital / The Joints Consolatory in Baghdad Gouvernante during the period Dec 15th 2021 to March 30th 2022. This study aimed to uncover the spread of Cytomegalovirus in the rheumatoid arthritis patients, study the immunological variance of IL-12 and IL-35, measuring Resistin protein levels, and the study of the genetic variance for the Single Nucleotide Polymorphism (IL-12 rs3212227, IL -12 rs2243115, IL-35 rs4740, IL-35 rs2243131). The study included 102 samples from both genders of both genders and different age categories (18-68) years old, the samples were in to two groups: the first group consisted of the 72 rheumatoid arthritis patients and the second group is the control group (healthy subjects) consisted of 30 samples. Blood samples were collected from rheumatoid arthritis patients attending The Joints Consolatory in Baghdad, immunological tests for Anti-CMV IgG, Anti-CMV IgM, Resistin protein and the cytokines IL-12 and IL-35 with ELISA technology. The Single Nucleotide Polymorphism was studied using Taq Man Real Time technology.

The study results showed there were no significant differences between study groups and age ($p>0.05$), also the study showed that females are more susceptive to rheumatoid arthritis than males with no significant difference ($p>0.05$). The study also revealed elevated Anti-CMV IgM and Anti-CMV IgG in rheumatoid arthritis patients compared to control group with significant difference ($p<0.05$).

The study results also referred to elevated IL-12, IL-35, and Resistin protein levels in rheumatoid arthritis patients compared to control group with no significant difference ($p>0.05$).

The study of IL-12 rs3212227 revealed that the genomic pattern GG and allele G are more frequent in rheumatoid arthritis patients compared to control group and the pattern TG and allele T are less frequent in rheumatoid arthritis patients compared to control group. The odds ratio refers that the allele G is considered a risk factor and the allele T is a protection factor. The study results revealed there was no significant correlation between IL-12 and IL-12 rs3212227 ($p>0.05$). the study results also referred there is a significant correlation between IL-12 rs3212227 and Cytomegalovirus ($p<0.05$).

The study results of IL-12 rs2243115 showed that the TT genetic pattern and the allele T are more frequent in rheumatoid arthritis patients compared to control group. While the genetic pattern GG and the allele G

are less frequent in rheumatoid arthritis patient compared to control group. The odds value refers that the allele T is considered a risk factor and the allele G is considered a protection factor. Also, the study results showed that there is no significant correlation between IL-12 and IL-12 rs2243115 levels ($p>0.05$). The study results also showed there is a statistical correlation between Cytomegalovirus and IL-12 rs2243115 ($p<0.05$).

The study results for IL-35 rs4740 that the genetic patterns GA and AA are more frequent in rheumatoid arthritis patients compared to control group. And the genetic pattern GG was less frequent in rheumatoid arthritis patient compared to control group. The allele A was more frequent and allele G was less frequent. The odds value refers that the allele A is considered as a risk factor and allele G is considered as a protection factor. Also noticed a significant correlation ($p<0.05$) between IL-35 and the patterns GG and AA. The current study results showed there is a significant correlation between Anti-CMV IgM and the patterns AA and IL-35 rs4740 GA in rheumatoid arthritis patients ($p<0.05$). also, the study results showed a significant correlation between Anti-CMV IgG and IL-35 rs4740 in rheumatoid patients ($p<0.05$).

Our study results showed that the genetic pattern CC, AC IL-35 rs2243131 is more frequent in rheumatoid arthritis patients compared to control group. The genetic pattern AA IL-35 rs2243131 is less frequent in rheumatoid arthritis patients compared to control group. The allele C was more frequent and allele A was less frequent. The odds value refers that the allele C is considered as a risk factor and allele A is considered as a protection factor. The study results showed a significant correlation between Anti-CMV IgM and the pattern IL-35 AC rs2243131 ($p<0.05$). also has been noticed there is a significant correlation between Anti-CMV IgG and IL-35 rs2243131 ($p<0.05$).