البحث العلمي وسيلتنا لخدمة المجتمع

تحديد التباين الوراثي لجين عامل نخر الورم – الفا TNF-Alpha للموقع (G/A 308–) لمرضى التهاب المفاصل الرثوي في مدينة الشرقاط

عقيل حسين العاصي

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

هدفت هذه الدراسة الى تحديد الارتباط بين التعدد الشكلي لجين عامل نخر الورم – الفا عند الموقع (G/A 308–) ومرضى التهاب المفاصل الرثوي في مدينة الشرقاط باستخدام تقنية Tetra-Primer ARMS-PCR. جمعت (73) عينة دم من مرضى التهاب المفاصل الرثوي و (40) عينة دم من اشخاص اصحاء كمجموعة سيطرة من كلا الجنسين من العيادات الخاصة في محافظة صلاح الدين بأعمار مماثلة تقريبا. اجريت الفحوصات الكيموحيوية (RF, ESR, CRP) لكلا المجموعتين واستخلص الحامض النووي DNA من عينات الدم ثم حدد التعدد الشكلي لجين عامل نخر الورم – الفا عند الموقع (G/A 308–) باستخدام تقنية Tetra-Primer ARMS-PCR ورحلت نتائج التضاعف على هلام الاكاروز. اوضحت النتائج ان كل مرضى التهاب المفاصل لديهم ارتفاع في معدل ال ESR و ال CRP واغلبهم لديه ايجابية اختبار العامل الرثوي RF بالمقارنة مع مجموعة الاصحاء بالإضافة الى ان غالبية المرضى من الاناث. من ناحية اخرى كان تكرار الاليل الطافر– G والتركيب الوراثي المتماثل الطافر GG مرتفعا في مجموعة المرضى بالمقارنة مع مجموعة الاصحاء بينما كان تكرار الاليل A والتركيب الوراثي المتماثل AAسائدا في مجموعة الاصحاء بالمقارنة مع مجموعة المرضى. يمكن ان نستنتج من ذلك ان الافراد الذين يملكون التركيب الوراثي المتماثل GG لديهم استعداد للإصابة ويمكن اعتبار الاليل (G) كمؤشر للإصابة بمرض التهاب المفاصل الرثوي بعكس التركيب الوراثي المتماثل AA والاليل A الذي يعطي حماية من الاصابة بالمرض في المجتمع العراقي، كما يمكن ان تكون هذه النتائج ذات قيمه تشخيصية للدراسات السريرية المستقبلية. من ناحية اخرى فان تقنية Tetra-Primer ARMS-PCR تقنية ذات كلفة مناسبة، سهلة التطبيق، موثوقة ويفضل ان تستخدم في تحديد الطفرات المتعلقة بالأمراض.

الكلمات المفتاحية : التعدد الشكلي لجين عامل نخر الورم – الفا ، التهاب المفاصل الرثوي

المقدمة

يعتبر مرض التهاب المفاصل الرثوي احد اهم امراض المناعة الذاتية الشائعة في الوقت الحاضر اذ ينتشر بشكل كبير في كثير من دول العالم ومنها العراق ويتطور بشكل سريع ويصيب كلا الجنسين بأعمار مختلفة لكن النساء اكثر عرضة للإصابة من الرجال بنسبة 3:1 (2,1). يؤدي الى تآكل وتشوه وتدمير المفصل وفقدان وظيفته في كثير من الاحيان ويظهر في اماكن مختلفة من الجسم منها الفك والركبتين والذراع ويؤثر بشكل رئيس على المفاصل الزليلية synovial joints (4,3).

تحدث الاصابة بالتهاب المفاصل الرثوي نتيجة لعوامل عدة منها الوراثية والبيئية حيث تكون العوامل الوراثية مسئولة عن حدوث المرض بنسبة (40–60%) (5). تساهم جينات HLA-DRB1 خصوصا (HLA-DRB1*04 DRB1*01,) الواقعة ضمن المنطقة الثانية (Class II) لمعقد التوافق النسيجي Major Histocompatibility Complex (MHC)على الذراع القصير للكروموسوم رقم 6 بنسبة 30% من الاستعداد الوراثي لمرض التهاب المفاصل الرثوي (7,6) وحوالي 65% من المرضى يملكون اليلات جينHLA-DRB1 بنسبة عالية بالمقارنة مع الاصحاء اذ يمارس هذا الجين دوره في احداث المرض عن طريق سيطرته على الخلايا اللمفاوية البائية الفعالية (8). وعلى الرغم من ذلك الا ان العامل الوراثي لوحده غير كاف لتطور مرض التهاب المفاصل الرثوي حيث وجد (9) ان (65–70%) من المرضى يملكون اليلات HLA-DR لكن الكثير منهم لا يتطور المرض لديهم اذ انه من الضروري وجود العوامل البيئية كالتغذية وعدم

ممارسة الرياضة مع العوامل الوراثية لتطور المرض. من ناحية اخرى هناك جينات اخرى خارج منطقة HLA تلعب دورا مهما في الاستعداد الوراثي للإصابة بالتهاب المفاصل الرثوي واهمها الجينات المشفرة للسايتوكينات ومنها عامل نخر الورم – الفا و الانترليوكين 1و6 وغيرها (10).

يرتبط التهاب المفاصل الرثوي مع الخلل الوظيفي لبعض السيتوكينات خصوصا" عامل نخر الورم– الفا-Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alpha) الذي يعتبر من السيتوكينات متعددة الوظائف، ذو تأثيرات التهابية ويتوسط العديد من امراض المناعة الذاتية (11)، اذ اشارت بعض الدراسات الى ارتفاع تركيزه لدى مرضى التهاب المفاصل الرثوي حيث يلعب دورا مهما في الالتهاب الذي يسبب تدمير المفصل والعظم خلال الاصابة بالمرض عن طريق ارتباطه بمستقبلات خاصة تسمى TNF receptors (TNFR) Type I and II (12).

يفرز عامل نخر الورم – الفا من خلايا احادية النواة monocytes وخلايا البلعم الكبير macrophages (13) اذ يقع جين عامل نخر الورم – الفا على الذراع القصير للكروموسوم رقم 6 في المنطقة الثالثة (Class III) لمعقد التوافق النسيجي (MHC) بين جينات-HLA DRوجينات HLA-B (14). اشارت بعض الدراسات الى اشتراك تعدد التباين الوراثي لجين عامل نخر الورم – الفا مع بعض امراض المناعة الذاتية ومنها التهاب المفاصل الرثوي (15). ويعتبر التعدد الشكلي لجين عامل نخر الورم – الفا كعامل خطورة لبداية، تقدم وصرامة مرض التهاب المفاصل الرثوي اذ اشارت العديد من الدراسات الى ان التعدد الشكلي في بروموتر جين عامل نخر الورم – الفا عند الموقع(G/A 308–) يشترك في امراضية التهاب المفاصل الرثوي (16). يحصل تعدد اشكال القاعدة المفردة Single Nucleotide Polymorphism في جين عامل نخر الورم – الفا في اكثر من مكان بعضها يقع ضمن منطقة التشفير coding region تؤدي الى جعل الجين صامت أي لا يشفر، والبعض الاخر يقع ضمن منطقة البروموتر Promoter ومن اشهرها التي تحصل عند الموقع 308– (G/A) حيث تتغير القاعدة الطافرة G (guanine) الاكثر شيوعا الى القاعدة A (adenine) الاقل شيوعا حيث تقع هذه القاعدة في موقع استنساخ الجين وتؤدي الى حصول خلل في عملية التعبير الجيني (17,15,11). وعلى الرغم من الجدل الكبير والنتائج المتضاربة الا ان اغلب الدراسات تؤيد الدور المباشر للاليل A في ارتفاع تركيز عامل نخر الورم – الفا حيث يلاحظ ارتفاع تركيزه لدى الافراد الذين يملكون التراكيب الوراثية (GA+AA) بالمقارنة مع الافراد الذين يملكون التركيب الوراثي GG (19,18).

استخدمت بعض التقنيات منها نظام تضاعف الطفرة المقاوم Amplification Refractory Mutation (ARMS) System (20)، تقنية تعدد اشكال منطقة التحييد PCR/RFLP في الكشف عن تعدد اشكال جين عامل نخر الورم – الفا (21) وحديثا تم تطوير تقنية ARMS-PCR Tetra-Primer لغرض اختصار الجهد والوقت حيث يتم استخدام اربع بادئات متخصصة لكل عينة وفي نفس انبوبة الاختبار، اثنان منها تقوم بحصر منطقة التغاير او الاختلاف ككل اما البادئان الاخران فاحدهما يصمم للكشف عن الاليل الطافر والاخر يصمم للكشف عن الاليل الغير طافر. يتم ترحيل نواتج التضاعف على هلام الاكاروز اذ تكون النتيجة ظهور ثلاث حزم بأحجام مختلفة حيث يجب ان تظهر الحزمة الرئيسية لكل عينة وتكون الاكبر حجما" اما بالنسبة للاليلات فيعتمد ظهور الحزمة الخاصة بكل اليل على وجود او عدم وجود الطفرة. ففي حالة ظهور ثلاث حزم هذا يعني ان العينة متغايرة الزيجة Heterozygote اما في حالة ظهور حزمتين فتكون متماثل الزيجة Homozygote من النوع الطافر في حال ظهور الحزمة الخاصة بالاليل الطافر مع الحزمة الرئيسية ، او متماثل الزيجة من النوع الطبيعي في حالة ظهور الحزمة الخاصة بالاليل الغير طافر مع الحزمة الرئيسية (24,23,22).

تهدف هذه الدراسة لتحديد الارتباط بين التعدد الشكلي لجين عامل نخر الورم – الفا عند الموقع (G/A 308–) ومرضى التهاب المفاصل الرثوي في المجتمع العراقي باستخدام تقنية Tetra-Primer ARMS-PCR.

المواد وطرق العمل:

جمعت عينات الدم من (73) مريضا مصابا بالتهاب المفاصل الرثوي من العيادات الخاصة في مدينة الشرقاط تراوحت أعمارهم بين (12–50) سنة استناداً إلى الأعراض السريرية وحسب تشخيص الاطباء الأخصائيين حيث تتوفر لديهم اربعة او اكثر من علامات المرض المحددة من قبل الجمعية الامريكية للروماتزم (25) و(40) شخصا من الاصحاء كمجموعة مقارنة (سيطرة) لا يعانون من التهاب المفاصل الرثوي او اي مرض اخر. جمعت بعض المعلومات من المرضى والأصحاء كالعمر والجنس ثم سحب 5 مل من الدم من كل واحد منهم وقسم الى ثلاثة اقسام الاول (2 مل) حفظ في EDTA لاستخلاص ال DNA ، والثاني (1مل) من الدم اخذ لإجراء اختبار معدل ترسيب كريات الدم الحمر ESR واما المتبقي (2مل) فتم فصل المصل منه لإجراء الفحوصات الكيموحيوية (عامل التهاب المفاصل Rheumatoid factor (RF) ومقدار البروتين التفاعلي (CRP) C-Reactive Protein) باستخدام العدد (Kits) الجاهزة وحسب تعليمات الشركة المجهزة.

التحليل الوراثي :

عزل الدنا المجيني Genomic DNA من الدم الكلي حسب طريقة (26) ثم قدر تركيز الدنا باستخدام جهاز ال Nanodrop حيث تراوحت تراكيز من 56–454 نانوغرام. تم تحديد تعدد اشكال جين عامل نخر الورم – الفا عند الموقع (G/A 308-) باستخدام تقنية الـ Tetra-Primer ARMS-PCR التي تتضمن استعمال اربعة بادئات متخصصة مصممة لهذا الغرض (جدول رقم 1) حسب ما ذكره إلى

(27) وباستخدام العدة (GoTag Master Green) المجهزة من شركة Promega الامريكية وحسب التعليمات المرفقة.

جدول (1) يمثل البادئات المستخدمة في تقنية الـ Tetra-Primer ARMS-PCR والظروف الخاصة بها لجين ال TNF:

ت	اسم البادئ	التتابع	درجة حرارة ارتباط البادئ *Tm*	حجم الحزمة (bp)
1	Forward inner primer (**G allele**)	5'TGGAGGCAATAGGT TTTGAGGGGCAGGA	63 م°	224
2	Reverse inner primer (**A allele**)	5'TAGGACCCTGGAG GCTGAACCCCGTACC	63 م°	154
3	Forward outer primer (5'–3')	5'ACCCAAACACACG CCTCAGGACTCAACA	63 م°	323
4	Reverse outer primer (5'–3')	5'AGTTGGGGACACGC AAGCATGAAGGATA	63 م°	

اجريت بعض التجارب الاولية للوصول الى التركيز الامثل للبادئات المستخدمة والدنا القالب الذي يعطي افضل نتيجة للتضاعف. وضع (12.5 مايكرولتر) من خليط التفاعل الاساسي في كل انبوبة ثم اضيف اليها الدنا القالب بتركيز (100 نانوغرام) والبادئات الاربعة بتركيز 3 بيكومول/ مايكرولتر ثم أكمل حجم التفاعل بالماء المقطر المعقم الى 25 مايكرولتر. مزجت مكونات التفاعل جيدا ثم وضعت الأنابيب في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler بعناية لإنجاز التفاعل التضاعفي بعد أن تمت برمجته حسب البرنامج: دورة واحدة لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 95مْ للمسخ الأولي لشريط الدنا تليها 35 دورة تضاعف تتضمن كل دورة دقيقة واحدة على درجة 94مْ لمسخ القالب ودقيقة واحدة على درجة 63 مْ لربط البادئات بألدنا القالب ودقيقة واحدة على درجة حرارة 72مْ للاستطالة مع دورة أخيرة لمدة 10 دقائق على درجة 72مْ للاستطالة النهائية. رحلت نواتج التضخيم على هلام الأكاروز بتركيز 2% مع الدليل الحجمي (DNA Ladder) لمدة 90 دقيقة بمقدار (5 فولت/ سم) ثم فحص الهلام بعد تصبيغه بصبغة بروميد الأثيديوم لمدة 30–45 دقيقة تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV-Light) وصور باستخدام Gel Documentation System (28).

التحليل الاحصائي:

حللت نتائج الاختبارات الكيموحيوية باستخدام اختبار (Student's t-test) لمجوعة المرضى والاصحاء عند مستوى معنوية 0.01, 0.05 ثم حسب التكرار الاليلي لجين عامل نخر الورم – الفا والعدد والنسب المئوية للتراكيب الوراثية المتماثلة الطبيعية، غير المتماثلة (المتباينة) والطافرة لمجوعة المرضى والاصحاء (29).

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج الموضحة في الجدول رقم (2) عدم وجود فرق معنوي بين مجموعة مرضى التهاب المفاصل الرثوي ومجموعة السيطرة حسب العمر وذلك بسبب اختيار مجموعة من الاشخاص الاصحاء بأعمار مماثلة لمجموعة المرضى، كما نلاحظ ان نسبة انتشار المرض لدى النساء اكثر من الرجال. اما الاختبارات الكيموحيوية فان مرضى التهاب المفاصل الرثوي كان لديهم ارتفاع في معدل ترسيب كريات الدم الحمر ESR ومستويات مقدار البروتين التفاعلي CRP بالمقارنة مع مجموعة الاصحاء بالإضافة الى اعطاء العامل الرثوي RF قيمة موجبة بمقدار 85.2 % بالمقارنة مع مجموعة الاصحاء.

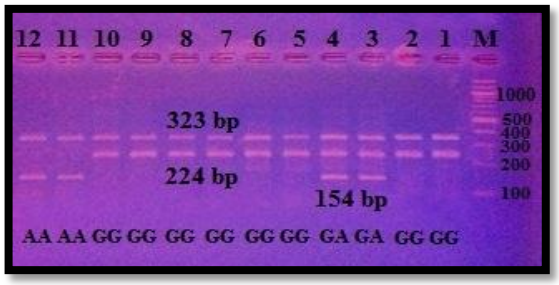
جدول (2) يوضح مقارنة الاختبارات الكيموحيوية لمجموعة مرضى التهاب المفاصل الرثوي ومجموعة الاصحاء

الصفة ، الاختبار		مجموعة المرضى	مجموعة الاصحاء	*P* value
العمر بالسنين (±SD)		44.7±4.17	41.1±5.12	0.061
الجنس	الذكور %	16.46	50	-
	الاناث %	83.54	50	-
معدل ترسيب كريات الدم الحمر ESR		28 ±7.5	8.5±5.1	* 0.041
مقدار البروتين التفاعلي % CRP (Positive)		2.1±1.2	0.251±0.312	* 0.035
العامل الرثوي % RF	موجب %	85.2	11.5	** 0.005
	سالب %	14.8	88.5	** 0.009

*** p < 0.05 (معنوي), ** p < 0.01 (عالي المعنوية).**

اشارت نتائج هذه الدراسة الى وجود ارتباط بين تعدد اشكال جين عامل نخر الورم – الفا (G/A 308-) والمظاهر السريرية كإيجابية العامل الرثوي RF وارتفاع تركيز البروتين التفاعلي CRP ومعدل ترسيب كريات الدم الحمراء ESR وهذا يتفق مع ما وجده (30) حيث اشار الى وجود ارتباط وثيق بين شدة مرض التهاب المفاصل الرثوي وتعدد اشكال جين عامل نخر الورم عند الموقع (G-308A).

بعد ترحيل نواتج تقنية Tetra-Primer ARMS-PCR على هلام الاكاروز بتركيز 2% ظهرت الحزم الناتجة من التضاعف لجميع العينات والمتمثلة بالحزمة الرئيسية الاكبر حجما (323 زوج قاعدي) والتي يجب ان تظهر، والحزمة بحجم 224 زوج قاعدي التي تمثل الاليل G والحزمة بحجم 154 زوج قاعدي التي تمثل الاليل A . في حالة ظهور الحزم الثلاثة هذا يعني ان العينة متغايرة الزيجة Heterozygote ذات التركيب الوراثي (GA)، وفي حالة ظهور الحزمة الرئيسية والحزمة الخاصة بالاليل A (154) فقط فتكون العينة متماثلة الزيجة Homozygote من النوع الطافر وذات التركيب الوراثي (AA)، اما حالة ظهور الحزمة الرئيسية والحزمة الخاصة بالاليل G (154) فتكون العينة متماثلة الزيجة Homozygote من النوع الطبيعي وذات التركيب الوراثي (GG) كما في الشكل (1).



شكل (1): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية الـ Tetra-Primer ARMS-PCR للتعدد الشكلي لجين عامل نخر الورم – الفا للموقع (G-308A) على هلام الاكاروز (2%). الحزم: 323 الحزمة الرئيسية، 224 الاليل G، 154 الاليل A. M الدليل الحجمي. الخطوط (10,9,8,7,6,5,2,1) التركيب الوراثي GG، الخطوط (4,3) التركيب الوراثي GA، الخطوط (12,11) التركيب الوراثيAA .

يوضح الجدول 3 تكرار الاليلات والتراكيب الوراثية لتعدد اشكال جين عامل نخر الورم عند الموقع (G-308A) لمجوعة المرضى والاصحاء. اذ نلاحظ انخفاض تكرار الاليل A لمجموعة مرضى التهاب المفاصل الرثوي بالمقارنة مع مجموعة الاصحاء، من ناحية اخرى كان تكرار الاليل G مرتفعا في مجموعة المرضى بالمقارنة مع مجموعة الاصحاء. التركيب الوراثي المتماثل GG كان موجودا لدى (73.97%) من مجموع المرضى و (22.5%) من مجموعة الاصحاء. اما التركيب الوراثي المتغاير GA كان موجودا في (21.91%) من مجموع المرضى و (37.5%) من مجموعة الاصحاء. في حين نلاحظ ان التركيب الوراثي المتماثل AA كان بنسبة قليلة (4.12%) في مجموعة المرضى بالمقارنة مع مجموعة الاصحاء (40%).

جدول (3): يوضح توزيع التراكيب الوراثية وتكرار الأليلات لجين عامل نخر الورم عند الموقع (G-308A) لمرضى التهاب المفاصل الرثوي ومجموعة السيطرة.

التركيب الوراثي	مجموعة مرضى التهاب المفاصل الرثوي		مجموعة الاصحاء	
	العدد	%	العدد	%
GG	54	73.97	9	22.5
GA	16	21.91	15	37.5
AA	3	4.12	16	40
المجموع	**73**	**100**	**40**	**100**
تكرار الاليل	**العدد**	**%**	**العدد**	**%**
G	118	80.82	33	41.25
A	28	19.18	47	58.75

بينت نتائج الدراسة بان تكرار ألاليل G الموجود في التراكيب الوراثية (GG, GA) كان بنسبة عالية (80.82%) في مجموعة المرضى بالمقارنة مع نسبته (41.25%) في مجموعة الاصحاء بعكس تكرار الاليل A الموجود في التراكيب الوراثية (GA, AA) الذي كان بنسبة منخفضة (19.18%) لدى مجموعة المرضى بالمقارنة مع نسبته (58.75%) لدى مجموعة الاصحاء. لذلك يمكن القول بان التركيب الوراثي المتماثل GG مرتبط مع الاصابة بالتهاب المفاصل الرثوي وان الاليل G يمكن اعتباره كمؤشر استعداد للاصابة بالمرض في حين ان التركيب الوراثي المتماثل AA والاليل A له دور وقائي من الاصابة بالتهاب المفاصل الرثوي في المجتمع العراقي.

كما اشارت نتائج هذه الدراسة الى انخفاض تكرار الاليل (308A−) وارتفاع تكرار الاليل (308G−) في مجموعة المرضى بالمقارنة مع مجموعة الاصحاء وهذا يتفق مع ما وجده باحثين اخرين في مجتمعات سكانية اخرى كالمجتمع السعودي (15)، الصيني (31)، الياباني (32) والسويدي (33). وقد اشارت بعض الدراسات بان الاليل (308− A) لجين عامل نخر الورم – الفا يمكن ان يمارس دور الحماية من الاصابة بمرض التهاب المفاصل الرثوي. من ناحية اخرى اختلفت نتائج هذه الدراسة مع ما وجده (34) في المجتمع التايواني و (35) في المجتمع الايراني و (36) في المجتمع التركي. اسباب هذا الاتفاق والاختلاف غير واضحة لكن يمكن ارجاعها الى الاختلاف العرقي والى اختلاف الظروف البيئية بين مجتمع واخر بالإضافة الى التفاعل بين الجينات والبيئة حيث اقترح (37) أن العرق له تأثير كبير على توزيع التراكيب الوراثية وتكرار الاليلات في مرضى التهاب المفاصل الرثوي، ومن جانب اخر يعتبر مرض التهاب المفاصل الرثوي من الامراض المعقدة التي تتأثر بالعوامل البيئية والوراثية من حيث بدايته وشدته لذلك فان التداخل بين العوامل الوراثية والبيئية يلعب دورا مهما في تحديد نوع النمط الوراثي وبالتالي التأثير على المريض وبذلك فإن تفاعل البيئة مع الجينات قد يكون مسؤولا عن فروق ذات

دلالة إحصائية في نتائج الدراسات التي تجرى على مرضى التهاب المفاصل الرثوي من مختلف الأعراق / المواقع الجغرافية (15).

لاحظ (38) وجود ارتباط بين تعدد أشكال جين عامل نخر الورم – الفا للموقع (G/A 308–) وتطور الضرر في مرضى التهاب المفاصل الأميركيين وأشار إلى أن الارتباط يمكن ان يعتمد على المتغيرات الوراثية في اختلال التوازن بين الاليل A لجين عامل نخر الورم – الفا و 0301 * DRB1. ووجد (39) ارتباط بين الاليل A لجين عامل نخر الورم – الفا وشدة التهاب المفاصل الرثوي في المكسيكيين والتي كانت مستقلة عن الأليلات HLA-DR. في حين لم يجد (40) أي اختلاف في توزيع الأنماط الجينية وتردد الأليلات لجين عامل نخر الورم – الفا بين مرضى التهاب المفاصل في المجتمع التشيكي. وذكر (41) أن مرضى التهاب المفاصل الرثوي الذين يملكون أليل A تكون لديهم زيادة في عدد التقرحات. اما (42) فقد اشار الى ان النمط الوراثي GA لجين عامل نخر الورم – الفا يكون مرتبط مع وجود تقرحات لدى المرضى الذين يعانون التهاب المفاصل في المجتمع الألماني.

يمكن ان نستنتج من نتائج هذه الدراسة ان هناك ارتباط بين تكرار الاليلات وتوزيع التراكيب الوراثية لجين عامل نخر الورم – الفا والاصابة بمرض التهاب المفاصل الرثوي في مدينة الشرقاط. وان تعدد اشكال عامل نخر الورم – الفا يلعب دورا مهما في حساسية وشدة المرض ويمكن اعتبار التركيب الوراثي (GG) والاليل (G) كمؤشر استعداد للإصابة بمرض التهاب المفاصل الرثوي ويمكن ان تكون هذه النتائج ذات قيمه تشخيصية للدراسات السريرية المستقبلية. من ناحية اخرى فان تقنية ARMS-PCR Tetra-Primer تقنية ذات كلفة مناسبة، سهلة التطبيق، موثوقة ويفضل ان تستخدم في الكشف عن الطفرات المتعلقة بالأمراض الوراثية.

المصادر

1. محسن، اسراء حرجان و الدجيلي، ارشد نوري. (2011). تأثير التهاب المفاصل في بعض معايير الدم الكيموحيوية لدى النساء في محافظة النجف الأشرف. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة : المجلد 3الاصدار 2 :الصفحات 200–212.

2. Castillo, Z.R Suárez, A.L.P., Sanchez, C.A.P.S., Villalobos, H.R. The extrapituitary prolactin promoter polymorphism is associated with rheumatoid arthritis and anti-CCP antibodies in Mexican population. Gene: (2013) 525 130-135.

3. Klippel , J.H.; Crofford, L.J.; Stone, J.H. and Weyand, C.M. (2001). Primer on the Rheumatic Disease . 12th ed., Arthritis Foundation Atlanta, PP. 134-6. 209-214.

4. Robbin's L.; Barckhordt, C.S. Hannan , M.T. and Dehoratiu, P.J. (2001). Clinical care in the rheumatic disease. 2nd ed. American College of Rheumatology . Georgia . 32-41, 89-95.

5. Affleck, G.; Pfeiffer, C.; Tennen, H.; and Fifield , J. (1987). Attritional processes in RA patients . Axthritis & Rheum . 30: 927-931.

6. Cuenca1, J. Cuchacovich, M. Pe´rez, C. Ferreira1, C.L. Aguirre, A. The 308 polymorphism in the tumour necrosis factor (TNF) gene promoter region and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF expression and cytotoxic activity in Chilean patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology 2003;42:308–313.

7. Mulcahy, B. Waldron-Lynch, F McDermott, M.F. Genetic Variability in the Tumor Necrosis Factor-Lymphotoxin Region Influences Susceptibility to Rheumatoid Arthritis. Am. J. Hum. Genet. 59:676-683, 1996.

8. Gorony ,W.C. (1997). The molecular basis of rheumatoid axthritis.J.Mol. Med. 75: 772-85.

9. Genin ,E.; Babron, M.C.; Mc Dermott, M.F.; Mulcahy, B.; Walietron Lynch, F.; Adams, C. (1998). Modelling the major histocompatibility complex susceptibility to RA using the MASC method. Genet. EP. Demiol. 15:419-30.56.

10. Zavaleta-Muñiz, S.A. Martín-Márquez, B.T. Gonzalez-Lopez, L. The −174G/C and −572G/C Interleukin 6 Promoter Gene Polymorphisms in Mexican Patients with Rheumatoid Arthritis: A Case-Control Study. Clinical and Developmental Immunology Volume 2013, Article ID 959084.

11. Karray, E.F. Bendhifallah, I.K. Abdelghani, B. and Zakraoui, L. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in regional Tunisian population. Journal of Infectious Diseases and Immunity Vol.3(2), pp. 30-35, February 2011

12. Glossop, J. Dawes, P. Nixon, N. and Mattey, D. Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy Vol 7 No 6 2005.

13. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF-a primary mediator of the host response. Annu Rev Immunol 1989; 7: 625-55;

14. Ichikawa, N. Kotake, S. Hakoda, M Higami, K. Combining effects of polymorphism of tumor necrosis factor a 50-flanking region and HLA-DRB1 on radiological progression in patients with rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol (2009) 19:134–139.

15. Al-rayes, H. Al-Swailem, R Albelawi, M. Arfin, M. Al-Asmari, A and Tariq, M. TNF-α and TNF-β Gene polymorphism in saudi Rheumatoid Arthritis patients. Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders 2011:4

16. Braun N, Michel U, Ernst BP, et al. Gene polymorphism at position –308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production. Neurosci Lett 1996; 215: 75-8.

17. Jeong P, Kim EJ, Kim EG, et al. Association of

31. Yen JH, Chenm CJ, Tsai WC, et al. Tumor necrosis factor promoter poly- morphism in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. J Rheumatol. 2001;28:1788–92.
32. Seki N, Kamizono S, Yamada A, Higuchi T, Matsumoto H, Niiya F, et al. Polymorphism in the 5′-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in patients with rheumatoid arthritis. Tissue Antigens. 1999;54:194–7.
33. Cvetkovic JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, Rantapaa-Dahlqvist S, Lefvert AK. Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes. J Rheumatol. 2002;29:212–9.
34. Lo SF, Huang CM, Wu MC, Wu J.Y. Lack of association of tumor necrosis factor alpha gene polymorphism in patients with rheumatoid arthritis in central Taiwan. Rheumatol Int. 2003;23:151–3.
35. Rezaieyazdi Z, Afshari JT, Sandooghi M, Mohajer F. Tumor necrosis fac- tor α –308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 2007;28:189–91.
36. Ates O, Hatemi G, Hamuryudan V, Topal-Sarikaya A. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. Clin Rheumatol. 2008;27:1243–8.
37. Lee YH, Ji JD, Song GG. Tumor necrosis factor-α promoter –308A/G polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. J Rheumatol. 2007;34:43–9.
38. Khanna D, Wu H, Park G, et al. Association of tumor necrosis factor α polymorphism, but not the shared epitope, with increased radiographic progression in a seropositive rheumatoid arthritis inception cohort. Arthritis Rheum 2006; 54: 1105-16; http://dx.doi.org/10.1002/art.21750.
39. Rodríguez-Carreón AA, Zuniga J, Hernández-Pacheco G, et al. Tumor necrosis factor-alpha –308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans.
40. Nemec P, Pavkova - Goldbergova M, Stouracova M, et al. Polymorphism in the tumor necrosis factor-α gene promoter is associated with severity of rheumatoid arthritis in the Czech population. Clin Rheumatol 2008; 27: 59-65; http://dx.doi.org/10.1007/s10067-007-0653-7.
41. Wilson AG, de Vries N, van de Putte LB, et al. A tumour necrosis factor alpha polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1995; 54: 601-3; http://dx.doi.org/10.1136/ard.54.7.601.
42. Schmeling H, Wagner U, Peterson A, et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in patients with juvenile idiopathic arthritis. Clin Exp Rheumatol 2006; 24: 103-8.
bladder tumors and GA genotype of –308 nucleotide in tumor necrosis factor-alpha promoter with greater tumor necrosis factor-alpha expression. Urology 2004; 64: 1052-6; http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2004.06.018.
18. Rosmond, R. Chagnon, M. Ouchard, C, And Èrntorp, P. G-308A Polymorphism of the Tumor Necrosis Factor a Gene Promoter and Salivary Cortisol Secretion. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism ! 2001 Vol.86² No.5
19. Bilolikar, H. Nam, A.R .Rosenthal, M. Davies, J.C. Tumour necrosis factor gene polymorphisms and childhood wheezing. EurRespir J 2005;26:637–646.
20. Newton, C. R., et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA—The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res. 17, 2503–2516.
21. الجنـدي،ابراهيم صـادق و الحصـيني، حسـين حسـن (2002). تطبيـق تقنيـة البصـمة الوراثيـة DNA فـي التحقيـق والطـب الشـرعي. الطبعة الاولى، الرياض ، السعودية.
22. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res. 2001 Sep 1;29(17):E88-8.
23. Goffinet. L . Functional HLA-E studies in healthy individuals and MS-patients. (2009). Thesis submitted to college of medicine, Hasselt University.
24. Matheson, M. C. et al. Association of IL8, CXCR2 and TNF-a polymorphisms and airway disease. (2006). J Hum Genet 51:196–203.
25. Aletaha D, 3rd C.O. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. 2010;62 (9):2569–81.
26. AL-Azzawie, A.F. A rapid and non-enzymatic method for genomic DNA extraction from whole blood and some other mammalian tissues. Journal Tikrit Univ. For Agri. Sci. (2012) Vol. (12) No. (4)
27. M. Melanie C. Matheson Justine A. Ellis Joan Raven E. Haydn Walters ئ Michael J. Abramson. Association of IL8, CXCR2 and TNF-a polymorphisms and airway disease. J Hum Genet (2006) 51:196–203.
28. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (2001). In Vitro Application of DNA by the Polymerase Chain Reaction, in Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. , Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, p.691.
29. Snustad, D. P. and Simmons, M. J. (2012). Genetics. 6th ed. John Wiley & Sons, Inc.
30. Nemec P, Pavkova-Goldbergova M, Stouracova M, Vasku A, Soucek M, Gatterova J. Polymorphism in the tumor necrosis factor-α gene promoter is associated with severity of rheumatoid arthritis in the Czech population. Clin Rheumatol. 2008;27:59–65.

Detection of polymorphism for Tumor Necrosis Factor-Alpha (−308 G/A) Gene Polymorphism for Rheumatoid Arthritis Patients (in Sherqat city)

Abstract

This study aimed to determination the association between Tumour necrosis factor-alpha (TNF-α) (−308 G/A) polymorphism and rheumatoid arthritis patients in Iraqi population using Tetra-Primer ARMS-PCR technique. A (73) Blood sample were collected from rheumatoid arthritis patients and (40) blood sample from healthy subjects from males and females with matching age from private clinic in different region of Salahaddin governorate. The biochemical tests (RF, CRP and ESR) were carry out for both groups, genomic DNA was extracted from blood samples and detected of TNF-α (−308 G/A) polymorphism using Tetra-Primer ARMS-PCR technique and amplified products separated by agarose gel. The results showed that all rheumatoid arthritis patients had high level of ESR and CRP and the most had positive of RF factor compared with controls in addition to the most of patients are females. On the other hand the frequencies of TNF-α −308 G allele and genotype GG were higher in RA patients as compared to controls while allele A and genotype AA were predominant in control group. Can be concluded that genotype GG positive individuals had susceptible to infection and can be conceder as marker susceptible to rheumatoid arthritis in contrary to genotype AA and A allele might give a protective from RA infection. The results can be as diagnostic value for future clinical studies. On the other hand Tetra-Primer ARMS-PCR is a feasible, cost effective and a reliable technique and prefer using in detection of mutations related diseases.