جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة



التحري عن المؤشرات المناعية والتباين الوراثي في جين البين الأبيضاضي -10 في عينة من المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية

من قبل الطالبة

وسن عبد اللطيف مجيد العزاوي

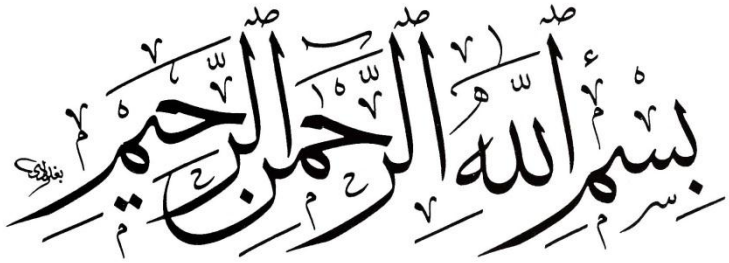
بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2007

بإشراف

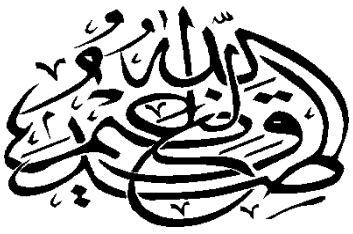
أ.د. عباس عبود فرحان الدليمي **أ.د. حميد مجيد جاسم الدليمي**

رجب
1438 هـ

اذار
2017 م



﴿ الَّذِي خَلَقَنِي فَهُوَ يَهْدِينِ ۞ وَالَّذِي هُوَ يُطْعِمُنِي وَيَسْقِينِ ۞ وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ۞ وَالَّذِي يُمِيتُنِي ثُمَّ يُحْيِينِ ۞ وَالَّذِي أَطْمَعُ أَنْ يَغْفِرَ لِي خَطِيئَتِي يَوْمَ الدِّينِ ۞ ﴾



سورة الشعراء: اية(78–82)

الإهداء

ما أن شفاه قلمي تلوك لكم الكلمات وترمي بسنارتها في بحر المعاني لتصطاد لكم صغير الحروف وكبيرها وتضعها في أقداح الجمل عسى ان تعبر عن حبي لكم اللامحدود يا أغلى ما في الوجود .

الى الذي يعلم السر وأخفى، الى الذي يعلم كم أنا اشقى، الى الذي أعزنا بالإسلام وجعلنا بالإيمان أنقى، الى رب العزة والملكوت الذي يأخذ كل الارواح و وحده الحي يبقى لله(ﷻ).

الى روح ومهجة الوجود الى الرحمة المهداة لكل موجود من ربنا المعبود الى درعنا وملاذنا وشفيعنا يوم العرض على الله سيدنا أحمد ومحمد ومحمود (ﷺ).

الى من تمنيت أن اهديه نصرا، فكبلوني وعشت القهر قصرا، ورموني في الزنزانة السوداء عصرا، ضاقت علي فأعلنت حدودك في القلب جنتي سرا، واجتهدت وما في اليد حيلة لأهديك رسالة هي بالقلب نصرا، بلدي العراق العميق جرحا.

الى من نالوا الدرجات العلى، الى الغائبين الحاضرين الى من لحقوا بالرفيق الاعلى وضحوا بكل غالٍ وأغلى، الى الاكرم منا جميعاً.

الى من عاملني كأميرة، ورحل عني وتركني مكبلة بأحزاني كالأسيرة، الى من جعلني أشهق شهقات الحنين اليه ويزيدني الشوق حيرة في حيرة، الى عشق عمري وحياتي المريرة ،الى من سأضل أذكره بكرة وأصيلا، الى من رسم حياتي جملة وتفصيلا الى أطيب روح رحلت الى الباري عساني ارد من جميلك شيئا قليلا. أبي الحبيب.

الى من طرزت من همومها لنا ثوب الفرح وغزلت بمغزل عطائها من أوجاع مرضها لنا ثوب العافية فتساقطت أوراق حياتها لتنمو وتثمر حياتنا فغابت حياتها لتشرق شمس غيابها و وجع فراقها الى أرجاء ارواحنا المنكسرة. الى روح الروح الى من رحلت الى الرفيق الاعلى وتركتنا بلا روح .الى أمي رويحة الجنة حبيبة الروح .

الى رفيقة دربي وينبوع فرحتي ومصدر أشراقتي الى من تنزل الدمعة من عينها بكاءاً على دمعتي الى من شدة من أزري ولا يوما تركتني الى منبع الحنية ومصدر الطيبة الظاهرة والخفية الى من سطرت ايام عمرها أضلعاً لتحمي قلبي من كل أذية. الى اختي وتوأم عمري نضال التي ناضلت من اجلنا لكي نحصل على المنال.

الى من منحوني دفءٍ في ليالي الشتاء الى من كانوا لي شجرة مثمرة في الليالي العجفاء الى من كانوا لي محبةً في زمن الكره والبغضاء الى من صيروا صحراء حياتي الى بستان خضراء.

أخي واخواتي.

الى من انتزعت أرواحهم ليحيوا روح البحث الى من أعطوني من دمائهم ليغذوا شريان البحث الى الذين لولاهم لما تعافى البحث، ولولا سقمهم لما أستقام البحث، الى المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذين عالجوا جراح بحثي فلولا دائهم ما شفي بحثي وأثمر.

الى من رحلت فجأة وصعقتنا برحيلها فأنقطع نياط قلبنا بانقطاعها عن الحياة فحملنا حبها بأعماقنا لتترك بفراقها شجناً، وفي الروح جرحاً، وفي الصدر آهة وفي الحلق غصة. الى زوجة أخي الراحلة الى ربها الغالية شيماء.

الى من جاء الربيع ورحلت وضحك عندما بكيت الى التي الى ربها انتقلت أبنة أخي حسنة التي الى ربها انتقلت والتي بفراقها قلوبنا تمزقت.

الى فلذات كبدي التي تمشي على الارض وقرة عيني وبهجة روحي الذين بعثهم لي ربي بلسم لجروحي .....الى اولاد اخي الذين برؤيتهم تنجلي همومي (هذال، أحمد، عبودي، ودق).

الى من جعل حياتي كرنفال من الفرح وحقول أحزاني بيادر من سنابل البهجة والتفاؤل والامل الى الاستاذ الدكتور عبد ذياب العجيلي.

الى كل هؤلاء .....

تحية عرفان وحب

وســــــــن

الشكر والتقدير

الحمد لله على توالي نعمه، وترادف عفوه وكرمه، والصلاة على نبيه الكريم، محمد الجسيم الحظ في النعيم، وعلى آله واصحابه الكرام، مظهري الدين ومؤيدي الاسلام ما فاح مسك واورق عود، وما لمع برق على الخدود والرضوان على علماء الدين ، ما قرئ المثاني والتين. أما بعد:

فأن الاحاطة بالشيء بصورة كاملة صعبة ان لم تكن مستحيلة، وخصوصاً في جانب العلم والمعرفة فلكل شيء حدود الا العلم والمعرفة فلا حدود لهما، ان من عظيم شرفي ان اقدم شكري وعرفاني وأمتناني الى القناديل المضيئة في سماء العلم والمعرفة والعطاء فصحبتهم جنة واخذ العلم منهم قوة وللجهل جلاء، اوجه خالص شكري وعظيم أمتناني الى الذي نظر الى الشمس بعيون جامدة ومسك النار بأيد غير مرتعشة الى مفتاح الحكمة ومصباح الظلمة **الاستاذ الدكتور عباس عبود فرحان الدليمي** الذي كان لي سنداً وعوناً في الضراء قبل السراء وساعدني في تخفيف العناء. كما أخص بالشكر والامتنان الى من كان لورود بحثي العبير ولخبز بحثي الخمير، ولشمسه الحرارة ولقمره الاضاءة، مستودع الحكمة وصاحب القلب الكبير **الاستاذ الدكتور حميد مجيد الدليمي** الذي كان عقداً في جيد بحثي ونقشاً في معصمه، وأقدم شكري الى النهر الجاري الذي يعطي بلا حدود وبلا مقابل **الدكتور علاء الشيخ علي** الذي ساعدني بجمع عينات البحث وساندي دعما وتوجيهاً . كما أقدم خالص شكري وتقديري الى من كانوا درة في تاج الطيبة والتسامح وكوكباً ساطع في سمائهما الى جميع افراد اسرة مختبرات مركز امراض وزرع الكلى والعاملين في مختبرات مستشفى بغداد التعليمي لما قدموه لي من عون وتقدير فقد كانوا النسمة العليلة التي تبرد حرارة بحثي الملتهبة . وأقدم شكري وأمتناني للدكتور **فائق ايشو** الذي كان متفوقا في عمل الخير والذي يهب نفسه لمساعدة الغير. كما أقدم شكري وأمتناني الى رئاسة جامعة النهرين لأتاحتهم الفرصة لي للعمل في مختبراتهم واخص بالذكر الى الذي كان زادا لعيون بحثي الاستاذ **زيد نصيف** الذي كان له الاثر الكبير في الوقوف بجانبي بتذليل الصعوبات التي أعترضت سبيل البحث كما أتقدم بجزيل شكري الى جميع العاملين في وحدة الابحاث المكانية للمناطق الحارة في كلية العلوم جامعة بغداد وأخص بالذكر منهم منبع العطاء والطيبة ومنارة العلم الاستاذ الدكتور **علي حسين أدحية** نصحا وتوجيهاً. كما أتقدم بخالص الحب والتقدير الى الام التي احتضنتنا برحابة صدرها جامعة ديالى الحبيبة والى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة وكل العاملين فيها والى من منح لنا فرصة أكمال مسيرة العلم ومن

له قيمة في نفسي عميقة الاثر ومعروفه علينا سيبقى أبد الدهر قسمي وملاذي قسم علوم الحياة وكل زملائي وزميلاتي الذين كانوا لي عونا في الحياة على الحياة. واخص بالذكر منهم من زينت حياتي بصحبتها الطيبة واغنتني بمحبتها وصدق احساسها صاحبتي وصديقتي **زينة غني**، كما اتقدم بالشكر الجزيل الى كل من شاركني مقاعد الدراسة وقدموا لي يد العون والمساعدة. وفي الختام فأن هذا البحث هو ثمرة جهدي وما أفضى اليه اجتهادي وجدي فأن أصب وهو ما ارجوه بتوفيق من الله وتأييده، وإن كان غير ذلك وبه هنات فمن نفسي وحسبي اني قد بلغت غاية الجهد وما الكمال الا لله وحده والحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين محمد صل الله عليه واله وصحبه وسلم.

وآخر دعوانا ان الحمد لله رب العالمين .

وســــــــن

الخلاصـــــــة

أجريت الدراسة الحالية على عينة من المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى ، أذ جمعت عينات الدم من 32 مريض بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل تراوحت أعمارهم بين 13 و 50 سنة، بلغت نسبة الإناث 96.87%. كما جمعت 32 عينة دم أخرى من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى تراوحت أعمارهم بين 16 و 65 سنة، بلغت نسبة الإناث 90.62%. ولغرض المقارنة فقد جمعت 32 عينة دم أخرى من الأشخاص السليمين (سيطرة أصحاء) تراوحت أعمارهم بين 21 و 54 سنة بلغت نسبة الإناث 53.12% . أشارت النتائج الى عدم وجود فرق معنوي بين معدل كتلة الجسم Body (BMI) Mass Index لكل من عينة مرضى المفاصل (27.03± 0.79) وعينة الكلى (28.11± 0.82) وعينة السيطرة (27.12 ± 0.98) مما يشير الى عدم تأثر كتلة الجسم بالإصابة بالمرض .

درست العلاقة بين عدد من مؤشرات الدم السريرية مثل أعداد خلايا الدم البيضاء والحمراء والصفيحات الدموية وتركيز الهيموغلوبين ومعدل ترسيب كريات الدم الحمراء (ESR) والإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى، وقد أشارت النتائج الى عدم وجود فرق معنوي إحصائياً في أعداد خلايا الدم البيضاء في كل من عينة مرضى المفاصل (8.47×10^3خلية /مل) وعينة مرضى الكلى (9.13×10^3خلية /مل) وعينة السيطرة الأصحاء(7.99×10^3خلية /مل) ، في حين أشارت النتائج الى حدوث انخفاض معنوي إحصائياً ($P<0.01$) في أعداد خلايا الدم الحمراء لكل من عينتي مرضى المفاصل (4.41×10^6خلية /مل) ومرضى الكلى (4.23×10^6خلية /مل) مقارنة بعينة السيطرة الأصحاء (4.98×10^6 خلية /مل) . كما أشارت النتائج الى حدوث انخفاض معنوي إحصائياً ($P<0.01$) في تركيز الهيموغلوبين في عينة الدم لكل من عينتي مرضى المفاصل (11.83 غم/ديسيلتر) ومرضى الكلى (11.79 غم /ديسيلتر) مقارنة بعينة السيطرة الأصحاء (13.69 غم/ديسيلتر). من ناحية أخرى لم يتم ملاحظة أي فرق معنوي بين أعداد الصفيحات الدموية في كل من عينة مرضى المفاصل (270.81×10^3صفيحة /مل) وعينة من مرضى الكلى (255.01 $\times10^3$صفيحة /مل) وعينة السيطرة الأصحاء (275.94 $\times$ 10^3صفيحة/ مل). لقد أشارت النتائج أيضاً الى وجود ارتفاع معنوي إحصائيا ($P<0.01$) في معدل ترسيب كريات الدم الحمراء في عينتي مرضى المفاصل (38.53 ملم/ساعة) ومرضى الكلى (44.0 ملم /ساعة) مقارنة بمعدل

ترسيب كريات الدم الحمراء في عينة السيطرة الأصحاء (13.09ملم/ساعة). وفقاً لهذه النتائج تعتبر مؤشرات الدم الكيموحيوية المتمثلة بأعداد كريات الدم الحمراء وتركيز الهيموغلوبين ومعدل ترسيب كريات الدم الحمراء من المؤشرات السريرية لتشخيص الإصابة بداء الذئب الأحمراري في عينات المرضى العراقيين .

درست أيضاً العلاقة بين العديد من المؤشرات المناعية والإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى، وقد شملت هذه المؤشرات كل من تركيز بروتين سي التفاعلي وأضداد الدنا مزدوج الخيط وتركيز المتممين الثالث والرابع والأضداد ضد النووية. وقد أشارت النتائج الى حدوث ارتفاع معنوي إحصائيا ($P<0.01$) في تركيز بروتين سي التفاعلي (C-Reactive Protein) في مصل الدم لمرضى الكلى (13.63ملغرام /لتر) مقارنة بتركيزه في مصل الدم للسيطرة الاصحاء (9.51 ملغم /لتر) في حين لم يلاحظ اي فرق معنوي بين تركيز بروتين سي التفاعلي لعينة مرضى المفاصل (7.64 ملغم/لتر) وتركيزه في مصل الدم للسيطرة الأصحاء مما يشير الى أمكانية أعتبار هذا المؤشر من المؤشرات المناعية المهمة لتشخيص مرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى . كما أشارت النتائج الى حدوث ارتفاع معنوي إحصائيا ($P<0.01$) في تركيز أضداد الدنا مزدوج الخيط (ds-DNA antibodies) في مصل الدم لعينتي مرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (65.15 وحدة/مل) والكلى (60.39 وحدة/مل) مقارنة بتركيز هذه الاضداد في عينات مصل الدم للسيطرة الاصحاء(5.19 وحدة /مل) مما يشير الى ان هذا المؤشر المناعي يعد من مؤشرات الاصابة بالمرض . من ناحية أخرى فقد أشارت النتائج أيضا الى حدوث انخفاض معنوي إحصائيا ($P<0.01$) في تركيز المتمم الثالث (Complement-3) في مصل الدم لمرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (104.27 ملغم/ديسيلتر) مقارنة بتركيزه في مصل الدم للسيطرة الأصحاء (116.08ملغم/ديسيلتر)، كما يلاحظ وجود انخفاض معنوي إحصائي ($P<0.01$) لعينة مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى (89.08 ملغم/ديسيلتر) بمقارنة تركيزه في مصل الدم للسيطرة الاصحاء مما يشير الى امكانية عد هذا المؤشر من المؤشرات المناعية لتشخيص الاصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى . درس ايضا تركيز المتمم الرابع (4-Complement) بوصفه أحد المؤشرات المناعية للإصابة بالمرض ، وقد أشارت النتائج الى حدوث انخفاض معنوي إحصائيا ($P<0.01$) في تركيز هذا المتمم في مصل الدم لعينتي مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (20.64 ملغم/ديسيلتر) والكلى (20.51 ملغم/ديسيلتر)

مقارنة بتركيزه في مصل الدم لعينة السيطرة الاصحاء (28.70 ملغم/ديسيلتر) مما يشير الى أمكانية عد تركيز المتمم الرابع في مصل الدم واحداً من المؤشرات المناعية لتشخيص الاصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى .

درست أيضاً الاستجابة المناعية وظهور الاجسام المضادة ضد النووية (Anti-Nuclear Antibodies) والاصابة بداء الذئب الأحمراري، ومن بين هذه الاجسام المضادة التي تم دراستها هي كل من الاجسام المضادة لضد الجسيم النووي (Anti nucleosome Antibodies) وأضداد سميث (Anti-Smith Antibodies) وأضداد السنترومير(Centromere Antibodies) والاجسام المضادة لمستضدات متلازمة سوغرين (Sjogrens Syndrome Antigen Antibodies) من النوع Ss-A/Ro60 والنوع ss-A/Ro52 والنوع SS-B/La والاجسام المضادة لمستضد بروتين الحامض النووي الرايبوزي الصغير (Small Nuclear Ribonucleic Acid Protein Antibodies) وأضداد المستضد Mi-2 (Mi-2 antibodies) وأضداد المستضد ku (ku antibodies) وأضداد الهستون (Histone Antibodies) . وفي الوقت نفسه لم تظهر فيه اي من هذه الاضداد في مصل الدم للسيطرة الاصحاء ، فقد أشارت النتائج الى ظهور أضداد الجسيم النووي في مصل الدم لـــ 87.5%و 56.36% من المجموع الكلي من مرضى المفاصل ومرضى الكلى على التوالي، كما أظهرت أضداد سميث في مصل الدم بنسبة 93.75% و81.25% ، وأضداد السنتومير بنسبة 87.5% و 56.25%، والاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من النوع Ss-A/Ro60 بنسبة 100% و 81.25% ، والاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من النوع ss-A/Ro52 بنسبة 56.25% و43.75%، والاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من النوع SS-B/La بنسبة 75.0% و 46.88%، والاجسام المضادة لمستضد بروتين الحامض النووي الرايبوزي الصغير snRNP بنسبة 100% و84.38%، والاجسام المضادة للمستضد Mi-2 بنسبة 81.24% و 68.75% ، والاجسام المضادة للمستضد ku بنسبة 87.5 % و81.25% ، وأضداد الهستون بنسبة 87.5% و 65.63 % من المجموع الكلي لمرضى المفاصل والكلى على التوالي لهذه المؤشرات المناعية جميعاً. وعلى ضوء هذه النتائج يعتبر ظهور اضداد الجسيم النووي وأضداد سميث وأضداد السنترومير والاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من النوع Ss-A/Ro60 والاجسام المضادة لمستضد بروتين الحامض النووي الرايبوزي الصغير والاجسام المضادة للمستضد Mi-2 والاجسام المضادة للمستضد ku وأضداد

الهستون في مصل الدم مؤشرات مناعية مهمة لتشخيص مرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى ،إن ظهور الاجسام المضادة لمستضدي متلازمة سوغرين من النوع A/Ro52 والنوع SS-B/La في مصل الدم مؤشرات مناعية أخرى لتشخيص مرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل.

درست درجة فعالية او شدة مرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى لتقييم نشاط المرض في عينات الدراسة بالمقارنة مع السيطرة الاصحاء على وفق تصنيف الكلية الامريكية لأمراض الروماتيزم ، وقد أشارت النتائج الى أن فعالية المرض كانت شديدة جدا في مرضى الكلى وبفرق معنوي إحصائي ($P<0.01$) عن فعاليته في مرضى المفاصل إذ كانت شدة المرض أقل في هذه العينة بالمقارنة مع السيطرة الاصحاء الذين انعدمت لديهم فعالية المرض بسبب عدم الاصابة بالمرض .

لغرض دراسة الاستجابة الوراثية للإصابة بداء الذئب الأحمراري، فقد تم التحري عن العلاقة بين التباين الوراثي في جين البين الابيضاضي -10 كواحد من عوامل الخطورة والاصابة بالمرض، حيث تم أولا استخلاص الدنا المجيني (Genomic DNA) من عينات الدم لمرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى وعينة السيطرة الاصحاء. وقد أشارت نتائج الاستخلاص الى الحصول على الدنا المجيني بنقاوة عالية تراوحت بين 1.7-2.0 وبتراكيز عالية تراوحت بين 90 الى 120 مايكروغرام /مل. اجري بعدها تضخيم موقع التباين ($A<C$) في الموقع 206773062 ضمن حفاز جين البين الابيضاضي -10 باستخدام بوادئ متخصصة لهذا الموقع . تشير نتائج التضخيم الى الحصول على قطعة دنا بحجم 650 زوج قاعدي بعد الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (3%). أجري بعدها تحديد التعاقب النكليوتيدي للقطعة المضخمة لتحديد نوع التباين والطرز الوراثية بالمقارنة مع طراز النوع البري cSNP المبين في قاعدة البيانات National Center For Biotechnology Information(NCBI). وقد أشارت النتائج الى أن التباين الوراثي في الموقع 206773062 هو في النوع aSNP في 53% من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل و 59% من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى مقارنة بـ33% في عينة السيطرة الاصحاء . كما بلغت نسبة الطرز الوراثية غير المتجانسة (CA) في موقع التباين 34.38% و 46.88% في مجموعتي المفاصل والكلى على التوالي مقارنة بـ16.67 % لمجموعة السيطرة الاصحاء . كما بلغت نسبة الطرز الوراثية المتغايرة المتجانسة

(AA) في نفس الموقع 18.75% و1250% في مجموعتي المفاصل والكلى على التوالي مقارنة بـ16.67 لمجموعة السيطرة الاصحاء، في حين بلغت نسبة الطرز الوراثية غير المتغايرة المتجانسة (CC) والتي تمثل النوع البري 46.88% و 40.63% في مجموعتي المفاصل والكلى على التوالي مقارنة بـــ66.67% لمجموعة السيطرة الاصحاء وبفرق معنوي إحصائي ($p<0.01$) . تشير هذه النتائج الى أن التباين cSNP في الموقع 206773062 لجين الانترلوكين -10 (rs 1800872) يعد عامل من عوامل الخطورة المصاحبة للإصابة بداء الذئب الأحمراري .

قائمة المحتويات

ت	المحتويات	الصفحة
1	الخلاصة	I-V
2	قائمة المحتويات	VI-IX
3	قائمة المختصرات	X-XI
4	قائمة المصطلحات	XII-XV
5	قائمة الجداول	XVI-XVIII
6	قائمة الاشكال	XIX
7	قائمة الصور	XX
8	قائمة الملاحق	XX
الفصل الاول	**المقدمة**	**1**
1	المقدمة	1-2
2	أهداف الدراسة	2-3
الفصل الثاني	**أستعراض المراجع**	**4**
1-2	نبذة تأريخية	4
2-2	داء الذئب الأحمراري	5
3-2	وبائية المرض	6
4-2	الاستجابة المناعية لداء الذئب الأحمراري	8
5-2	المؤشرات التشخيصية للمرض	10
1-5-2	المؤشرات التشخيص السريرية	10
2-5-2	مؤشرات التشخيص المناعية	12
1-2-5-2	الأضداد النووية	12
1-1-2-5-2	أضداد الدنا	12
2-1-2-5-2	الاجسام المضادة ضد الجسيم النووي	13
3-1-2-5-2	أضداد الهستون	14
4-1-2-5-2	أضداد سميث وأضداد البروتينات النووية الرايبية	14
5-1-2-5-2	مستضدات السنتومير	15
6-1-2-5-2	أضداد SSA(RO) وSSB(La)	16
7-1 - 2- 5 -2	المستضد ku	16
8-1-2- 5 -2	المستضد MI-2	17
2-2-5-2	بروتين-C التفاعلي	17
-3-2-2-5-2	نظام المتمم	17
3-5-2	مؤشرات الدم التشخيصية	19
6-2	فعالية المرض SLEDAI	20
7-2	الاستعداد الوراثي	21

8-2	السايتوكينات	22
9-2	التباين الوراثي لجينات الحركيات الخلوية وعلاقتها بداء الذئب الأحمراري	23
10-2	جين انترلوكين 10	25
11-2	التباين الوراثي في جين أنترلوكين 10	26
12-2	التباين الوراثي في الحركيات الخلوية وعلاقته بأمراض المناعة الذاتية	27
الفصل الثالث	**المواد وطرائق العمل**	**29**
1-3	المواد	29
1-1-3	الاجهزة المستعملة في الدراسة	29
1-2-3	المواد الكيميائية والبيولوجية	31
3-1-3	العدد التشخيصية	31
2-3	طرائق العمل	32
1-2-3	عينات الدراسة	32
2-2-3	قياس فعالية المرض	33
3-2-3	حساب دليل الكتلة الجسمية	34
2-2-3	عينات الدم	34
3-3	الأختبارات المناعية	35
1-3-3	إختبار تركيز أضداد الدنا المزدوج الخيط	35
1-1-3-3	تحضير المحاليل	36
1-1-1-3-3	محلول الغسل	36
2-1-1-3-3	محلول تخفيف النموذج	36
3-1-3-3	طريقة العمل	37
1-2-3-3	أختبار بروتين سي التفاعلي	38
1-2-3-3	تحضير المحاليل	39
1-1-2-3-3	محلول الغسل	39
2-1-2-3-3	محلول تخفيف النموذج	39
2-2-3-3	تحضير نماذج المصل	39
3-2-3-3	طريقة العمل	40
2-2-3-3	تقدير تركيز أضداد بروتين سي التفاعلي	41
3-3-3	اختبار الاجسام المضادة ضد النووية	41
1-3-3-3	تحضير المحاليل	42
1-1-3-3-3	محلول الغسل	42
2-1-3-3-3	محلول تخفيف النماذج	42
3-1-3-3-3	تخفيف النماذج	42
2-3-3-3	طريقة العمل	43
3-3-3-3	طريقة قراءة النتائج	44
4-3-3	اختبار مكونات المتمم الثالث C3 والمتمم الرابع C4	45

1-4-3-3	طريقة العمل	45
4-3	أختبارات الدم	45
1-4-3	معدل ترسيب كريات الدم الحمراء	46
2-1-4-3	حساب خلايا الدم	46
5-3	التحليلات الوراثية	46
1-5-3	أستخلاص الدنا	46
2-5-3	تقدير تركيز ونقاوة الدنا	47
3-5-3	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز	48
1-3-5-3	تحضير المحاليل	48
1-1-3-5-3	محلول TBE الدارئ	48
2-1-3-5-3	محلول دارئ التحميل	48
3-1-3-5-3	صبغة بروميد الاثيديوم (0.5%)	49
4-3-5-3	تحضير هلام الاكاروز (0.7 % و 2.0%)	49
5-3-5-3	الصب الافقي لهلام الاكاروز	49
6-3-5-3	ترحيل الهلام الكهربائي	49
7-3-5-3	تضخيم جين انترلوكين 10	50
8-3-5-3	تحديد التعاقب النكليوتيدي لنواتج التضخيم	51
9-3-5-3	التحليل الاحصائي (Statistical analysis)	51
الفصل الرابع	**النتائج والمناقشة**	**52**
4 –1	عينات الدراسة	52
1-1-4	توزيع مجاميع الدراسة وبحسب النسب المئوية بالنسبة للجنس	52
2-1-4	توزيع مجاميع الدراسة بحسب الفئات العمرية	53
3-1-4	الحالة الاجتماعية	54
4-1-4	دليل كتلة الجسم (BMI)	55
2-4	مؤشرات الاعتلالات الدموية	56
1-2-4	خلايا الدم البيضاء	56
2-2-4	أعداد خلايا الدم الحمراء	58
3-2-4	تركيز الهيموغلوبين في الدم	59
4-2-4	أعداد الصفيحات الدموية	60
5-2-4	معدل ترسيب كريات الدم الحمراء	62
3-4	المؤشرات المناعية	63
1-3-4	بروتين سي التفاعلي	63
2-3- 4	أضداد الدنا مزدوج الخيط	65
3-3-4	تركيز المتمم الثالث	66
5-3-4	تركيز المتمم الرابع C_4	68

6-3-4	الاجسام المضادة الضد النووية ANA	70
1-6-3-4	الاجسام المضادة ضد الجسيم النووي	70
2-6-3-4	أضداد سميث	72
3-6-3-4	مستضدات السنتومير	74
4-6-3-4	اضداد مستضد متلازمة سوغرين من نوع Ss-A/Ro60	75
5-6-3-4	الاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من نوع ss-A/Ro52	78
6-6-3-4	الاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من نوع SS-B/La	80
7-6-3-4	الاجسام المضادة لمستضد بروتين الحامض النووي الرايبوزي الصغير	82
8-6-3-4	أضداد المستضد Mi-2	83
9-6-3-4	الاجسام المضادة للمستضد ku	85
10-6-3-4	أضداد الهستون	86
4-4	اختبار فعالية المرض DA	88
5-4	الدراسة الجزيئية	90
1-5-4	استخلاص الدنا المجيني	90
2-5-4	تضخيم جين البين الابيضاضي- 10	92
3-5-3	تحديد التعاقب النكليوتيدي لنواتج التضخيمDNA Sequencing	93
5-4	تحديد التركيب الوراثي لجين البين الابيضاضي- 10	96
	الاستنتاجات والتوصيات	102-99
	المصادر	124-103
	الملاحق	131-125

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
ACR	American College Of Rheumatology
AHA	Anti-Histone Antibodies
AMA	Anti-Mantucondrea Antibodies
ANAs	Antinuclear Antibodies
ASS	Antisynthetase Syndrome
BMI	Body Mass Index
bp	Base Pair
C3	Complement Protein Third
C4	Complement Protein Four
C_4A	Gene A Complement Protein Four
C_4B	Gene Bcomplement Protein Four
CENP-B	Centromere Antigen
CRP	C-Reactive Protein
CTD	Connective Tissue Diseases
DM	Dermatomyositi
ESR	Erythrocyte Sedimentation Rate
EtBr	Ethidium Bromide
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
H2A و H2B و H3 و H4	Histons Protieins
$H2Bp^{ac}$ و $H4p^{ac}$	Histons Proteins Moderations
Hb	Haemoglobin
HLA	Human Lymphocyte Antigen
IgG	Immunoglobulin Gamma
IIM	Idiopathic Inflammatory Myopathies
IL10	Interleukin-10 Gene
ILD	Inflammatory Muscle Disease
LE cell	Lupus Erythematosus Cell
LN	Lupus Nephritis
MHC	major histocompatibility complex
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLT	Platelet
PM	Polymyositis

RBCs	Red Blood Cells
Ro-RNPs	Ro-Ribonucleoproteins
SARD	Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases
SAS	Statistical Analysis System
SJS	Sjögren's Syndrome
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
sm	Anti-Smith
SmB و SmB1 و SmD1 و SmB3و SmD3و SmD2 و SmG وSmF وSmE	Smith Proteins
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
snRNP	Small Nuclear Ribonucleoprotein
SS-B/La	Anti-Sjogren's Syndrome Type B
SSC	Systemic Sclerosis
U1-snRNP	U1- Small Nuclear Ribonucleic Acid Protiein Antibodies
WBCs	White Blood Cells

قائمة المصطلحات

المصطلح	المعنى
Acute phase protein	بروتينات الطور الحاد
Adaptive Immune Response	الاستجابة المناعية التكيفية
Adipocytes	الخلايا الشحمية
Adolescence	المراهقة
Aggressive	شديد الفتك
Allel freguency	التردد الاليلي
Alternative Complement Pathway	مسار المتمم البديل
American College of Rheumatology	الكلية الامريكية لأمراض الروماتيزم
Androgens	هرمونات الذكورة
Anemia	فقر الدم
Anti- Nucleosome antibodies	الاجسام المضادة ضد الجسيم النووي
Antigen antibody reaction	تفاعلات الضد والمستضد
Anti-histone antibodies	أضداد الهستون
Apoptosis	موت الخلايا المبرمج
Apoptotic cells	الموت المبرمج للخلايا
Arthralgias and arthritis	التهاب المفاصل والتهابها
Atlas of Skin Diseases	أطلس الامراض الجلدية
Autoantibodies	الاجسام المضادة الذاتية
Autocrine	ذاتية الافراز
Autoimmune Hemolytic Anemias	فقر الدم التحلل المناعي للذات
Biological Function	الوظيفة الحياتية
Body mass index	دليل كتلة الجسم
Butterfly	الفراشة
C3 Nephritic Factor	العامل الكلوي للمتمم الثالث
C4 Nephritic Factor	العامل الكلوي للمتمم الرابع
Chemotaxis	الانجذاب الكيميائي
Chronic Disease	مرض مزمن
Chronic relapsing	أنتكاس مزمن
Classical Complement Pathway	مسار المتمم التقليدي
Complement Inhibitors	المتممات المثبطة
Complement System	نظام المتمم
Connective Tissue Diseases	أمراض النسيج الضام
Corticosteroid therapy	علاج الستيرويدات

Crest Syndrome	متلازمة كريست
Cytokine receptor genes	جينات مستقبلات السايتوكينات
Cytokines	الحركيات الخلوية
Cytokines genes	جينات السايتوكينات
Cytoplasmic Components	مكونات هيولية
Dendritic cells	الخلايا التشجرية
Differentiation	التمايز
Diffuse connective tissue disease	امراض النسيج الضام الرابط
Discoid rash	الطفح القرصي
Disease Activity	فعالية المرض
Endocarditis lesions	الافات القلبية
Endocrine	أفراز داخلي
Eosinophils	الخلايا الحمضة
Erosive skin lesions	الافة الجلدية التآكلية
Erythematosus	الاحمراري
Erythrocytes	خلايا الدم الحمراء
Esophageal dysmotility	تصلب المرئ
Ethnicity	العرق
Full Blood Count	تعداد الدم الكامل
Genetic polymorphisms	التباينات الوراثية
Glomerular changes	التغيرات الكبيبية
Glomerular Basement Membrane	قاعدة الغشاء الكبيبي
Glomerulonephritis	التهاب كبيبات الكلى
Glycoproteins	البروتينات السكرية
Gonadotropin-releasing hormone	الأضطرابات الهرمونية الموجهة من قبل الغدد التناسلية
Haematologic Disorder	الاعتلالات الدموية
Heterozygous	غير متجانسة التباين
Histone octamer	الهستون الخماسي
Homozygous	متجانسة التباين
Hypercholesterolemia	أرتفاع الكولسترول
Hyperprolactinemia	أرتفاع بروﻻكتين الدم
Hypoalbuminemia	نقص الالبومين
Idiopathic	أمرض مجهولة السبب
Idiopathic inflammatory myopathies	الألتهابات المرضية المجهولة السبب
Immunological complexes	المعقدات المناعية
Immunological Phenomena	الظواهر المناعية

Inflammatory Muscle Disease	امراض العضلات الألتهابية
Innate Immune Response	الاستجابة المناعية الفطرية
Innate Immune System	نظام المناعة الفطري
Iron Deficiency	نقص الحديد
Keratinocytes	الخلايا القرنية
Killing pathogens	قتل الممرضات
Leukopenia	نقص أعداد خلايا الدم البيضاء
Lupus	الذئب
Lupus erythematosus	داء الذئب الاحمراري
Lupus Nephritis	التهاب الكلى الذئبية
Lymphocytes	الخلايا اللمفاوية
Lysis	التحلل
Macrophages	الخلايا البلعمية
Malar rash	الطفح الوجني
Mannose-Binding Lectin Pathway	مسار اللكتين المرتبط بالمانوز
Maturation	النضج
Membrane Attack Complex	المعقدات المناعية المهاجمة للأغشية
Membrano Proliferative Glomerulonephritis	التهاب الأغشية الكبيبية الكلوية المتكاثر
Microsatellite	التابع الدقيق
Mild Flare	متوسط الشدة
Minisatellite	التابع الصغير
Monocytes	الخلايا الاحادية
Mortality	الوفيات
Multi systemic autoimmune Disease	أمراض المناعة الذاتية الجهازية المتعددة
Myositi	التهاب العضلات
Natural Killer Cells	الخلايا القاتلة الطبيعية
Nephritis	التهاب الكلى
Neutrophils	الخلايا العدلة
NO Flare	غير فعال
Non-Polymorphic Homozygous	الطرز الوراثية البرية غير المتباينة المتجانسة
Opsonization	الأستساغة
Oral ulcers	القرحة الفموية
Oxidative stress	الاجهاد التأكسدي
Paracrine	ذات أفراز محيطي
Phagocytosis	البلعمة
Photosensitivity	التحسس للضوء

Polymorphic Heterozygous	الطرز الوراثية المتباينة غير المتجانسة
Polymorphic Homozygous	الطرز الوراثية المتباينة المتجانسة
Polymyositis	التهاب العضلات المتعدد
Post-Infectious Glomerulonephritis	التهاب الكبيبات الكلوية بعد الاصابة
Primary Biliar Cirrhosis	تليف الكبد الصفراوي الاولي
Promoter	الحفاز
Protein Structure	تركيب البروتين
Psychosis	الذهان
Raynaud phenomenon	ظاهرة رينود
Redness	الاحمر
Renal Involvement	الاضطرابات الكلوية
Reproductive age	سن الانجاب
Rheumatic Disease	مرض رثياني
Risk Factor	عامل خطورة
Sclerodactyly	تصلب الأصبع
Self- Tolerance	التحمل الذاتي
Serositis	الألتهابات المصلية
Severe Flare	عالي الشدة
Small Nuclear Ribonucleoprotein	البروتينات النووية الرايبية الصغيرة
Somatic Mutation	الطفرة الجسمية
Telangiectasia	توسع الشعيرات
The Idiopathic Inflammatory	ألتهابات غير معروفة السبب
Thrombocytopenia	أعداد الصفائح الدموية
Transcription Factor	عامل الاستنساخ
U1 Small Nuclear Ribonucleic Acid Protiein Antibodies	الاجسام المضادة لمستضد بروتين الحامض النووي الرايبوزي الصغير
Wolf's bite	عضة الذئب

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1-2	مؤشرات التشخيص السريرية لمرض داء الذئب الأحمراري وفقاً للمقاييس المعتمدة من قبل الكلية الامريكية لأمراض الروماتيزم.	11
2-2	السايتوكينات المتباينة وراثيا المصاحبة لمرض داء الذئب الاحمراري.	25
3-2	مواقع وانواع التباينات الوراثية في حفاز جين البين الابيضاضي-10 المصاحبة للإصابة بمرض داء الذئب الأحمراري.	27
1-3	الاجهزة والادوات المستعملة في الدراسة.	29
2-3	المواد الكيميائية والبيولوجية المستعملة في الدراسة.	31
3-3	العدد التشخيصية المستخدمة في الدراسة.	32
4-3	دليل فعالية مرض داء الذئب الأحمراري.	33
5-3	المواد والمحاليل المستخدمة مع اختبار تركيز اضداد الدنا المزدوج الخيط.	36
6-3	المواد والمحاليل المستخدمة في قياس تركيز بروتين سي التفاعلي.	39
7-3	المواد المجهزة مع عدة اختبار الأجسام المضادة ضد النووية.	42
8-3	البوادئ المستخدمة في تضخيم جين البين الابيضاضي-10 بتقنية PCR.	50
9-3	مكونات مزيج التفاعل لتضخيم منطقة الحفاز لجين البين الابيضاضي- 10 بتقنية PCR .	50
10-3	البرنامج الحراري لتضخيم منطقة الحفاز لجين البين الابيضاضي-10بتقنية PCR .	51
1-4	العدد والنسبة المئوية بحسب الجنس لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الأصحاء.	53
2-4	العدد والنسبة المئوية بحسب الفئات العمرية لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الأصحاء.	54
3-4	العدد والنسبة المئوية للحالة الاجتماعية في عينات المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى في عينة من المرضى العراقيين.	55
4-4	معدل كتلة الجسم لداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	56

5-4	أعداد خلايا الدم البيضاء في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	57
6-4	أعداد خلايا الدم الحمراء في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	58
7-4	معدل تركيز الهيموغلوبين في الدم في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	59
8-4	أعداد الصفيحات الدموية في عينات دم المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة مع السيطرة الاصحاء.	61
9-4	معدل ترسيب كريات الدم الحمراء لعينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	62
10-4	معدل تركيز بروتين سي التفاعلي في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء	64
11-4	أضداد الدنا مزدوج الخيط في مصل الدم لعينة مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بعينة السيطرة الاصحاء.	66
12-4	تركيز المتمم الثالث في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	67
13-4	تركيز المتمم الرابع في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء .	69
14-4	التحري عن أضداد الجسيم النووي في أمصال الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء .	71
15-4	التحري عن أضداد سميث في أمصال الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	74
16-4	التحري عن أضداد السنترومير في مصل الدم لعينات المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	76
17-4	التحري عن أضداد مستضد متلازمة سوغرين من النوع Ss-A/Ro60 في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	78
18-4	التحري عن أضداد مستضد متلازمة سوغرين من النوع ss-A/Ro52 في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	79

19-4	التحري عن الاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من النوع SS-B/La في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء .	81
20-4	التحري عن الاجسام المضادة لمستضد بروتين الحامض النووي الرايبوزي الصغير في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	83
21-4	التحري عن الاجسام المضادة للمستضد Mi-2 في مصل الدم لعينات مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	84
22-4	التحري عن أضداد المستضد ku في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء .	86
23-4	التحري عن أضداد الهستون في أمصال الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	87
24-4	معدل قياس فعالية المرض لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء.	90
25-4	توزيع التراكيب الوراثية والتكرار الاليلي في مجموعة المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى بالمقارنة مع السيطرة الاصحاء.	98

قائمة الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1-2	العوامل الوراثية والبيئية والهرمونية المسببة لمرض داء الذئب الأحمراري	7
2-2	العوامل الوراثية والبيئية والمناعية والهرمونية المحفزة لإنتاج بروتينات المناعة الذاتية في مرضى داء الذئب الأحمراري.	9
3-2	ارتباط أضداد الضد سميث مع البروتينات النووية الرايبية الصغيرة	15
4-2	أثر نظام المتمم بالإصابة بداء الذئب الأحمراري والتهاب الكلية الذئبية	19
1-3	منحنى تقدير تراكيز اضداد شريط الدنا مزدوج الخيط في المصل	38
2-3	المنحنى القياسي لتقدير تركيز اضداد البروتين سي التفاعلي في المصل	41
1-4	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(3%) للدنا المجيني المستخلص من عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري وعينات السيطرة الاصحاء .	90
2-4	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز لنتائج التضاعف. كانت ظروف الترحيل كما يلي: 3% اكاروز، الفولتية 100 فولت لمدة 90 دقيقة، وتم التصبيغ باستخدام صبغة بروميد الأثيديوم.	92
3-4	**الخارطة الوراثية في التعاقب النكليوتيدي لجين البين الابيضاضي -10 .(أ) التعاقب النكليوتيدي مصغر مئات المرات للجين والتعاقب النكليوتيدي لحفاز الجين الذي يتضمن موقع التباين لعينات السيطرة الاصحاء ومرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى .(ب): التعاقب النكليوتيدي لحفاز الجين وموقع التباين لعينات الدراسة المختلفة.**	95

قائمة الصور

رقم الصور	عنوان الصور	الصفحة
1-2	داء الذئب الاحمراري ويلاحظ شكل الفراشة على الوجه .	5
1-3	قالب التقييم القياسي لحزم الاضداد الذاتية.	44

قائمة الملاحق

رقم الملحق	عنوان الملحق	رقم الصفحة
1	استمارة المعايير المعتمدة من قبل الكلية الامريكية لأمراض الروماتيزم لتشخيص مرض داء الذئب الأحمراري	125
2	الاستمارة الخاصة بالمريض	126
3	استمارة مؤشرات نشاط مرض داء الذئب الأحمراري	128-127
4	استمارة تحاليل الاجسام الضد النووية	129
5	اقطار الدوائر المتكونة حول الحفر لمتمم الثالث والرابع في عينات المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى	130
6	استمارة التراكيز القياسية للمتمم الثالث (C3)	131
7	استمارة التراكيز القياسية للمتمم الثالث (C4)	132

1- المقدمة (Introduction)

يعد داء الذئب الأحمراري (SLE) من أمراض المناعة الذاتية الذي يؤدي الى اعتلال العديد من أجهزة الجسم كالجهاز العصبي والكلى والمفاصل والقلب والرئتين مما يحفز أنتاج الاجسام المضادة الموجهة ضد العضيات والتراكيب الخلوية كالحوامض النووية والبروتينات المختلفة(Zhao وآخرون 2016) .يهاجم مرض داء الذئب الأحمراري العديد من أجهزة الجسم ومختلف أنواع الخلايا مما يحفز الجهاز المناعي على تفعيل الاستجابة المناعية الذاتية فضلاً عن أحداث الالتهابات النسيجية المتفاقمة (Li وآخرون ،2015) . تتأثر استجابة الاشخاص للإصابة بالمرض بالعديد من العوامل البيئية والفسلجية كالاضطرابات في أنتاج الهرمونات الأنثوية والعوامل الوراثية وتنظيم التعبير الجيني فضلاً عن العوامل المناعية المتمثلة بطبيعة الخلايا المناعية وآلية عملها (Patsinakidis وآخرون ،2016) . أذ يتعرض نظام المناعة الفطري (Innate Immune System) الى الاضطراب مما يؤدي الى أنتاج الاجسام المناعية الذاتية المضادة غير المنتظمة إضافة الى التراكيب المناعية المركبة، حيث يفقد الجهاز المناعي قدرته على التمييز بين الاجسام الغريبة وأنسجة الجسم مما يقود الى مهاجمة تلك الاضداد ومختلف خلايا وأنسجة الجسم (Squatrito وأخرون،2014). ومن أهم هذه الأضداد هي مضادات نواة الخلية (ANA) وأضداد الحامض النووي مزدوج الخيط (anti-dsDNA) وغيرها ويعزى ذلك الى الاستثارة غير الطبيعية للخلايا التائية والخلايا البائية وأن وجود هذه الاضداد في مصل الدم يعد سمة تشخيصية للمرض (Dema و Charles ،2014) .

تختلف المظاهر السريرية لمرض داء الذئب الأحمراري باختلاف الجنس والعرق والجغرافيا ، إذ يكون أوسع انتشارا في المجتمعات الاسيوية والأفريقية مقارنة بالمجتمعات الأوربية (Chai واخرون، 2012) .

يصاحب الإصابة بداء الذئب الأحمراري آلام المفاصل والتهابها (Arthralgias and arthritis) وطفح في الوجه والجلد (Malar and skin rash) والتهاب الأغشية حول الرئتين والقلب (pleuritis) ، كما تشمل الإصابة الكليتين والتهابهما (Renal involvement) مسبباً الفشل الكلوي (Mohan و Putterman ، 2015) . ومن المظاهر الأخرى للمرض هي المظاهر

الدموية التي يرافقها حدوث الاضطرابات الدموية من نقص أو زيادة في أعداد خلايا الدم البيضاء والحمراء والصفيحات الدموية وفقر الدم(Azizoddin واخرون، 2017) .

يؤدي الجانب الوراثي دوراً كبيراً في تطور مرض داء الذئب الأحمراري، إذ تشير الدراسات الى وجود علاقة بين الخصائص الجزيئية لبعض الجينات والإصابة بالمرض من خلال ظهور حالات جديدة في الأسر التي يوجد مصاب بالمرض بين أفرادها، كما تشير الدراسات على التوائم المتطابقة الى أن احتمالية حدوث المرض تصل الى 25%في حالة كون أحدهما مصاب من ناحية أخرى، فقد لوحظ أن التباين الوراثي في بعض الجينات مثل جينات الحركيات الخلوية قد يكون مؤشراً جزئياً مصاحباً للإصابة بالمرض (Yapو Lai ، 2013). ومن هذه الحركيات الخلوية IL-2و IL-4وIL-6 وIL-10 و IL-12 . وأن التباين الوراثي أحادي النكليوتيدة في جين IL-10 يؤدي الى استثارة الخلايا البائية والتائية وتنشيط أنتاج الأضداد الذاتية غير المنتظمة فضلاً عن تثبيط أنتاج الحركيات الخلوية للخلايا المساعدة (Robinson و Werth ، 2015) . يقع جين البين الابيضاضي ـ 10 على الذراع الطويل لكرموسوم واحد q31–32 ، وقد اكتشفت ثلاثة تباينات وراثية في تركيب الجين لها علاقة بالإصابة بمرض داء الذئب الأحمراري .(Crispin و أخرون،2013) ، كما تؤثر هذه التباينات مع درجة او شدة نشاط المرض نظراً لتحفيزه للخلايا البائية وإنتاج الكلوبيولين المناعي (Leone وأخرون، 2015).

1–2 أهداف الدراسة

نظراً لعدم وجود دراسة محلية على طبيعة التباين الوراثي في جين البين الابيضاضي ـ10 وعلاقته بالإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى في المجتمع العراقي، لذا هدفت هذه الدراسة الى التحري عن التباين الوراثي في الموقع rs1800872 ضمن منطقة حفاز جين البين الابيضاضي ـ 10 وعلاقته بالإصابة بمرض داء الذئب الأحمراري والمؤشرات الكيموحيوية (السريرية) المصاحبة للمرض في عينة من المرضى العراقيين . ولتحقيق هذا الهدف أجريت في هذه الدراسة كل من الخطوات الآتية :

1- جمع عينات الدم من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى فضلاً عن جمع عينات الدم من السيطرة الأصحاء للمقارنة مع المرضى .

2- التحري عن بعض المؤشرات السريرية المصاحبة للمرض والمتمثلة بما يأتي :

أ- المؤشرات المناعية التي شملت أضداد الدنا مزدوج الخيط ، وبروتين سي التفاعلي ، والمتممين الثالث C3 والرابع C4 والأضداد النووية المتمثلة بكل من أضداد الجسيم النووي وأضداد الهستون وأضداد سميث وأضداد السنترومير وأضداد مستضد متلازمة سوغرين وأضداد المستضد ss-A/Ro52 وأضداد المستضد ss-B/La ، وأضداد مستضد بروتين الحمض النووي الرايبي وأضداد المستضد Mi-2 وأضداد المستضد Ku.

ب- مؤشرات الدم والتي شملت كل من معدل ترسيب كريات الدم الحمراء وأعداد كريات الدم البيضاء واعداد كريات الدم الحمراء والصفيحات الدموية وتركيز الهيموغلوبين .

3- التحري عن فعالية ونشاط مرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى .

4- استخلاص الدنا المجني من عينات الدم لمرضى المفاصل والكلى والسيطرة الأصحاء .

5- تضخيم جين البين الابيضاضي-10بتقنية الـ PCR باستخدام بادئات نكليوتيدية متخصصة لحفاز الجين يتضمن موقع التغاير rs1800872 ولجميع عينات الدراسة .

6- تحديد التعاقب النكليوتيدي للقطع المضخمة والتحري عن التباين الوراثي في المنطقة المدروسة ضمن حفاز جين البين الابيضاضي -10 والكشف عنها بطريقة التراصف النكليوتيدي لكل عينة من عينات الدراسة بالمقارنة مع التعاقب المصدري (Reference Squence) المثبت في قاعدة بيانات الحوامض النووية البشرية ضمن موقع NCBI على الشبكة العنكبوتية (Internet) .

7- تحديد الطرز المظهرية المختلفة في عينات الدراسة وعلاقتها بالمؤشرات السريرية للمرض.

2- استعراض المراجع

2- 1 نبذة تأريخية (History)

يُعد مرض داء الذئب الأحمراري (Lupus Erythematosus) من أمراض المناعة الذاتية التي تصيب الانسان. وتعني كلمة Lupus باللغة اللاتينية الذئب في حين تعني (Erythematosus) الاحمرار (Redness) وهو أول مصطلح أستخدم خلال العصور الوسطى لوصف الآفات الجلدية التآكلية (Erosive skin lesions) التي تشبه عضة الذئب Wolf's (bite)، وفي العام 1846 أستخدم العالم والطبيب النمساوي Ferdinand vonHebra مصطلح الفراشة (Butterfly) لوصف الطفح الوجني (Malar rash) الظاهر على الانف والممتد الى الوجنتين كما مبين في الصورة (2-1)، وهو اول من أستخدم مصطلح الذئب الأحمراري (Lupus Erythematosus)، ويعد أول من وضع الرسوم التوضيحية في كتابه أطلس الأمراض الجلدية (Atlas of Skin Diseases) في عام 1856. في حين ان أول من وصف داء الذئب على أنه من الأمراض الجهازية (Systemic Disease) هو العالم Moriz Kaposi. كما وصُفت المظاهر الجهازية والجلدية للمرض من قبل العالم Osler و Jadassohn في فينا، و يعد كلا من العالمين Libman وSacks أول من وصفا آفات القلب (Endocarditis lesions) المصاحبة لداء الذئب الأحمراري في العام 1923. وصُفت التغيرات الكبيبية (Glomerular Changes) في العام 1935 من قبل العالم Baehr. ان أول من وصف المرض على أنه من أمراض النسيج الضام الرابط (Tissue Disease Diffuse Connective) هم العلماء Klemperer وPollack وBaehr في العام 1941. ومع بداية العصر الحديث أُكتشفت خلية الذئبة الحمراء (LE cell) من قبل العلماء Hargraves و Richmond و Morton في العيادات الطبية في مايو لعام 1948 (Bertsias واخرون، 2010a). أشتق أسم المرض من الطفح الذي يظهر على وجه المريض ويشبه جبهة الذئب وهو أحد العلامات المرضية المهمة التي تظهر على بعض المرضى، وقد أطلق العلماء مصطلح الجهازي (Systemic) لكون المرض يصيب اجهزة الجسم المختلفة وبذلك يسمى في الوقت الحاضر Systemic Lupus Erythematosus لوصف هذا المرض (Bertsias واخرون، 2010b).



صورة (2-1) داء الذئب الأحمراري ويلاحظ شكل الفراشة على الوجه (Wolff واخرون ،2009) .

2-2 داء الذئب الأحمراري (Systemic Lupus Erythematosus)

يعد داء الذئب الأحمراري (Systemic Lupus Erythematosus) أحد أمراض الانتكاس المزمن (Chronic Relapsing) للمناعة الذاتية التي تؤثر على النساء في المقام الأول. وتتزامن الاصابة بالمرض بإنتاج الأجسام المضادة الذاتية (Autoantibodies) لجزيئات الحوامض النووية وغيرها من مولدات الضد (Antigens) الخلوية مما يؤدي إلى تكوين المعقدات المناعية وترسبها في الاعضاء الجهازية مما يسبب الالتهاب والضرر في ذلك العضو(Rai واخرون ،2006). كما يعد المرض من الامراض المزمنة (Chronic Disease) حيث يؤدي فيها الجهاز المناعي للشخص المريض دوراً عكسيا ، فالأضداد التي ينتجها الجهاز المناعي تعمل على مهاجمة الخلايا والأنسجة السليمة بدلا من المصابة ، وتترسب تلك المعقدات و تهاجم الأعضاء الداخلية المختلفة للجسم كالرئة و القلب و المفاصل والدم و الكلى و الدماغ والجلد . ويعد داء الذئب الأحمراري مرضا رثيانيا (Rheumatic Disease) لتسببه أوجاعاً وألماً وتصلباً في المفاصل والعضلات والعظام . Kozora واخرون ،2012) .هذا وتزداد ضراوة المرض عندما يكون لبعض الأشخاص الأستعداد الوراثي للإصابة بالمرض فضلاً عن العوامل التي تساعد في تقدم المرض كالعوامل البيئية مثل الأشعة فوق البنفسجية والسليكا والعوامل المعدية التي تسبب الإجهاد التأكسدي (Stress Oxidative) (Farhat واخرون ،2011؛ Zandman واخرون 2012). كما ان الافراط في

تعاطي الادوية يمكن ان يؤدي الى التسبب في المرض عند الأشخاص الذين لديهم استعداد وراثي للإصابة بالمرض (Richardson و Primer،2007) .

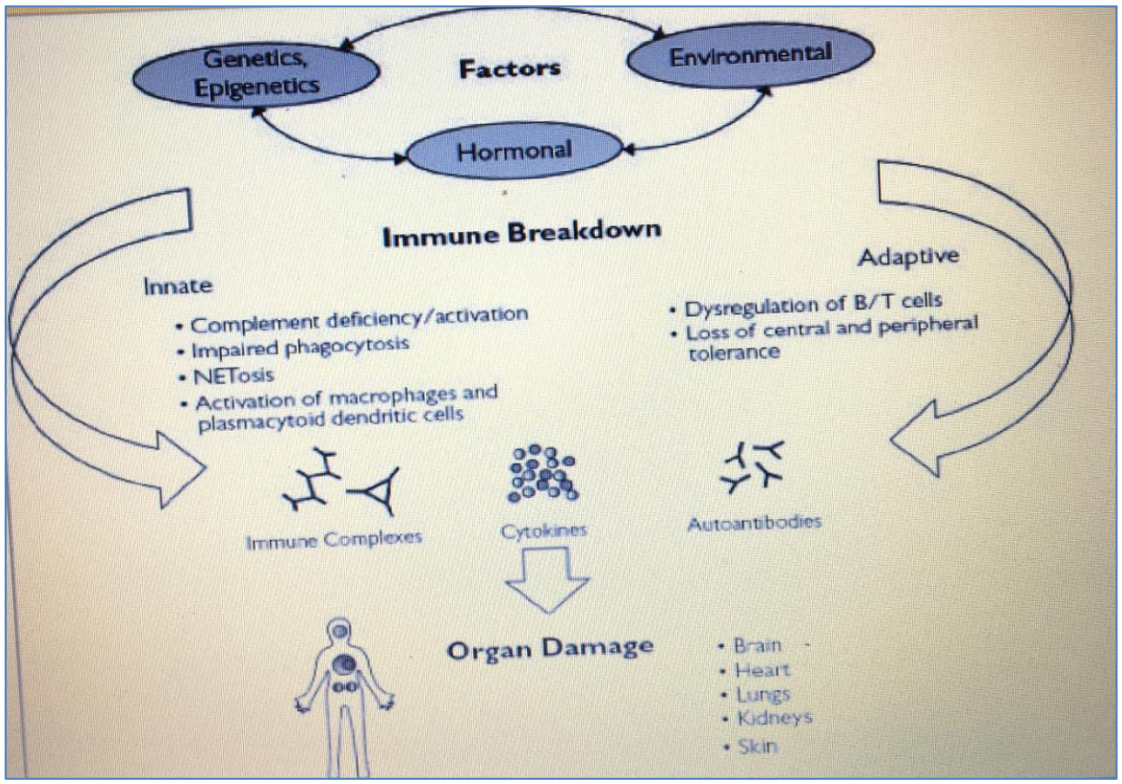
يعد داء الذئب الأحمراري من أمراض المناعة الذاتية الجهازية المتعددة (Multi Systemic Autoimmune) الذي يظهر أختلافا في حدوثه وانتشاره بين السكان.وفي المراحل المتقدمة يتمركز تأثير المرض على الكلى مسبباً التهاب الكلى الذي يؤدي الزيادة بمعدلات الوفيات (Mortality Wei واخرون، 2016)، وفي كثير من الحالات يصعب التشخيص المبكر للمرض لحدوث الاصابة وعدم ظهور المؤشرات المميزة للمرض (Danchenko واخرون،2006)

من المميزات السيئة المصاحبة للمرض هو ان أضداده الذاتية المنشأ يمكنها التفاعل مع عضيات الخلية المختلفة مثل المايتوكوندريا والجسيمات الصغرية مثل الرايبوسومات والنواة والدنا (DNA) والهستونات ملحقةً ضرراً بالغاً بهذه العضيات (Lawrence وخرون،1996). ولا يوجد علاج محدد لمرض الذئب الأحمراري، ولكن تعطى عادة علاجات التثبيط المناعي للحد من الأضرار المناعية الناتجة عن الاصابة بالمرض. وقد تعطى للمرضى العلاجات الستيرويدات القشرية (Corticosteroid Therapy) التي تسبب في الاصابة بأمراض القلب والاوعية الدموية المميتة . (Alarcon واخرون ،2007) .

3-2 وبائية المرض Epidemiology of SLE

يعد داء الذئب الأحمراري من الأمراض الوبائية الشائعة المنتشرة في أنحاء العالم جميعاً إذ يمكن أن يصيب الفئات العمرية المختلفة ، ويتراوح معدل انتشاره بين السكان في جميع أنحاء العالم بين 20- 150 حالة لكل 100000 نسمة وتزداد هذه النسبة في النساء مقارنة بالرجال وتتباين هذه النسبة في المجتمعات المختلفة ،أذ تبلغ 164 في مواطني القوقاز في حين تبلغ 406 في المواطنين السود في أمريكا (Somers واخرون ،2014). وقد لوحظ أن الاصابة بالمرض لدى النساء أكثر بتسع مرات من الاصابة به لدى الرجال ولا سيما النساء في أعمار الإنجاب (15-35) سنة (Danchenko، 2006) . ويؤثر كلٌ من الجغرافيا والعرق (Ethnicity)على معدلات انتشار

المرض وخطورته من حيث المظاهر السريرية والمخبرية.وتشير الدراسات الى أن هذا المرض يكون أكثر انتشارا في سكان المناطق الحضرية مقارنة بالمناطق الريفية كما أنه يعد أكثر انتشارا بين الآسيويين والأمريكيين ذوي الأصول الأفريقية والأفرو كاريبية وامريكا اللاتينية مقارنة مع الأميركيين المنحدرين من أصول أوروبية في الولايات المتحدة، وبين الهنود الآسيويين مقارنة بالقوقازيين في المملكة المتحدة في نيوزيلند (Ferucci واخرون ،2014) ومن خلال هذه الدراسات يمكن القول أن الاختلاف العرقي يؤثر في انتشار مرض الذئب الأحمراري، والذي قد تكون اكثر تأثيرا من العوامل الاخرى كالقابلية الوراثية والعوامل البيئية والتغيرات الهرمونية والتعرض للأشعة فوق البنفسجية .وكما مبين في الشكل (2-1).



الشكل (2-1): العوامل الوراثية والبيئية والهرمونية المسببة لمرض داء الذئب الأحمراري(Lloyd وأخرون،2016)

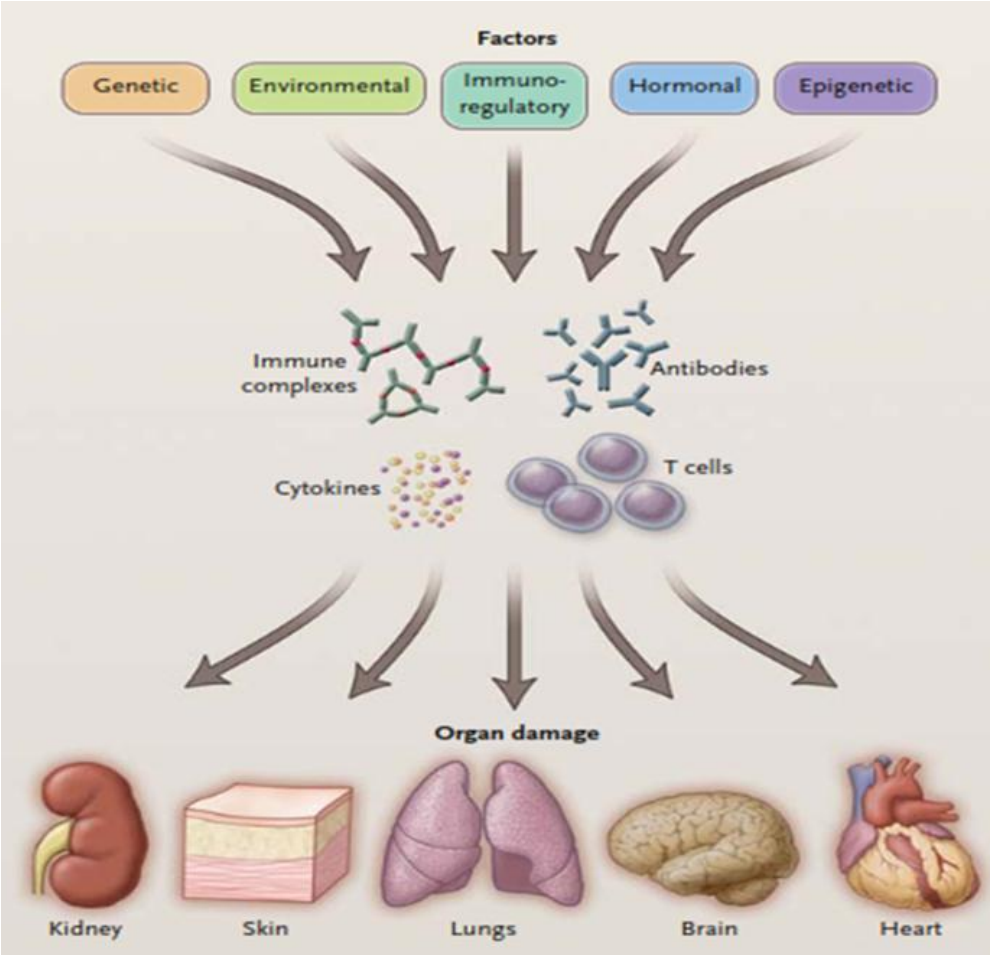
وقد وجد ان هناك علاقة بين الفئة العمرية وامكانية الإصابة بالمرض، إذ تكون الاصابة لدى النساء أثناء فترة المراهقة (Adolescence) اشد فتكاً (Aggressive) مقارنة بالنساء البالغات وتقل حدة المرض اكثر لدى النساء من قبل بداية انقطاع الطمث وحتى المراحل المتأخرة من العمر (González واخرون 2014).

2-4- الاستجابة المناعية لداء الذئب الأحمراري

يُعتبر داء الذئب الأحمراري من أمراض المناعة الذاتية الجهازية المزمنة التي تصيب أعضاء مختلفة من الجسم، وتظهر الصفات المظهرية من خلال تكوين الأجسام المضادة وتكوين المركبات المناعية التي ترتبط مع المظاهر السريرية وتلف تشكيلة واسعة من الأنسجة(D'Cruz وآخرون 2007). وقد وجد أن للمكونات المناعية المتعددة أثراً في الإصابة بداء الذئب الأحمراري مثل الأجسام المضادة والخلايا التائية والمعقدات المناعية (Immunological Complexes) و الحركيات الخلوية (Cytokines) وكما موضح في الشكل (2-3) فعند الإصابة بالمرض يتم توجيه معظم الأجسام المضادة لاستهداف البروتينات والجزيئات الخلوية المختلفة .وقد وجد أن الأجسام المناعية ضد النووية (ANAs) تنتج في 98% من المرضى، كما تنتج الأجسام المضادة للدنا مزدوج الخيط في 50- 80 % من هؤلاء المرضى (Elizabeth واخرون ،2008) وهناك العديد من العوامل المؤثرة في الاستجابة للمرض كالغدد الصماء والتمثيل الغذائي و العوامل البيئية، والعوامل الوراثية (Lee وBae 2015). ومن خلال ذلك يمكن أن تشترك عوامل بيئية وأخرى جينية مع جينات معينة مهيئة وراثيا لإظهار الأستجابة المناعية ضد الذات (Peacman و Vergani،1997)

تشير الدراسات المعنية بداء الذئب الأحمراري أيضاً الى أن الإصابة بالمرض قد تتأثر بعدة عوامل كالجنس ، والعرق ، والعوامل الوراثية إذ تحدث الإصابة بنسبة 90% في النساء عما هو عليه في الرجال (Lawrence .واخرون،1996) ويعود سبب أرتفاع نسبة الإصابة بالمرض لدى النساء الى أن الهرمونات الجنسية الأنثوية تؤدي دورا مهماً في قابلية الإصابة وظهور أعراض المرض.إذ أثبتت الدراسات أن هرمون الأستروجين يساعد على تكوين الأضداد ضد الحامض النووي

الدنا مزدوج الخيط التي تزيد من شدة الأعراض المرضية، وعلى العكس من ذلك فقد لوحظ أن هرمونات الذكورة (Androgens) تقلل من تكوين الأضداد وهذا ما يفسر حدوثه في الأناث بنسبة أكبر من حدوثه في الذكور (Tornwall واخرون،1999 ؛ Whitacre ،1999) .و بذلك فإن العوامل البيئية المسببة للمرض تزيد من نسبة الإصابة في الأشخاص الذين يصاحبهم ميل وراثي للإصابة بالمرض. وكما موضح بالشكل (2-2) .



شكل(2-1) : العوامل الوراثية والبيئية والمناعية والهرمونية المحفزة لإنتاج بروتينات المناعة الذاتية في مرضى داء الذئب الأحمراري (Tsokos, ، 2011).

في دراسة أجريت على التوائم وجد أنَ معدل التوافق لداء الذئب الأحمراري يحدث بنسبة 24% في التوائم الأحادية الزيجة بينما تكون نسبة التوافق 3% فقط في التوائم الثنائية الزيجة (Deapen واخرون، 1992) .وهناك مواقع رئيسة في ضمن معقد التوافق النسيجي ومناطق أخرى ثانوية تم تحديدها بوصفها عوامل استجابة وراثية مهمة .بالإضافة الى مجموعة من المشاكل المناعية التي تشترك بالإصابة بداء الذئب الأحمراري (Patra وأخرون ،2011).

2ـ5 ـ المؤشرات التشخيصية للمرض (Diagnostic parameters)

هناك العديد من المعايير المعتمدة لتشخيص مرض داء الذئب الأحمراري ومن هذه المعايير ما يأتي :

2 ـ5 ـ1 مؤشرات التشخيص السريرية (Clinical Diagnostic Parameters)

ان مؤشرات التشخيص السريرية الأكثر اعتمادا هي تلك التي وضعتها الكلية الأمريكية لأمراض الروماتيزم (American College of Rheumatology)(ACR) والتي سميت بمعيار تان الخاص بمرض الذئب الأحمراري ويضم هذا المعيار احد عشر مؤشرا تشخيصياً للمرض وكما مبين في الجدول (2–1). ان ظهور اربعة من هذه المؤشرات في الوقت نفسه وبشكل متسلسل او اني يعد دليلاً للإصابة بداء الذئب الأحمراري .(Tan واخرون ،1982؛ Yu واخرون 2014) .

جدول (2– 1) مؤشرات التشخيص السريرية لمرض داء الذئب الأحمراري وفقاً للمقاييس المعتمدة من قبل الكلية الامريكية لأمراض الروماتيزم (Petri واخرون،2012)

ت	الدليل التشخيصي	الوصف
1	الطفح الوجني Malar Rash	طفح جلدي حول الوجنتين والأنف ويكون بشكل مُسطَّح أو مُرتفع ،شبيه بشكل الفراشة
2	الطفح القرصي Discoid Rash	طفح جلدي بشكل لطخات إحمرارية مرتفعة مع غطاء من القرنين وظهور ندب أو آفات ضامرة
3	الحساسية لضوء الشمس Photosensitivity	طفح جلدي كنتيجة للتحسس أو التفاعل غير الطبيعي لضوء الشمس
4	التقرحات الفموية Oral Ulcers	ظهور تقرحات في الفم غير مؤلمة عادة
5	التهاب المفاصل Arthritis	التهاب المفاصل غير التآكلي الذي يصيب مفصلين او اكثر من المفاصل الطرفية ويتميز بألام عند اللمس (Tenderness) والانتفاخ (Swelling)
6	التهابات المصلية Serositis	ويتضمن التهاب الجنبة (Pleuritis) ،والتهاب التامور (Pericarditis)
7	أعتلالات كلوية Renal Disorders	ـــ بيلة بروتينية (Protenuria) دائمة ـــ قوالب خلوية(Cellular Casts)
8	اضطرابات عصبية Neurologic Disorders	ـــ الذهان (Psychosis) ـــ النوبات العصبية (Seizures)
9	اضطرابات دموية Hematologic Disorders	ـــ فقر الدم الانحلالي (Hemolytic Anemia). ـــ قلة الخلايا الدموية البيضاء (Leukopenia). ـ قلة الخلايا اللمفاوية (Lymphopenia). ـ قلة الصفيحات الدمية (Thrombocytopenia)
10	اضطرابات مناعية Immunological Disorders	النتيجة الموجبة لأختبار داء الذئب الاحمراري او ظهور اضداد الدنا بمستويات غير طبيعية أو اضداد سمث او اضداد الشحميات الفسفورية (شحم القلب)او نتيجة موجبة كاذبة لاختيار السفلس
11	الاضداد النووية Antinuclear Antibody	مستويات غير طبيعية من الاضداد النووية .

2-5 -2 مؤشرات التشخيص المناعية Immunological Diagnostic Parameters

وتشمل :

2-5-2-1: الأضداد النووية (Antinuclear Antibodies)

تمثل الأضداد النووية (ANAs) السمة المصلية المميزة في تشخيص الأمراض الروماتيزمية وأمراض المناعة الذاتية (Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases) (SARD) مثل داء الذئب الأحمراري (SLE)، التصلب الجهازي (Systemic sclerosis) (SSC)،ومتلازمة سوغرين (Sjögren's syndrome) (SJS)، أو التهاب العضلات (Polymyositis)(PM) (Mahler،2010). وتكون هذه الاضداد النووية الذاتية تكون موجهة عادة ضد محتويات نواة الخلية، وقد وجد أنها تكون أعلى معيارية في الأشخاص المصابين بأمراض المناعة الذاتية كمرض SLE مقارنة مع الأفراد الأصحاء (Mitchell واخرون ،2007) ، وأن الكشف عن هذه الأضداد في المصل يعد مؤشرا للإصابة بهذا المرض فضلا عن غيرها من أمراض المناعة الذاتية (Rahman و Isenberg ،2008) .

ومن الاضداد التي يتم التحري عنها في مصول المرضى للتحري عن الاصابة بمرض داء الذئب الأحمراري كل من الاضداد الأتية :

2-5-2-1- 1 اضداد الدنا (Anti-DNA Antibodies)

أُكتشفت أضداد الدنا مزدوج الخيط (ds-DNA) واضداد الدنا المفرد الخيط (ss-DNA) في مصول مرضى داء الذئب الأحمراري في العام 1957، وقد لوحظ ان هذه الاضداد تكون موجودة بشكل طبيعي لدى الاشخاص الاصحاء الا ان الفتها ضعيفة للحوامض النووية ، وفي حالة حدوث بعض الطفرات الجسمية (Somatic Mutation) يمكن ان تتحول هذه الاضداد الى اضداد ذات الفة عالية للحوامض النووية مزدوجة ومفردة الخيط (Benjamini واخرون ،2000) وتستخدم أضداد الدنا بشكل عام واضداد الدنا مزدوج الخيط بشكل خاص في الكشف عن الكثير من امراض المناعة الذاتية ومنها داء الذئب الأحمراري (Poulsen ،2016)،أذ يعد وجود هذه الاضداد في المصل دليلا تشخيصيا للمرض وخاصة في المراحل المتقدمة للمرض التي تؤدي الى حدوث

مضاعفات جانبية مثل التهاب الكلى (Nephritis) ، وذلك لارتباطها بالدنا الموجود في الخلايا لتتكون معقدات مناعية تترسب في مجرى الدم وبالتالي استقرارها في الكلية عند قاعدة الغشاء الكبيبي (Glomerular Basement Membrane) مما يؤدي الى تفعيل نظام المتمم وتحرير بروتين البيلة وحدوث النزف الدموي (Compagno واخرون، 2015) .

2-5-2-1-2 الاجسام المضادة ضد الجسيم النووي Anti Nucleosome antibodies

تؤدي الاصابة بداء الذئب الأحمراري الى توليد الجهاز المناعي للأجسام المضادة الموجهة ضد الجسيمات النووية وهي عبارة عن بروتينات نووية مرتبطة مع الكروموسومات بهيئة الكروماتين. ويعرف النيكلوسوم بأنه الوحدة الاساسية للكروماتين وتتكون من 146 زوجاً قاعدياً من الدنا الكروموسومي تلتف حولها وحدات ثمانية من الهستون (Histone octamer) التي تكون موجودة في النواة بخمسة انواع هي H1 و H2A و H2B و H3 و H4 وقد ترتبط الاجسام المضادة الموجهة للنواة مع هذه الهستونات لتسمى اضداد الهستون (Anti-histone antibodies) (AHA) (Vanو Berden، 2011) . وقد أُكتشفت أنواع أخرى من الاجسام المضادة كبيرة ذاتية متخصصة الى جانب هذه الاجسام هي الاجسام المضادة ضد الجسيم النووي في غالبية مرضى داء الذئب الأحمراري والتي تكون متجمعة على سطح خلايا تمر بمرحلة الموت المبرمج (Apoptotic cells)، تُحرر هذه الاجسام بصورة طبيعية عن طريق الإزالة السريعة للخلايا ذات الموت المبرمج وكما هو موصوف من قبل Sarzi-Puttini واخرون (2005)، تؤدي الجسيمات المركزية دورا محوريا في تدهور الاجزاء النسيجية وعلى وجه الخصوص التهاب كبيبات الكلى (Glomerulonephritis) في الذئبة الكلوية حيث يُكون كلٌ من الجسيمات المركزية والاجسام الموجهة ضد الاجسام المركزية ومعقدات الجسيم المركزي الغلوبيولين المناعي ترسبات مناعية على الكبيبات، وان وجودها يعد دليلاً تشخيصيا للمرضِ (Ullal وأخرون، 2011؛ Rekvig وأخرون، 2012) .

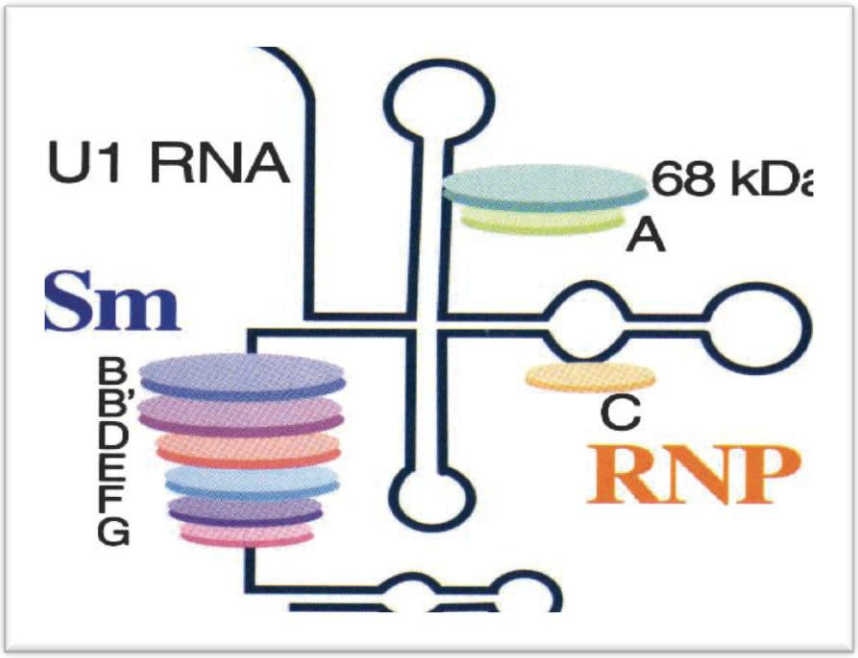
2-5-2-1-3 اضداد الهستون Anti-Histone Antibodies

تعرف الهستونات بأنها عبارة عن بروتينات قاعدية موجبة الشحنة في نواة خلايا الكائنات الحقيقية النواة ترتبط مع الدنا سالب الشحنة فتساعد على انضغاطه والتفافه التفافا فائقاً وتكاثفه داخل النواة . وتشكل الهستونات التركيب الاساس الذي يتكون منه الكروماتين (الصبغين)، وقد أُشير الى دورها في الفعالية المستضدية للمكونات النووية، وكما أشار كل من Sun و أخرون (2008) الى ان 50% من مرضى داء الذئب الأحمراري لديهم الاجسام المضادة للبروتينات النووية الذائبة الموجهة ضد معقد التوافق الدنا – هستون وان الفعالية المستضدية تكمن في الهستون وليس في الدنا كما أشاره اليه Dieker واخرون، (2016) وكما بينت الدراسات وجود الاجسام المضادة للهستون بنسبة 75–95% في مصل المرضى الذين يتعاطون الادوية الخاصة بالمرض .كما توجد بنسبة 75 % في حالات مرضية أخرى مجهولة السبب (Idiopathic) (Katz، 2010).

2-5-2-1-4 اضداد سميث واضداد البروتينات النووية الرايبية Anti-Smith and Ribonucleoprotein Antibodies

تعد اضداد سميث (sm) من اضداد البروتينات النووية الرايبية عالية التخصص لمرض داء الذئب الأحمراري، و سميت بهذا الاسم بعد أكتشافها في مصل دم أحد المرضى اسمه Stephanie) Smith) فسميت بأسمه. ولا تكون هذه الاضداد متوافرة في مصول دم الأصحاء او المصابين بأمراض جهازية رثيانية أخرى. لذا فإن وجودها يعد دليلاً للإصابة بالمرض (Eisenberg واخرون ،1990) . تعد أضداد سميث من الاجسام المضادة ضد المستضدات النووية والهيولية وصفت لأول مرة من قبل Tan و Kunkel ، إذ تعد هذه الاجسام المضادة علامة محددة للمرضى البالغين المصابين بداء الذئب الأحمراري وفقا لمعايير الجامعة الامريكية لأمراض الروماتيزم ومع ذلك تكرارها لدى المرضى البالغين منخفض بمعدل (5% الى 30%) بالاعتماد على الاختبارات المصلية والعرقية (Jaekel وأخرون، 2001). كما بين Zieve وKhusial (2003) على ان الجهاز المناعي يقوم بتوجيه سبعة انواع من أضداد سميث هي (B/B وD1 وD2 وD3 وE وF و G) لتتأثر مع البروتينات النووية الرايبية الصغيرة Small Nuclear Ribonucleoprotein

(snRNP) مثل البروتينات A وC وكما موضح بالشكل (2-3). ويعتقد أن سبب ظهور هذه الاضداد وخصوصيته بالمرض يرتبط بوبائيات المرض كما تشير الى حصول عدوى فايروس Epstein-Barr virus ويكون لديه القدرة على الحث للإنتاج الاجسام المضادة ضد سميث عن طريق المحاكاة الجزيئية التي تؤدي دوراً مهماً في الحث على تكوين anti-RNP و anti-Sm (Monneaux وآخرون ،2003) لذلك تعد هذه الاجسام المضادة علامة تشخيصية للمرض، وتأتي دائماً مترافقة مع البروتينات النووية الرايبية الصغيرة والتي بدورها يرتبط وجودها مع المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري والذين يعانون من ظاهرة رينود وكما ترتبط بأمراض الكلى المعتدلة التأثير بالمرض (yang واخرون،2016) .



الشكل (2-3): ارتباط أضداد الضد سميث مع البروتينات النووية الرايبية الصغيرة (Brahms واخرون ،1997).

2-5-1-2-5- مستضدات السنترومير The Centromere Antigen CENP-B

يعرف السنترومير بأنه الجزء من الكروموسوم الذي تلتصق به ألياف المغزل عبر الحيز الحركي لتعمل بمثابة مقدمة لهجرة الكروموسوم في أثناء انقسام الخلية. وتشارك CENP-B في

تشكيل السنترومير، وتسلسل الأحماض الأمينية وتكون موجودة في مجموعة واسعة من الثدييات التي تظهر فيها امراض المناعة الذاتية (Schueler واخرون ، 2010).

2-5-2-1-6 -اضداد SSA(RO) وSSB(La)

وهي تلك الاضداد التي توجد في مصول 5% من مرضى داء الذئب الأحمراري. وانما هي أضداد لمكونات سايتوبلازمية تحتوي على اضداد لمكونات هيولية (Cytoplasmic Components) وتشمل نوعين من الاضداد SSA(RO) و SSB(La) ، وتتوافر هذه الاضداد عادة في السايتوبلازم (Eriksson و اخرون، 2011) ولا يظهر لهذه الاضداد وظيفة كيموحيوية او حيوية واضحة، ولكن وجد ان اضداد SSB(La) تتفاعل مع الجزيئات النووية التي تؤدي دورا في معالجة الحوامض النووية الريبية الناتجة عن فعالية انزيمRNA Polymerase (Wolin و Steitz،1984).وتوجد الاضداد SSA (RO) لدى 20-40% من مرضى داء الذئب الاحمراري والمستضد SSB(La) وبنسبة 10% لدى هؤلاء المرضى. وقد وجد ان المرضى الذين يتوافر في امصالهم كلا النوعين من المستضدات تكون الاعراض الكلوية عندهم للمرض اقل شدة مقارنة مع المرضى الذين يتواجد في أمصالهم المستضد SSA (RO) لوحده وذلك لإرتباط SSA (RO) مع مستضد الدنا ، وبينت الدراسات ان المستضد SSA (RO) يمكن ان يخترق المشيمة ويسبب تطوراً لاحقاً بالمرض لدى الوليد (Manolios و Schrieber،1997).

2-5-2-1-7 المستضد ku

وهو من الاجسام المضادة الموجهة ضد المستضدات النووية لدى المرضى المصابين بأمراض المناعة الذاتية مثل مرض داء الذئب الأحمراري وامراض الروماتيزم والتهاب العضلات وتصلب الجلد الجهازي (Mierau واخرون ،2011؛ Mahler وآخرون ،2014).ويتكون هذا المستضد البروتيني من وحدتين فرعيتين من الوحدات البروتينية (ku70 وku80) ويكون مرتبطاً بتعاقب نكليوتيدي محدد مع الحامض النووي الرايبي .(Belizna واخرون ،2010)، وان وجوده في المصل يعد دليلاً على الاصابة بأمراض المناعة الذاتية (Mahle واخرون ،2016).

8-1-2-5-2 -المستضد MI-2

وهو من الأجسام المضادة التي تستهدف المستضدات النووية تمثل واحدة من السمات المصلية المميزة للأمراض العضلية والمفصلية والالتهابات المجهولة السبب Idiopathic in flammatory myopathies. ويرتبط ظهور هذا الجسم المضاد وبصورة عالية بمرض Dermatomyositis وبتردد يقارب 31% عن بقية امراض الجهاز المناعي (Ghirardello واخرون ،2005).

2-5-2-2- بروتين-C التفاعلي C-Reactive Protein (CRP)

وهو من بروتينات الطور الحاد (Acute phase protein) الذي ينتمي الى مجموعة البروتينات المناعية والذي ينتج في خلايا الكبد (Fakanya و Tothill ، 2014). فضلاً عن العديد من الخلايا خارج الكبد التي تستطيع ان تنتجه مثل الخلايا اللمفاوية (Lymphocytes) والخلايا الشحمية (Adipocytes) والخلايا الاحادية (Monocytes) (Kim واخرون ،2015). ويستخدم بروتين C التفاعلي في الكشف عن الكثير من الامراض الالتهابية مثل التهاب الكبد الفيروسي والتهاب المفاصل والتهاب شغاف القلب البكتيري . ويعد وجود هذا البروتين بتراكيز عالية في امصال مرضى داء الذئب الأحمراري دليلا على الالتهابات الحادة وهذا ما اشار اليه كلُ من Ingle و Patel (2011).

2-5-2-2-3- نظام المتمم Complement System

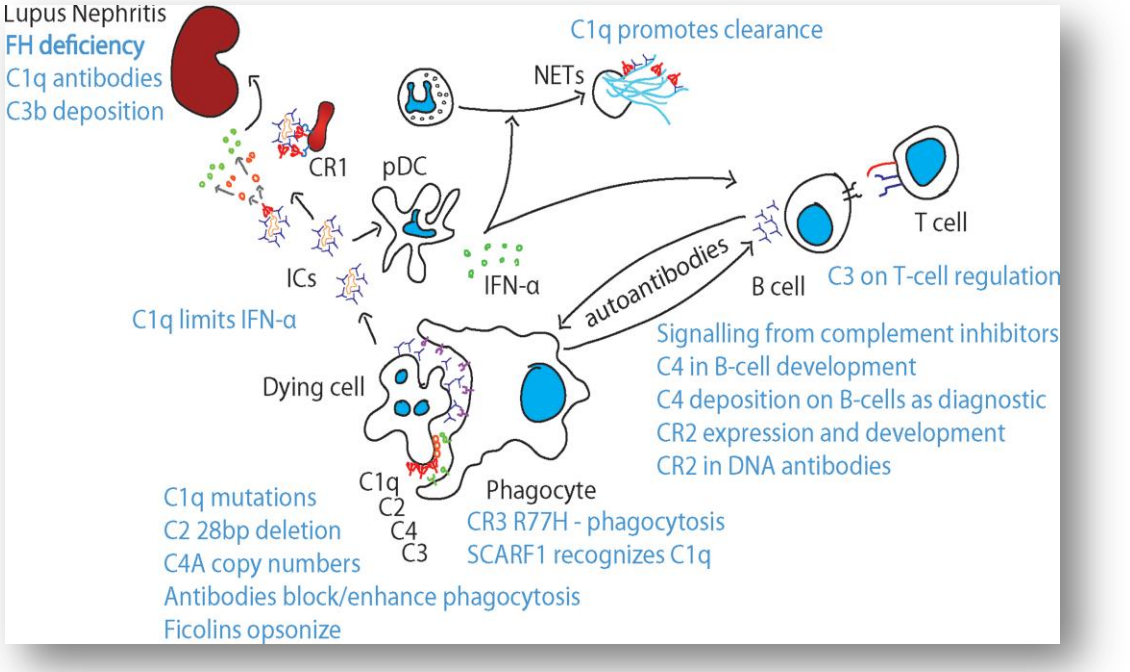
المتمم هو مجموعة من الأنزيمات المتأثرة بالحرارة العالية التي تتوافر في مصل الدم وسوائل الجسم المختلفة. وتعمل هذه المتممات على إتمام التفاعل الحاصل بين الضد والمستضد (Antigen antibody reaction) والتحلل (Lysis) والبلعمة (Phagocytosis) ويرمز لها بالرمز (C) (Fatima،2014).وقد أشار Gullstrand وأخرون(2012) الى أن الاجسام المضادة الموجودة في أمصال مرضى داء الذئب الأحمراري هي التي تحدث تفعيل نظام المتمم وكما مبين بالشكل (2-3)

لنظام المتمم دوران في تأثيرها على الخلايا وذلك عن طريق الاستساغة (Opsonization) وقتل المُمرضات (Killing pathogens) ويتكون نظام المتمم من اكثر من

30 نوعا من البروتينات المتوافرة في مصل الدم على شكل سلسلة من البروتينات السكرية (Glycoproteins) تؤدي دورا اساسيا في المناعة الخلطية. حيث تدخل في تفاعلات الجسم المضاد مع المستضد حين يتشكل المعقد المناعي فيحطم المعقد المناعي عن طريق الفعاليات البيولوجية التي تشمل ايضا الانجذاب الكيميائي (Chemotaxis) لجزيئات المتمم الاخرى وتنسيق بين الاستجابة المناعية الذاتية والمكتسبة وتنشيط الخلايا البائية وفرط الحساسية (Jean واخرون 2012). وعند تفعيل نظام المتمم يسلك ثلاثة مسارات كيموحيوية تشمل مسار المتمم التقليدي(Classical Complement Pathway) ومسار المتمم البديل (Alternative Complement Pathway) ومسار اللكتين المرتبط بالمانوز (Mannose-Binding Lectin Pathway) (Kolse واخرون ،2013). وقد أشار كلا من Kaufmann واخرون (2011) ان هذه المسارات الثلاثة تشترك بنقطة واحدة وهي تفعيل قطعة المتمم C_3 وكما اشارة Grosr واخرون (2008) .ان هذا النظام له دور في المناعة التكيفية وفي ازالة حطام الخلية المتضررة والدفاع ضد الممرضات لذا يعد هذا النظام من الانظمة الدفاعية ذات الاهمية العالية في اكمال وظائف الجهاز المناعي ومن العوامل الخلطية التي لها دور مهم في السيطرة التفاعلات الالتهابية وتنظيم الاستجابات المناعية(Wadr و Gao، 2009)، ومن اهم البروتينات التي يتكون منها هذا النظام هي بروتينات المتممين الثالث والرابع (Complement C_3 and C_4) إذ يعدان من اكثر مكونات المتمم اهمية، اذ يشكل المتمم الثالث (C_3) 70% من بروتينات النظام المتمم وهو اكثرها تركيزاً في مصل الدم. ويقل تركيزه في حالات الالتهابات الحادة والاصابات الجرثومية المتكررة (Acosta واخرون 2004). أما المتمم الرابع (C_4) بيتا غلوبيولين الذي يكون وزنه الجزيئي اكبر من الوزن الجزيئي لـC_3 فينشطر بوساطة انزيم الاستريز (C_1S) الى جزئيين هما C_4a والتي هي عبارة عن سلسلة ببتيدية صغيرة يبرز دورها في الانجذاب الكيميائي لجزيئات بروتينات المتمم ، وجزيئة C4b التي تمتلك موضع الارتباط غير المستقر التي عن طريقها ترتبط بالغشاء الخلوي (William واخرون ،2012).

ان بروتين المتمم C_4 جزء من المسار الايضي الذي يعمل على تنشيط نظام المتمم. ويترافق مع نقص البروتين C_4 العديد من الاضطربات المناعية الذاتية وهذا ما بينه Islam

واخرون (2006). ومن أقوى عوامل الخطورة لداء الذئب الاحمراري هو العوز الحاصل في البروتين المتمم C_1، وتشير الدراسات الاخيرة أشارت الى أمكانية حدوث الطفرات في جينات مستقبلات المتممات البروتينية و في جينات المتممات المثبطة (Complement Inhibitors) وكما موضح في الشكل (2-4).



الشكل (2- 4) : دور نظام المتمم بالإصابة بداء الذئب الأحمراري والتهاب الكلية الذئبية (Leffler واخرون ، 2014).

2-5-3 مؤشرات الدم التشخيصية

تتباين مؤشرات الدم المختلفة لدى مرض داء الذئب الأحمراري وقد تكون مضطربة منذ المراحل الاولية للإصابة، وقد تكون خاصة ومميزة للمرض او تكون متداخلة مع امراض اخرى (Kapouzas، 2013) كمرض فقر الدم (Anemia)الذي يصيب 50% من مرضى داء الذئب الأحمراري ونقص الحديد (Iron Deficiency) وفقر دم التحلل المناعي للذات (Autoimmune

(Hemolytic Anemias (Giannouli واخرون، 2006). ويرافق الاصابة بداء الذئب الأحمراري حدوث نقص في أعداد الصفائح الدموية (Thrombocytopenia) بمعدل 30% (Fernández واخرون ،2007)، كما ويعاني المرضى من نقص في أعداد كريات الدم البيضاء (Leukopenia) الذي يحدث في 50% من الحالات وينقص العدد بنسبة اكبر في حالات الاصابة الشديدة (Karpouzas،2013).

ومن مؤشرات الدم التشخيصية الاخرى هو معدل ترسيب خلايا الحمراء (ESR) الذي يستخدم لتقييم الاستجابات الالتهابية للمرض، ويعد مؤشراً نوعياً غير مباشر للمراحل الحادة للمرض .ويتأثر معدل ترسيب الكريات الحمراء بتركيز البروتين في المصل وعدد خلايا الدم الحمراء(Erythrocytes)، فضلا عن مكونات الدم الأخرى من الكلبيولينيات المناعية. تتأثر مستويات ESR بكثير من العوامل مثل نقص الالبومين في الدم (Hypoalbuminemia) و ارتفاع تركيز الكولسترول (Hypercholesterolemia) وفرط انتاج غاما غلوبيولين مما يزيد من معدل ارتفاع ESR. ويكون هذا الارتفاع شائعاً لدى مرضى داء الذئب ذي التحمل الذاتي (Self-Tolerance) والمتمثل بتفاقم الأعراض التي تؤثر على وظائف أجهزة الجسم المتعددة (الجلد والكلى والمفاصل والقلب والأوعية الدموية والجهاز العصبي) (Contran واخرون 1989).

6-2 – فعالية المرض SLE Disease Activity (SLEDAI)

يستخدم اختبار فعالية المرض لقياس شدة المرض وفعاليته وهو عبارة عن مجموعة من المؤشرات العالمية التي تستخدم لتقييم نشاط المرض في المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري وتشمل بنود محددة من أجل تقييم مظاهر المرض بما فيها المظاهر المفصلية النشطة إذ يتضمن هذا المرض (24) نقطة بعد التأكد من صحتها وتستخدم على نطاق واسع في التجارب السريرية وفي الممارسات السريرية الروتينية في المرضى الذين يعانون من التهاب المفاصل الروماتويدي (RA) ويعد وسيلة سهلة لأداء ونشاط المرض الذي يرتبط الى حد كبير بتشخيص الطبيب للمرض وحالة المريض على وفق التقييم العالمي ويمكن تصنيف نشاط المرض الى أدنى مستوى(NO Flare) أو معتدل (Mild Flare) او عالي الفعالية(Severe Flare) ويمكن أن يحدد من خلاله

شدة المرض(Fransen وأخرون ،2010). كما أستخدم هذا المقياس في رصد المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يشترك في بعض الخصائص السريرية مع التهاب المفاصل الروماتويدي (Salaffi و أخرون ،2014).

يعد SLEDAI محور الأبحاث السريرية المختصة بقياس فعالية المرض يستخدم لتقييم النتائج السريرية، اذ يتم من خلاله مقارنة الاختلافات ذات المغزى الأساس لتشخيص المرض بين مجاميع مرضى داء الذئب الأحمراري، يتم تقييم نشاط وفعالية المرض من خلال العديد من الفقرات يمكن الاعتماد عليها والتحقق من صحتها كتقييم موحد لنشاط المرض تستخدم كوسيلة لمتابعة تحسن المرض أو تفاقم حالته. وضعت هذه المؤشرات وأُعتمد عليها وتحقق من صحتها منذ أوائل 1980، (Danowski وأخرون، 2006).

2-7- الاستعداد الوراثي Genetic Predisposition

لقد اثبتت الدراسات أنه من الممكن وراثيا التنبؤ بالأفراد الذين لديهم الاستعداد الوراثي للإصابة بالمرض، ويتم ذلك من خلال وجود واحد أو أكثر من الجينات ذات الاستعداد والقابلية على أحداث الاصابة بالمرض ، لذا وضع برنامج علاجي من أجل مراقبته لمنع أو تأخير تطور المرض وأن فهم الجانب الوراثي للمرض يعطي تصوراً واضحاً يمكن من خلاله التوصل الى الأسباب الرئيسة المسببة للمرض. وقد بينت الدراسات أن المظاهر السريرية والاستجابة للعلاج وتشخيص داء الذئب الأحمراري لوحدها قد تكون غير كافية وبالتالي قد تساعد الدراسات الجينية في تحديد المسار السريري لتشخيص المرض (Lee وBae ،2015). كما بينت الدراسات الاخيرة انه من الممكن تحديد العلاقة بين زيادة نسبة الإصابة بداء الذئب الأحمراري في داخل الأسر وبين التوائم ومخاطر تكراره بين الاشقاء والعوامل الوراثية المؤدية الى حدوث الاصابة (Silva واخرون،2014). وقد أشارت دراسات تحليل المجين البشري ان هناك ما يقارب 20 جين من الجينات التي ترتبط ارتباطاً مباشراً مع زيادة تطور وخطورة داء الذئب الأحمراري(Krishnamurthy وMahadevan،2011). أذ أكتشف عدداً من الجينات التي لها تأثيرٌ على مسارات الاستجابة للمرض، وداء الذئب الأحمراري

هو أنموذج من الأمراض التي تشترك فيها جينات عدة (Lee واخرون ،2014). وقد حددت المواضع الجينية التي يكون لها تأثير على مسارات الاستجابات المناعية الفطرية والتكيفية للمرض، فضلا عن آليات إزالة المعقدات المناعية (Mohan وPutterman ، 2015 ؛ Yu واخرون ،2014). كما وجد ان منطقة الجين المشفر لمستضد كريات الدم البيضاء (HLA) الموجود على الذراع القصير للكروموسوم السادس الذي يعد من أقوى الأليلات التي لها صلة قوية للإصابة بالمرض، وقد وجدان التباين الوراثي في أليل HLA-DR2 يترافق مع الاصابة المبكرة لمرض الذئب الأحمراري المصاحب مع التهاب الكلية، في حين ان التباين الوراثي في اليل HLA-DR3 يرتبط مع الاصابة المبكرة للمرض وكذلك التهاب الجلد (Lee و Bae ،2010).

2-8- الحركيات الخلوية Cytokines

الحركيات الخلوية هي عبارة عن بروتينات ذائبة ذات اوزان جزيئية واطئة لها وظيفة ناقلة تشترك في جميع جوانب الاستجابة المناعية الفطرية (Innate Immune Response) والاستجابة المناعية التكيفية (Adaptive Immune Response) في مراحل النمو الخلوي والتمايز والاصلاح. وتظهر كمستضدات تشارك في مجموعة واسعة من الانشطة البيولوجية مثل انشطة الانجذاب الكيميائي (Chemotaxis) والانشطة الخاصة بالتغيرات الفسلجية وتنشيط خلايا محددة (Metha ،2006). وهناك عدد من الحركيات الخلوية التي لها دور كبير في نشوء الخلايا اللمفاوية وتنظيم عملها الخلايا اللمفاوية وتحديد نوع الاستجابة المناعية لدى ظهور مؤثرات خارجية معينة (Doanواخرون ،2008). وتنتج الحركيات الخلوية من الخلايا المناعية التي تسهل التواصل بين الخلايا ، ومن الخلايا المحفزة للاستجابة لمستضد محدد، وهي تتوسط الألتهابات التي تحدث في مواقع مختلفة والالتهابات الجهازية وتكون ذاتية الافراز من الخلايا المناعية (Autocrine) أو تفرز من خلايا مناعية لتؤثر على الخلايا المجاورة (Endocrine) أو تفرز لتؤثر على خلايا الجسم الاخرى (Paracrine) (Sanchez-Munoz واخرون ،2008) فضلاً عن تأثر الحركيات الخلوية بالتباينات الوراثية (Genetic polymorphisms) في جيناتها وجينات مستقبلاتها (Mehraو Kaur ، 2012)، وتعمل الحركيات الخلوية وسائل دفاعية لمختلف الخلايا المناعية في

أثناء التمايز (Differentiation) والنضج (Maturation) والتفعيل (Activation) (Yapو Lai ، 2013). ونتيجة لهذا لفعالية مرض الذئب الأحمراري تحدث تقلبات في الاستجابة المناعية، تليها التفاعلات الالتهابية لمواقع مختلفة من اجهزة الجسم وتلف الأنسجة، ولذا فإن فهم الدور الأساس للحركيات الخلوية في SLE لا يعزز فقط مفهوم المرض، ولكن أيضا يطبق مفاهيم جديدة لتوضيح المؤشرات الحيوية والعوامل العلاجية (Yang واخرون،2014). وقد أثبتت الدراسات مؤخرا أن هناك انواعاً مختلفة من جينات البين الابيضاضي لها علاقة في الاستجابة بمرض داء الذئب الأحمراري، مثل IL-2 ، IL-4 ، IL-6،IL-10 و IL-12 حيث تكون مرتبطة ارتباطا وثيقا في التسبب بداء الذئب الأحمراري (Robinson وWerth ، 2015) كما موضح في الجدول(2–2).

2–9– التباين الوراثي لجينات الحركيات الخلوية وعلاقتها بداء الذئب الأحمراري Cytokine Gene Polymorphisms

يعرف التباين الوراثي (Genetic polymorphism) بأنه التغاير الذي يحدث في التعاقب النيوكلوتيدي لجزيئات الحوامض النووية DNA للأشخاص ضمن مجتمع معين أو هو الاختلاف الجيني الذي ينتج أشكالاً أو أنواعاً مختلفة من الأفراد بين أعضاء المجتمع الواحد (Dai واخرون ،2008). ويعزز التباين الوراثي التنوع والاختلافات ضمن مجموعة من السكان الذي يتوارث التنوع أجيالا عديدة. ومن الأمثلة الشائعة على هذا التباين هو وجود الأشكال المختلفة للأليلات في فصائل الدم البشرية . (Riha واخرون ،2004). ولتباين النوكليوتيدات المفردة (SNP) لها أهمية كبيرة في دراسة بنية الجينوم البشري ، وهي واحدة من أكثر التطبيقات الشائعة لتحديد امكانية الاصابة بمختلف الأمراض والتي تهدف ايضا الى ايجاد العلاقة بين التباين النيوكليوتيدي الْاحادي (SNP) والاصابة بالمرض (Ning واخرون ، 2014).

إن التباين الوراثي للحركيات الخلوية يكشف الاختلافات بين الأفراد ليس من ناحية التعبير الجيني فحسب وإنما من حيث الاستجابة للمرض وشدة المرض كما يعد دليلاً مبكراً للإصابة. ويبين الجدول (2–2) مواقع التباين الوراثي في جينات الحركيات الخلوية وجينات مستقبلاتها التي تعد

عامل خطورة للإصابة بداء الذئب الأحمراري. وأن جميع ما توصلت اليه الدراسات الحديثة بينت ظهور عدد من النيوكليوتيدات المتباينة وراثيا في مختلف الحركيات الخلوية وفي جينات مستقبلات الحركيات الخلوية التي تعد من المؤشرات المهمة ليس من حيث فهم أفضل مسببات المرض فقط ولكن أيضا من حيث المؤشرات الحيوية المحتملة للاستجابة للمرض وشدته (Fang و اخرون،2010 ؛ Fareed وAfzal،2013). يعمل التباين الوراثي على حدوث اختلافات في تسلسل القواعد النيتروجينية للحامض النووي والتي تختلف من حيث نوع الطفرات الجينية التي تحدث في الأشخاص، ويكون ترددها بمعدل 1% بسبب طفرة استبدال قاعدة نايتروجينية واحدة ،وقد يتضمن التباين الوراثي طفرة غرس أو حذف لتعاقبات نكليوتيدية للدنا التابع الصغير (Minisatellite) والدنا التابع الدقيق (Microsatellite) (Ulger واخرون 2014). وتؤثر هذه التباينات الوراثية على تنظيم التعبير الجيني أو على وظيفة البروتين المشفرة وتساعد في تسهيل أمكانية الكشف عن الفروق الجينية بين الأفراد وبالتالي التعرف على امكانية الإصابة بالمرض وشدته (Conde واخرون 2013) وقد بينت العديد من الدراسات العلاقة بين التباين الوراثي لجين المحرك الخلوي وتأثيره على التعبير الجيني للمحركات الخلوية والاستجابة وتقدم وشدة المرض (Hollegaardو Bidwell ، 2006).

يحدث التباين الوراثي في جينات الحركيات الخلوية في مناطق تنظيم التعبير الجيني والذي ينجم عنها تغيير في تركيب او بنية عامل الاستنساخ (Transcription Factor) وتغير الفته للأرتباط في منطقة الحفاز، او يحدث التباين داخل مواقع الانترونات وتغير هيئة الالتفاف داخل المصفوفة النووية (Nuclear matrix) (Longhi واخرون، 2013).

جدول (2-2) : الحركيات الخلوية المتباينة وراثيا المصاحبة لمرض داء الذئب الاحمراري

ت	الجين Gene	موقع التباين الوراثي Site of Polymorphism	نوع التباين الوراثي Type of Polymorphism
1	*IL-10*	Promoter-1082 *IL10.G* *IL10.R*	Single-baseG/A Microsatellite Microsatellite
2	*IL-4*	Promoter-590	Single-base C/T
3	*IL-6*	3' AT-rich minisatellite	AT-rich repeat
4	*IL-1a*	Promoter-889	Singl ebase C/C
5	*IL-1Ra*	Intron 2 *IL1RN*1* Intron 2 *IL1RN*2*	86-bpVNTR 86-bpVNTR
6	*TNF- a*	TNFa Promoter-238 Promoter-308	Microsatellite Single-base A/G Single-base A/G
7	*IFNR1*	Val14 Met 88	Single-base A/G

2-10-جين البين الابيضاضي- 10 (Interleukin-10 Gene) (*IL10*)

وهو من الحركيات الخلوية المضادة للالتهابات وقد أكتشف جين البين الابيضاضي- 10 في العام 1980 بوصفه واحداً من أهم العوامل الخلوية ومن أهم العوامل المناعية المثبطة (Inhibitory factors) ويفرز IL-10 أثناء عمليات التنظيم المناعي من قبل جهاز المناعة الذاتية (Innate immune) و ينتج بوساطة وحيدات الخلايا (Monocytes)، والخلايا البلعمية (Macrophages)، والخلايا الجذعية (Dendritic cells)، والخلايا البدينة (Mast cells)، و الخلايا القاتلة الطبيعية (Natural Killer Cells)، والحمضات (Eosinophils) ، والعدلات (Neutrophils) و خلايا المناعة التكيفية (Adaptive immune) مثل (الخلايا البائية والتائية و Th2\Th1 و Treg و Tr1 و γδT و $CD8^+$) الخلايا المساعدة والخلايا التائية نوع T cells والخلايا البائية (B cell derived tumor cell lines) والخلايا القرنية (keratinocytes).

لقد وجد أن البين الالبيضاضي- 10 وظائف مختلفة منها دعم التمايز للخلايا البائية وتحفيز الاستجابة المناعية المضادة للألتهابات والمساعدة في افراز الكلوبيولينات المناعية (Saraiva و Garra ،2010؛ Tedgui و Mallat 2006) وكما يعمل على تثبيط نمو الخلايا التائية المساعدة (Th1 cells) والخلايا القاتلة الطبيعية (NK) والبلعم الكبير خلال الاصابات المرضية وازالتها لتلافي التسبب في تلف الانسجة (Cope واخرون ،2011) . كما يعمل على تثبيط معقدات التوافق النسيجي الرئيسة (MHC) ويحد من انتاج الحركيات الخلوية من نوع IL- 1α1وβ و IL-6 و IL-12 و,IL-18 وTNF-α) (Das واخرون، 2012)، وفي الظروف الاعتيادية يعمل البين الابيضاضي 10على انتاج اضداد الدنا الذاتية وتحفيز بقاء الخلايا البائية وتمايزها وتحفيز المناعة والاستجابة الالتهابية (Moor واخرون، 1993)، فضلا عن تنشيط مضادات الالتهابات (Llorente واخرون،1997) .

لقد وجد ان هناك علاقة بين أضطراب انتاج البين الابيضاضي – 10 وتركيزه في الدم والاصابة بمرض داء الذئب الأحمراري ، فقد اشارت الدراسات أن انتاجه يزداد تلقائيا في الاشخاص المصابين بالمرض، وان مستوياته العالية في الدم تكون مرتبطة بشدة مع تطور المرض (Mok واخرون ،1998).

2-11- التباين الوراثي في جين أنترلوكين 10

يقع جين البين الابيضاضي – 10على الذراع الطويل للكروموسوم 1، ويحتوي الجين على خمسة أكسونات. وقد اشارت الدراسات الحديثة الى ان التباينات الوراثية احادية النكلوتيدة (SNPs) التي تحدث في مجرى جين البين الابيضاضي – 10 تكون عادة مصاحبة للإصابة بالعديد من امراض المناعة الذاتية وعلى وجه الخصوص مرض داء الذئب الأحمراري (Abdallh واخرون ، 2016). وقد وجد ان معظم التباينات الوراثية في جين البين الابيضاضي -10 تقع في منطقة الحفاز الذي يتكون من تكرارات لتعاقبات الدنا التابع من نوع CA، وهناك تباينات في مواقع محددة يمكن ان تحدث قبل مجرى الجين ضمن منطقة الحفاز في المواقع -592 و-819 و1082 زوجاً

قاعدياً في المنطقة 1q31.32 يصاحبها زيادة في انتاج البين الابيضاضي −10 وبالتالي ارتفاع تركيزه في الدم (D'Cruz وأخرون ، 2007) فقد اشارت الدراسات الحديثة الى ان التباينات الوراثية في هذه المواقع يكون مصاحباً للإصابة بمرض داء الذئب الأحمراري (Iyer و Cheng ،2012). فقد وجد Abdallah واخرون، (2016) ان التباين الوراثي في الموقع 592 زوج قاعدة يمثل عامل خطورة رئيساً للإصابة بالمرض. ويبين الجدول (2−3) مواقع التباين الوراثي ونوع الطفرة الوراثية في حفاز جين البين الابيضاضي −10 المصاحبة للإصابة بالمرض(Gambhir واخرون، 2010 ؛ Sofian واخرون 2013). وتتناسب أمكانية حدوث الاصابة بالمرض مع طبيعة الاليل، ففي الأليلات المتجانسة التباين (Homozygous) تكون امكانية الاصابة اكبر مما لو كانت الأليلات غير متجانسة التباين (Heterozygous) (Nath وأخرون، 2015 ؛ Liu وأخرون،2013).

جدول (2−3): مواقع وانواع التباينات الوراثية في حفاز جين البين الابيضاضي −10 المصاحبة للإصابة بمرض داء الذئب الاحمراري (Gambhir واخرون ، 2010 ؛ Sofian واخرون 2013)

ت	منطقة التباين	موقع التباين	نوع التباين	نوع الطفرة
1	الحفاز	- 592	C>A	أستبدال
2	الحفاز	- 819	C >T	أستبدال
3	الحفاز	- 1082	G>A	أستبدال

2− 12 – التباين الوراثي في الحركيات الخلوية وعلاقته بأمراض المناعة الذاتية

اجتذبت جينات الحركيات الخلوية (Cytokines Genes) وجينات مستقبلات الحركيات الخلوية (Cytokine Receptor Genes) اهتماما كبيرا كمواقع جينية مصاحبة للأصابة بأمراض المناعة الذاتية بشكل عام وداء الذئب الأحمراري بشكل خاص، اذ ان تثبيط عمل الجينات المشفرة لهذه الحركيات الخلوية يؤدي الى زيادة فرصة حدوث الاصابة بالمرض

(Vandenbroeck،2012)، وقد اظهرت نتائج اول دراسة على مستوى الجينوم البشري ان التباينات الوراثية في جينات الحركيات الخلوية وجينات مستقبلاتها تكون مصاحبة عادة للإصابة بأمراض المناعة الذاتية، ومنها داء الذئب الأحمراري (Stone واخرون،2012). إذ تؤدي الطفرات الوراثية التي تحدث في منطقة الأكسون في الجينات التي تشفر للحركيات الخلوية ومستقبلاتها الى تغير تسلسل الحوامض الامينية في تركيب هذه المركبات البروتينية ، وقد تؤثر التباينات الوراثية على تعبير هذه الجينات المستهدفة على مختلف المستويات، والتي تشمل النسخ الجيني والربط والاستقرار وترجمة الحامض النووي الرايبوزي المراسل mRNA (Johnson واخرون 2005) وتشير الدراسات الى أن التباين الوراثي أحادي النيوكليوتيدة (SNP) يؤدي إلى تغيير بنية البروتين(Protein Structure) ووظيفته الحياتية (Biological Function).كما أن التباينات الوراثية في منطقة الحفاز لجينات الحركيات الخلوية قد تسبب زيادة أو انخفاضاً في التعبير الجيني وبالتالي تؤثر على انتاج الحركيات الخلوية، فإن حدوث التباين الوراثي للجينات الموروثة قد يزيد من خطر الإصابة بالمرض يكون الشخص أكثر عرضة أو مقاومة لبعض الأمراض (Nadeem واخرون، 2015)، إن التحسس للإصابة ببعض أمراض المناعة الذاتية يرتبط بشكل مباشر مع التعبير الجيني للحركيات الخلوية بسبب هذه التباينات الوراثية وبذلك يمكن تمييز الأشخاص المصابين بأحد أمراض المناعة الذاتية عن الاشخاص الأصحاء (Crispin وTsokos،2010). كما أثبت الدراسات أن للحركيات الخلوية ومستقبلاتها دوراً كبيراً في إمراضية داء الذئب الأحمراري، وقد تم تحديد مواقع الجينات الخاصة المسببة للمرض. لذا فإنَ فهم الخلفية الوراثية لداء الذئب الأحمراري من خلال التباين الوراثي لجين الحركيات الخلوية قد يؤدي إلى استراتيجيات جديدة في مجال التنبؤ المستقبلي والوقاية والعلاج من هذا المرض (Robinson و Werth ،2015).

3- المواد وطرائق العمل Materials &Methods

3-1 المواد Materials

3-1-1 الاجهزة والادوات المستعملة في الدراسة

أستعملت في هذه الدراسة كل من الاجهزة والادوات المبينة في الجدول (3-1).

جدول (3–1): الاجهزة والادوات المستعملة في الدراسة

ت	الاجهزة المختبرية		الشركة	المنشأ
1	جهاز الطرد المركزي	Centrifuge	Hettich	Holland
2	جهاز الطرد المركزي الدقيق	Micro centrifuge	Thermo Scientific	USA
3	جهاز الطرد المركزي الفوري	spin centrifuge	Benchmark	USA
4	أجهزة نظام الاليزا	ELISA system	Human	Germany
5	حاضنة	Incubator	American	USA
6	مازج لفاف	Roll Mixer	KARL KOLB	Holland
7	جهاز تقطير	Distillater	American	USA
8	مصدر الاشعة فوق البنفسجية	UV- transilluminator	Major Science	Taiwan
9	مازج	Vortex	Stuart Scientific	UK
10	هزاز	Shaker	Rotal	England
11	عدسة قراءة تكبير	Lens	PEAK	Japan
12	مجمدة	Deepfreeze (-20C)	foriolabo	France
13	ماصات دقيقة	Micropipettes	Slamed	France
14	ثلاجة	Refrigerator	Beko	Turkey
15	فرن الموجات الدقيقة	Microwave	Local market	China
16	ميزان حساس	Sensitive balance	Local market	China
17	حمام مائي	Water Bath	Local market	China

18	أنابيب أختبار بلاستيكية	Plastic test tubes(10 ml)	AFMA	Jordan
19	أنابيب اختبار جل بلاستيكية	GEL+CLOT ACTIVATOR	AFMA	Jordan
20	أنابيب أختبار مانعة للتخثر	Blood collection (Tube EDTA K3)	AFCO	Jordan
21	أنابيب أبندورف	Eppendorf tubes	Promega	U.S.A
22	مقامع ابندورف	Eppendorf Tips	CE	China
23	قوارير مخروطية	Conical flasks	Aldrich	Germany
26	اسطوانة مدرجة	Graduated cylinder	HBG	Germany
27	ماصة	Pipette tips	Gilson	France
28	نظام تصوير الهلام	Gel imaging system	Major Science	Korea
29	وحدة الترحيل الكهربائي	Electrophoresis unit	Thermo Scientific	U.S.A
30	كاميرا الكترونية	Digital Camera	Sony	Japan
31	كابينة مختبرية	Hood	Telestar	Spain
32	المؤصدة	Autoclave	Portable	England
33	مؤقت الكتروني	Timer	Local market	China
34	جهاز المطياف الضوئي النانوي	Nano-drop Spectrophotometer	Thermo	U.S.A
35	جهاز الدوار الحراري	Thermal Cycler (PCR)	BioRad	U.S.A
36	جهاز المطياف الضوئي	Spectrophotometer	Cintra 5-GBC	France
37	حجرة ترطيب	Moist chamber	Local market	China
38	جهاز قياس ESR	MICRO sed-System	Human	Germany
39	جهاز المحلل الذاتي مكونات الدم	Autoanalyzer for hematology cell	Ruby	U.S.A
40	انبوبة سترات الصديوم لأختبار ESR	Na-Citrate 3.8% Blood Collection Vacuum Tubes	Human	Germany

3-1-2 المواد الكيميائية والبيولوجية (Chemicals and Biological Materials)

أستعملت في هذه الدراسة المواد الكيميائية والبيولوجية المبينة في الجدول (3-2).

جدول (3 – 2): المواد الكيميائية والبيولوجية المستعملة في الدراسة

ت	المواد الكيميائية و الكيموحيوية	Biochemical and Chemicals	الشركة	المنشأ
1	المؤشر الدنا الحجمي (1000،100زوج قاعدي)	DNA Ladder Marker (100bp)	Promega	USA
2	الماء الخالي من الانزيمات الهاظمة للدنا	Free Nuclease Water		
3	صبغة الترحيل	Loading Dye		
5	دارئ الترحيل	TBE Buffer		
6	بروميد الاثيديوم	Ethidium Bromide		
7	أكاروز	Agarose		
8	حامض البوريك	Boric acid	Riedel-Dettaen	Germany
9	صبغة البروموفينول الزرقاء	Bromophenol blue		
10	اثلين ثنائي أمين رباعي حامض الخليك	Ethylenediaminetetra-acetic acid	Switzerland	Fluka
11	ترس – هيدروكلوريد	Tris-hydrochlorid		
12	كبريتات الصوديوم	Sodium dodecyl sulphate(SDS)		

3-1-3-العدد التشخيصية (Laboratory Kits)

أستعملت في هذه الدراسة كل من العدد التشخيصية المبينة في الجدول (3-3) والتي أستعملت في التجارب المختبرية المختلفة مثل تجارب استخلاص الدنا وتجارب تقدير بروتين سي الفعال وتجارب الكشف عن اضداد الدنا مزدوج الخيط وتجارب الكشف عن الاضداد الذاتية وتجارب الكشف عن تضخيم الدنا .

جدول (3– 3): العدد التشخيصية المستخدمة في الدراسة

ت	العدة المختبرية	Kit	الشركة	المنشأ
1	عدة استخلاص الدنا	DNA Extraction Kit	Promega	USA
2	خليط تفاعل بلمرة الدنا	GoTaq Green Master Mix		
3	عدة اختبار بروتين سي الفعال	C-Reactive Protein (CRP) ELISA Kit	Demeditec	Germany
4	عدة الكشف عن اضداد شريط الدنا المزدوج	ds-DNAELISA Kit		
5	عدة الكشف عن الاضداد الذاتية	IMTC ANA LEA MAXX	Human	
6	عدة الانتشار المناعي للكشف عن المتمم الثالث	(C_3) Kit e Radial Immunodiffusion plate	LTA	Italy
7	عدة الانتشار المناعي للكشف عن المتمم الرابع	(C_4) Kit Radial Immunodiffusion plate		

2-3 طرائق العمل (Methods)

1-2-3 عينات الدراسة (Study Subjects)

اجريت الدراسة الحالية على مجموعة من المرضى العراقيين المراجعين للعيادات الاستشارية لأمراض المفاصل في مستشفى بغداد التعليمي ومستشفى غازي الحريري والمرضى المراجعين لمركز زرع وامراض الكلى في مستشفى الجراحات في محافظة بغداد للفترة ما بين تشرين اول/ 2015 وشباط/ 2016 .وقد شخصت جميع الحالات المرضية البالغ عددها 64 حالة مرضية من قبل أطباء اختصاص، حيث شخصت 32 حالة مرضية من قبل الطبيب الاختصاص فائق إيشو على انها حالة إصابة بداء الذئب الاحمراري الذي يصيب المفاصل، كما شخصت 32 حالة مرضية من قبل الطبيب الاختصاص علاء الشيخ علي على أنها حالة أصابة بالمرض نفسه الذي يصيب الكلى. وقد اجري التشخيص السريري في جميع الحالات وفقا للمعايير المعتمدة من قبل الكلية الامريكية لأمراض الروماتيزم (1997) من حيث توافر أربعة مؤشرات للمرض على الاقل من أصل أحدى عشر مؤشراً وهي كل من الطفح الوجني (Malar rash) والطفح القرصي (Discoid rash) والالتهابات المصلية (Serositis) والحساسية للضوء (Photosensitivity)، والقرحة الفموية (Oral Ulcers)، والاعتلالات الدموية

(Haematologic Disorder)، والاضطرابات الكلوية (Renal Involvement)، والاجسام المضادة ضد النووية (Antinuclear Antibodies)، والظواهر المناعية (Immunological Phenomena) كالدنا مزدوج الخيط (ds-DNA)، والاجسام المضادة لضد سميث (Anti-smith) (Yu واخرون ، 2014). وفق أستمارة المعايير المبينة في الجدول الملحق (1).

سجلت جميع المعلومات الخاصة بالمرضى المراجعين والخاضعين للعلاجات الدورية للمرضى على وفق استمارة الاستبانة المبينة في الجدول الملحق (2) والتي تضمنت مؤشرات صحية واجتماعية مثل الاسم، الجنس، العمر، السكن، التحصيل الدراسي، المهنة، الحالة الاجتماعية، عدد الاولاد، تاريخ الاسرة الوراثي، الطول، الوزن وفترة الاصابة بالمرض.

كما تضمنت الدراسة مجموعة من الاشخاص الاصحاء(عينات سيطرة) لا يعانون من اي حالة مرضية وليس لديهم أي سيرة مرضية للإصابة بأي مرض من امراض المناعة الذاتية، وقد شملت هذه المجموعة 32 حالة.

3-2-2 قياس فعالية المرض (Disease Activity)

تم قياس فعالية المرض على وفق دليل فعالية المرض Systemic Lupus Disease Erythematosus Activity Index (SLEDAI) المعتمد من قبل الكلية الأمريكية لأمراض الروماتيزم، إذ تم تقييم النتائج السريرية لكل مريض على وفق استمارة مؤشرات نشاط المرض وعلى ضوء الاختبارات السريرية المبينة في الجدول الملحق (3) الذي يتضمن اربعة وعشرين مؤشراً كل مؤشر يحدد فعالية المرض وبثلاثة مستويات على وفق الجدول (3-4).

جدول (3-4): دليل فعالية مرض داء الذئب الأحمراري

فعالية المرض	Disease activity	الدرجة (Score)
غير فعال	No flare	أقل من 3
معتدل أو خفيف الشدة	Mild or moderate flare	3-12
عالي الشدة	Severe flare	أعلى من 12

وعلى هذا الاساس حسبت فعالية المرض بين مجاميع المرضى وقورنت مع بقيت نتائج التحليلات السريرية وفقاً لما هو موصوف من قبل Peter واخرون (2005).

3-2-3 حساب دليل الكتلة الجسمية (Body mass index)

تم حساب دليل الكتلة الجسمية Body mass index (BMI) لكل عينة من عينات الدراسة وفق المعادلة الاتية :

$$\text{دليل كتلة الجسم} = \frac{\text{الوزن (كغم)}}{\text{الطول (سم)}^2}$$

حيث تم تصنيف عينات الدراسة وفقا لهذا المؤشر الى أربعة أصناف(Denise،2014) وكما مبين في الجدول الأتي :

Classification	التصنيف	دليل كتلة الجسم
underweight	نقص وزن	<18.5
Normal	طبيعي	24.9 – 18.5
Overweight	وزن زائد	29.9 – 25.0
Obesity I	بدانة من النوع الاول	34.9 – 30
Obesity II	بدانة من النوع الثاني	39.9 – 35.0
Obesity III	بدانة من النوع الثالث	>40

3-2-2 عينات الدم

جمعت عينات الدم من المرضى والاصحاء, وذلك بسحب 8 مل من الدم الوريدي، ووزعت في ثلاثة أنابيب لأجراء تحاليل الدم والتحاليل المناعية والتحليلات الوراثية وكما يأتي :

1- أُخذ 3 مل من عينة الدم ووضعت في انابيب حاوية على مانع للتخثر وقد استخدمت هذه العينة لأجراء تحاليل الدم التي شملت تقدير الصفائح الدموية (PLT) والهيموغلوبين (Hb)

وكريات الدم الحمراء (RBCs) وكريات الدم البيضاء(WBCs) ومعدل ترسيب كريات الدم الحمراء(ESR).

2- أخذ 3 مل أخرى من عينة الدم ووضعت في انابيب الهلام البلاستيكية وتركت بدرجة حرارة الغرفة (25 درجة مئوية) لمدة 5-10 دقائق ولحين تكون الخثرة الدموية، ثم فصلت بالنبذ المركزي (Centrifuge) بسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 5 دقائق، ثم سحب مصل الدم وتم تقسيم عينات المصل إلى ثلاثة أجزاء في أنابيب أبندورف (Eppendorf Tubes) وبواقع 500 مايكروليتر لكل انبوبة اختبار وحفظت بالتجميد بدرجة حرارة 38 م تحت الصفر لحين أجراء الاختبارات المصلية.

3- أخذ 2 مل من عينة الدم ووضعت في انابيب حاوية على مادة مانعة للتخثر وحفظت في الثلاجة بدرجة 4 م لحين استخلاص الدنا للتحليلات الوراثية.

3-3 الأختبارات المناعية (Immunological tests)

اجريت الاختبارات المناعية للكشف المبكر عن الاصابة بمرض داء الذئب الأحمراري فضلاً عن تحديد شدة ودرجة الاصابة لدى المرضى الخاضعين للعلاج الدوري وقد أجريت هذه الاختبارات في مختبرات كلية العلوم وحدة الابحاث البيولوجية للمناطق الحارة في جامعة بغداد وفي المختبرات التعليمية في مدينة طب بغداد ، وقد شملت هذه الاختبارات كل مما يأتي:

3-3-1: إختبار تركيز أضداد الدنا مزدوج الخيط (Anti-ds-DNA)

يمثل إختبار قياس أضداد الدنا المزدوج الشريط بتقنية الامتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم طريقة كمية لقياس تركيز أضداد الذات صنف IgG, IgM, IgA الموجهة ضد الدنا مزدوج الشريط .ويستخدم في هذا الاختبار الصفيحة العيارية (microtiter) الحاوية على حفر مغلفة بالأجسام المضادة المخصصة للأرتباط بالدنا المزدوج الشريط. أجري هذا الاختبار على وفق الطريقة الموصوفة من قبل Ippolito واخرون (2011)، وقد استخدم فيه كل من المواد والمحاليل المجهزة من شركة Human الألمانية وكما مبين بالجدول (3-5).

جدول (3-5): المواد والمحاليل المستخدمة مع اختبار تركيز اضداد الدنا المزدوج الخيط

ت	المواد والمحاليل	
1	طبق الصفيحة العيارية الدقيقة	Microplate
2	المحاليل المعيارية المتدرجة	Calibrator
3	محاليل السيطرة الموجبة والسالبة	Control positive and negative
4	محلول تخفيف النموذج	Sample Buffer Diluent
5	محلول دارئ الغسل المركز	Concentrated Buffer Wash Solution
6	إنزيم الاقتران	Enzyme Conjugate
7	محلول المادة الأساس	TMP Substrate Solution
8	محلول وقف التفاعل	Stop Solution

3-3-1-1 تحضير المحاليل

3-3-1-1-1 محلول الغسل (Washing Solution)

حضر محلول الغسل المجهز مع عدة الاختبار بإضافة محتوى علبة واحدة (20 مل) من محلول الغسل المركز خمسين مرة (50x) إلى الماء المقطر الخالي من الايونات (980 مل) ليكون الحجم النهائي 1000 مل ومزج جيدا وحفظ بدرجة 4 م لحين الاستعمال.

3-3-1-1-2 محلول تخفيف النموذج (Sample Dilution Solution)

حضر المحلول بإضافة محتوى علبة واحدة (20 مل) من محلول تخفيف النموذج المركز خمس مرات (5x) الى 80 مل من الماء المقطر خالي من الايونات ليكون الحجم النهائي 100 مل .مزج المحلول جيدا وحفظ بدرجة 4 م لحين الاستعمال.

3-3-1-2- تخفيف النماذج (Sample dilution)

خففت النماذج بنسبة 1:100 (حجم :حجم) أضيف 10 مايكرو ليتر من مصل الدم الى 990 مايكرو ليتر من محلول تخفيف النموذج المحضر في الفقرة (2) في انبوبة اختبار بلاستكية .

3-3-1-3 طريقة العمل

1- أضيف 100 مايكروليتر من كل من محاليل المعايرة المتدرجة A و B وC و D و E و F المستخدمة لتركيز الدنا مزدوج الخيط في مصفوفة المحلول المنظم ومحاليل السيطرة الموجبة والسالبة ونماذج المرضى المخففة في حفر صفيحة المعايرة الدقيقة (Microtiter Plate) المغلفة بالدنا مزدوج الخيط.

2- حضنت الصفيحة العيارية بدرجة حرارة 25 م لمدة 30 دقيقة.

3- سُكبت محتويات الصفيحة وغسلت الصفيحة ثلاث مرات وأضيف 300 مايكروليتر من محلول الغسل المحضر مسبقا.

4- أضيف 100 مايكروليتر من المقترن الانزيمي (Enzyme Conjugate) في كل حفرة.

5- غُلفت الصفيحة بالغلاف الخاص بها، ثم حضنت لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في مكان مظلم .

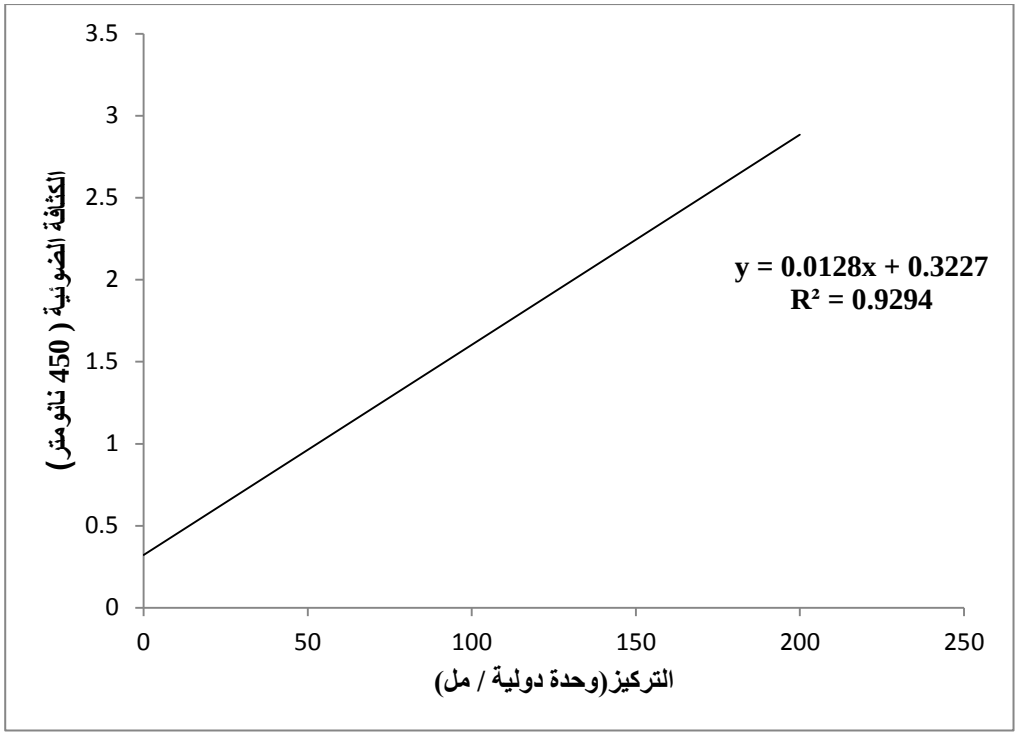
6- سكبت المحتويات الموجودة في حفر الصفيحة ،ثم غسلت الحفر باستخدام 300 مايكروليتر من محلول الغسيل ثلاث مرات ثم سكبت المحتويات بعد كل مرة.

7- أضيف لكل حفرة 100 مايكروليتر من محلول المادة الأساس (رباعي مثيل بنزوين TMB).

8- حضنت الصفيحة لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة بعد تغليفها كما في الخطوة (5).

9- أضيف 100مايكرو ليتر من محلول ايقاف التفاعل الانزيمي (Stop Solution) ثم حضنت الصفيحة لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة.

10- قيس الامتصاص الضوئي على الطول الموجي 450 نانومتر باستخدام قارئ الاطباق الخاص بوحدة الأليزا (ELISA reader)، ثم حسبت تراكيز أضداد الدنا مزدوج الخيط من خلال المنحني القياسي المبين في الشكل (3-1).



شكل(3-1): منحنى تقدير تراكيز اضداد شريط الدنا مزدوج الخيط في المصل

3-3-2-1 اختبار بروتين سي التفاعلي C-Reactive Protein Test (CRP)

أستخدم في هذا الاختبار طبق الصفيحة العيارية الدقيقة الذي يكون مقسماً على 12 شريطاً كل منها يحتوي على 8 حفر مغطاة بأجسام مضادة ضد بروتين سي التفاعلي وقد أجري الاختبار وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Johnson واخرون، (1999). لتحديد تركيز البروتين في عينات المرضى من خلال المنحنى القياسي كما موضح بالشكل(3-2). استخدم في هذا الاختبار كل من المواد والمحاليل المجهزة من شركة Human الألمانية وكما هو مبين في الجدول (3-6).

جدول (3-6): المواد والمحاليل المستخدمة في قياس تركيز بروتين سي التفاعلي

ت	المواد والمحاليل	
1	الصفيحة المعيارية الدقيقة	microtiter
2	مجموعة محاليل المعايرة	calibrators
3	محاليل السيطرة الموجبة والسالبة	Control positive (1) and negative (2)
4	المحلول المقترن	Enzyme Conjugate
5	محلول دارئ تخفيف العينات	Sample Buffer Diluent
6	محلول دارئ الغسل	Concentreated Buffer Wash Solution
7	محلول المادة الأساس	TMP Substrate Solution
8	محلول وقف التفاعل	Stop Solution

3-3-2-1 تحضير المحاليل

3-3-2-1-1 محلول الغسل (Washing solution)

حُضر محلول الغسل بإضافة 50 مل من محلول الغسل المركز 20 مرة (20x) وأكمل الحجم إلى 1000 مل بالماء المقطر. ومزجت المحتويات جيدا وحفظت بدرجة 5 م لحين الاستعمال.

3-3-2-1-2 محلول تخفيف النموذج (Sample diluting solution)

حُضر محلول التخفيف القياسي للنموذج المخفف أذ خفف 40 مل من محلول تخفيف النماذج الذي تركيزه 5x إلى 160 مل من الماء المقطر ليصبح الحجم 200 مل مزجت المحتويات جيدا وحفظ المحلول بدرجة حرارة 8-2 م لحين الاستعمال.

3-3-2-2 تحضير نماذج المصل (Serum samples preparation)

حضرت نماذج المصل وفق الطريقة الموصوفة من قبل Johnson واخرون،(1999) وكما يأتي :

أخذ 10 مل من محلول التخفيف القياسي المحضر في الخطوة (3-3-2-1-2) وخفف بنسبة 1000:1 بخطوتين وكما يأتي:

الخطوة الأولى :أخذ 10 مايكرو ليتر من مصل الدم وأضيف إلى 990 ملليتر من محلول النماذج المخففة ومزجت المحتويات جيدا".

الخطوة الثانية : أضيف 50 مايكرو ليتر من المحلول المحضر في الخطوة الاولى إلى 450 مايكروليتر من محلول النماذج المخففة ومزجت المحتويات جيدا".

3-3-2-3 طريقة العمل

1 - وضُعت 100مايكروليتر من كل من المحاليل القياسية المخففة في كل حفرة من حفر الصفيحة الدقيقة، ثم أضيف لكل حفرة 10 مايكروليتر من نماذج المصل المخففة.

2- غلفت الصفيحة بالغلاف الخاص المجهز من قبل الشركة المنتجة ثم حضنت بدرجة 25 م لمدة 30 دقيقة.

3- بعد انتهاء مدة الحضن ، غُسلت الصفيحة ثلاث مرات بمحلول الغسل ، سكب بعدها محلول الغسل.

4- أُضيف 100 مايكرو ليتر من محلول الاقتران في كل حفرة من حفر الصفيحة الدقيقة، ثم حضنت الصفيحة بدرجة 25 م لمدة 30 دقيقة بعد تغليفها بالغلاف الخاص بها.

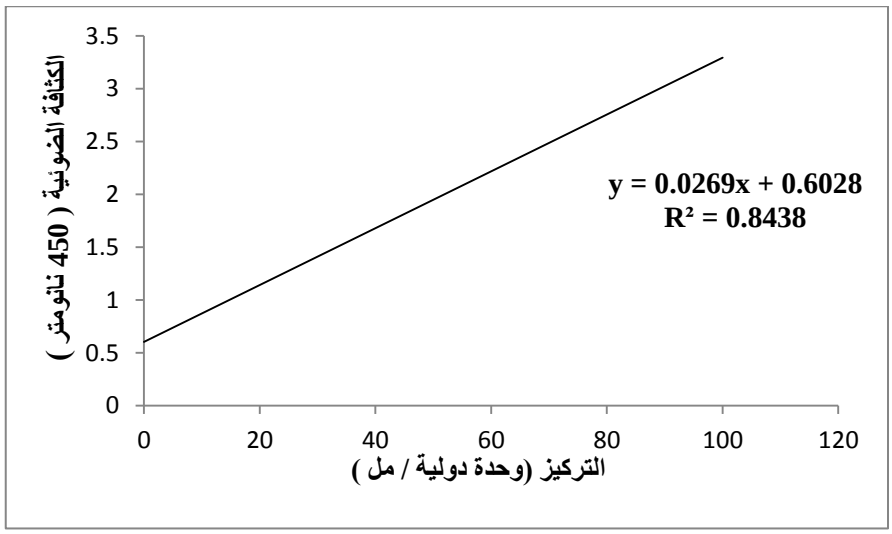
5- بعد انتهاء مدة الحضن ،غسلت الحفر ثلاث مرات بمحلول الغسل، سكب بعدها محلول الغسل.

6 - أضيف 100 مايكرو ليتر من محلول الملون(Chromogen) لكل حفرة في الصفيحة وحضنت بدرجة 25 م لمدة 15 دقيقة وفي مكان مظلم بعد تغليفها بالغلاف المجهز من الشركة .

7- رفع الغلاف وأضيف 50 مايكرو ليتر من محلول أنهاء التفاعل (Stop Solution) لكل حفرة من حفر الصفيحة، ثم قيست الامتصاصية على الطول الموجي 450 نانوميتر باستخدام جهاز القراءة (ELISA Reader).

3-3-2-2 تقدير تركيز أضداد بروتين سي التفاعلي

تم تقدير تركيز الاضداد من خلال المنحني القياسي لتركيز أضداد بروتين C التفاعلي المبين في الشكل (3-2).



شكل (3-2): المنحنى القياسي لتقدير تركيز اضداد البروتين سي التفاعلي في المصل

3-3-3 اختبار الاجسام المضادة ضد النووية (Antinuclear antibody)

أجري هذا الاختبار بطريقة IMTEC –ANA-LIA MAXX غير المباشرة لقياس الأجسام المضادة من نوع IgG. إذ يوفر تشخيص تفريقي أنواعاً عدة من الأجسام المضادة المختلفة كمستضد الدنا المزدوج الشريط ومستضد الهستون(Histone)، ومستضد النيكلوسوم (Nucleosome)، ومستضد سميث (Sm) (Anti-Smith)، وأضداد البروتينات النووية الرايبية الصغيرة ، ومستضد نواة الخلية المتكاثرة (PCNA)، ومستضدات السنترومير-CENP) B) ، واضداد SSA(Ro) و(SSB(La ، والمستضد ku، والمستضد Mi-2 في المصل أو البلازما البشرية .وقد أستخدم في هذا الاختبار مواد عدة وادوات والمحاليل مرفقة مع عدة الاختبار والمجهزة من شركة Human الألمانية وكما مبين في الجدول (3-7).

جدول (3-7): يوضح المواد المجهزة مع عدة اختبار الأجسام المضادة ضد النووية

ت	اسم المادة المرفقة مع العدة	
1	شريط الأختبار	Test strip
2	مسحوق التخفيف	Diluent powder
3	محلول دارئ التخفيف المركز	Concentrated Buffer Wash Solution
4	محلول الإقتران	Conjugate solution
5	محلول المادة الأساس	substrate solution
6	محلول وقف التفاعل	stop solution
7	الطبق الحاضن	incubation tray
8	ورقة التحديد	scoring sheet
9	ملاقط	Tweezers
10	ورقة الترابط	bonding sheet
11	قالب التقييم الشفاف	transparent Evaluation Template

3-3-3-1 تحضير المحاليل

3-3-3-1-1 محلول الغسل

أضيف 1مل من محلول الغسل المركز20 مرة الذي تركيزه (20x) الى 19 مل من الماء المقطر ليكون الحجم الى 20 مل.

3-3-3-1-2 محلول تخفيف النماذج

حضر المحلول بإذابة محتوى علبة واحدة من DIL-LIA في 30 مل من محلول الغسل المحضر في الفقرة السابقة. مزجت المحتويات جيدا وحفظت بدرجة 5 م لحين الاستعمال.

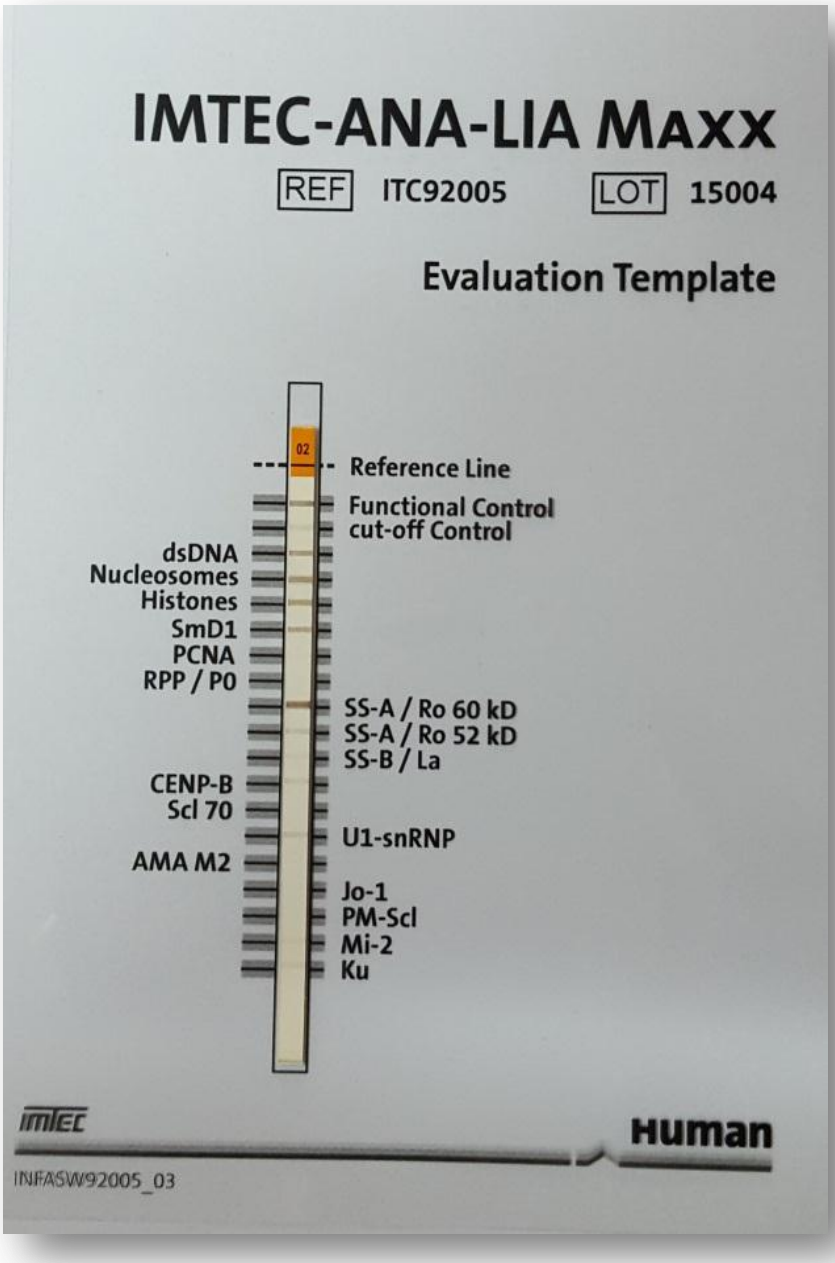
3-3-3-1-3 تخفيف النماذج

يخفف النموذج بنسبة101:1 بإضافة 10 مايكرو ليتر من مصل الدم الى 1مل من محلول تخفيف النماذج المحضر في الخطوة السابقة وحفظت بدرجة 5 م لحين الاستعمال .

3-3-3-2 طريقة العمل

تم تقدير الجسام المضادة ضد النووية وفقا للطريقة الموصوفة من قبل (Conrad،2002) .

1- وضع شريط الاختبار (Test strip) في طبق الحضن وأضيف إليه 1مل من محلول الغسل وحضنت لمدة دقيقة واحدة بدرجة 25 م.
2- أزيل محلول الغسل من طبق الحضن وغسل الشريط بـ1 مل من محلول الغسل ثم وضعت الصفيحة التي تحتوي على شرائط الاختبار في المحرك الهزاز لمدة 5 دقائق.
3- أزيل محلول الغسل وكررت خطوة الغسل ثلاث مرات.
4- اضيف 1مل من المحلول المقترن وحضنت الأطباق الخاصة بدرجة 25 م لمدة 30 دقيقة .غسلت الاشرطة بمحلول الغسل (1مل) ، وكررت عملية الغسل ثلاث مرات وفق الخطوة (2).
5- أضيف 1مل من محلول المادة الاساس في الطبق الحاضن وحضنت الاطباق بدرجة 25 م لمدة 10 دقائق.
6- أزيل محلول المادة الاساس ثم أضيف 1 مل من الماء المقطر مزال الايونات لمدة دقيقة واحدة بدرجة 25 م.
7- أزيل الماء المقطر من الطبق الحاضن ثم أضيف 1 مل من محلول أيقاف التفاعل الى الطبق الحاضن الذي يحتوي على شريط الاختبار الذي حضن بدرجة 25 م لمدة 5 دقائق.
8- أزيل محلول أيقاف التفاعل وترك الشريط ليجف حيث ظهور الحزم الملونة، حيث تمثل كل حزمة مقياس لأحد الاختبارات الكيموحيوية السبعة عشر. قُرئت الحزم باستخدام قالب التقييم الشفاف (Transparent Evaluation Template) المجهز من قبل الشركة وكما مبين في الشكل(3-1).



الصورة(3-1): قالب التقييم القياسي لحزم الاضداد الذاتية

3-3-3-3 طريقة قراءة النتائج

قُرئت النتائج بمسك كل شريط من شرائط الاختبار بوساطة الملقط المجهز مع العدة ووضعه على قالب التقييم الشفاف كل حزمة ظاهرة يكون موقعها على المؤشر الخاص بها وتم قراءة الحزم الظاهرة ودونت النتائج باستمارة خاصة بالتحليل المبينة في الشكل الملحق (4).

3-3-4 اختبار مكونات المتمم الثالث C3 والمتمم الرابع C4

أجري هذه الاختبار على وفق الطريقة الموصوفة من قبل Recasens وآخرون (2005)، اذ تم قياس تركيز المتمم الثالث والرابع في المصل لعينات المرضى وعينات السيطرة وذلك بتحديد تركيز المستضد الخاص بكل منهما. يعتمد مبدأ الاختبار على أنتشار البروتين المتمم في حفر هلام الاكاروز الذي يوجد فيها الاجسام المضادة المحددة لكل متمم، حيث سيتشكل المعقد المناعي بينهما بشكل هالة حلقية حول الحفرة يتم قياس أقطارها.

3-3-4-1 طريقة العمل

1- حضرت العينات بعد أخراجها من التجميد وتركها بدرجة 25 م لمدة (15) دقيقة.
2- أُزيل الغطاء عن الصفيحة وثُبت على مسند ثابت وترك لبضع دقائق بدرجة حرارة الغرفة للسماح لقطرات الماء المتكثفة في الحفر بالتبخر تدريجياً.
3- أضيف 5 مايكرو ليترمن المصل في كل حفرة من الحفر وتركت الصفيحة دون تحريك لمدة 15 دقيقة بدرجة 25 م.
4- غطت الصفيحة ونقلت الى غرفة الترطيب (Moist chamber) وتركت لمدة 72 ساعة.
5- قيست اقطار الدوائر المتكونة حول الحفر كما موضح في الصورة الملحق (5) بعدسة مكبرة وقورنت مع جداول قياسية مرفقة مع عدة الفحص الخاصة بأختبار المتمم الثالث في الجدول الملحق (6) والمتمم الرابع في الجدول الملحق (7) من قبل الشركة المجهزة.

3-4 أختبارات الدم

أجريت الاختبارات المختبرية وفحوصات الدم في مختبر مركز امراض وزرع الكلى ومختبرات مستشفى غازي الحريري. اذ تم اجراء التحاليل الآتية:

3-4-1 معدل ترسيب كريات الدم الحمراء Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR)

يعد اختبار معدل ترسيب كريات الدم الحمراء من الفحوصات المستخدمة لتقييم الاستجابات الالتهابية في المختبر ويتم بإضافة مقدار من الدم في انبوبة خاصة (Blood Collection Vacuum Tube) تحتوي على 3.8% سترات الصوديوم وضعت في جهاز MICROsed-System لمدة نصف ساعة قرأت النتائج من خلال شاشة الجهاز.

3-4-1-2 حساب خلايا الدم

تم حساب عدد كريات الدم البيضاء وعدد كريات الدم الحمراء وعدد الصفيحات الدموية والهيموغلوبين على وفق الطريقة الموصوفة من قبل (Bain و اخرون ،2012) وكما يأتي :

1- .وضعت الانابيب المانعة للتخثر والحاوية على عينة الدم المحفوظة في جهاز القلاب لمدة خمس دقائق.
2- أخذ 1مل من عينة الدم المحفوظة في الانبوبة المانعة للتخثر بعد تقليبها على ان لا تقل المدة المحفوظة فيها عن ثمان ساعات.
3- وضعت الأنابيب في جهاز CelltacES، وقُرِئَت النتائج من خلال شاشة عرض الجهاز.

3-5 التحليلات الوراثية Genetic Analysis.

3-5-1 استخلاص الدنا (Extraction of Genomic DNA)

تم استخلاص الدنا المجيني من عينات الدم التي تم جمعها من مرضى داء الذئب الأحمراري (64 عينة)، وعينات السيطرة الأصحاء(ست عينات) وقد أُجريت عملية الاستخلاص باستخدام ReliaPrep Blood gDNA miniprep system وحسب الخطوات الاتية:

1- أُضيف 20 مايكروليتر من محلول أنزيم البروتينيز (proteinase K) الى200 ملليليتر من الدم في انبوبة ابندورف. مزجت المحتويات جيداً بأستخدام المازج وعلى درجة حرارة المختبر(25 م) و لمدة 10 ثواني.

2- تركت الأنابيب لتستقر لبضعة دقائق، ثم أضيف اليها 200 مايكروليتر من محلول تحلل الخلايا (Cell Lysis Buffer Solution) ومزجت المحتويات بالجهاز المازج لمدة 15 ثانية.

3- حضنت الانابيب في حمام مائي بدرجة 56 م لمدة 15 دقيقة أُضيف بعدها لكل أنبوبة 250 مايكروليتر من المحلول المنظم الرابط (Binding Buffer Solution) ثم مزجت المحتويات لمدة 20 ثانية .

4- نُقلت المحتويات الى انابيب الجمع(Collection Tubes) المثبت فيها أعمدة فيها الربط ReliaPrep^{TM} binding column ، ثم نبذت الانابيب بسرعة 13000 دورة/الدقيقة ولمدة دقيقتين.

5- أزيلت انابيب الجمع واستبدلت بأنابيب جمع اخرى، ثم أضيف اليها 500 مايكروليتر من محلول غسل الاعمدة (Washing Column Solution).

6- نبذت الانابيب بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة دقيقتين، ثم أُزيلت أعمدة الجمع وكررت عملية الغسل ثلاث مرات ،ثم أزيلت أعمدة الجمع ووضعت في أنابيب أبندروف.

7- اضيف 100 ميكروليتر من الماء المقطر الخالي من النيوكليزات nuclease free) (water الى كل عمود وترك لمدة 2 دقيقة، ثم نبذت بسرعة 5000 دورة / الدقيقة ولمدة دقيقتان.

8- أزيلت الاعمدة The reliaPrep^{TM} binding column وتم الاحتفاظ بمحلول الدنا في انابيب ابندورف وحفظت بدرجة – 20 لحين الاستعمال.

2-5-3 تقدير تركيز ونقاوة الدنا (Quantitation Of DNA Concentration)

تم تقدير نقاوة وتركيز الدنا المستخلص بقياس مقدار الامتصاصية (Absorbance) عند الأطوال الموجية 260 و 280 نانوميتر باستخدام جهاز مطياف القطرة النانوية (Nano drop spectrophotometer). وحسبت نقاوة وتركيز الدنا من خلال المعادلات الاتية (Sambrook، 2001)

الامتصاص (260 نانوميتر)

النقاوة = ——————————————

الامتصاص (280 نانومتر)

تركيز الدنا (نانوغرام /مايكروليتر) = 50 نانوغرام × مقدار الامتصاص عند الطول الموجي 260 نانوميتر

3-5-3 الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(Agarose Gel Electrophoresis)

حضرت المحاليل الخاصة بالترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وفق الطريقة الموصوفة من قبل Maniatis وأخرون (1982) وكما يأتي:

3-5-3-1 تحضير المحاليل

3-5-3-1-1 محلول TBE الدارئ

حضر هذا المحلول بتركيز مضاعف خمس مرات (5x) ، بأذابة 45 ملغرام من مادة Tris-base و 27.5 غرام من حامض البوريك في كمية من الماء المقطر في دورق حجمي سعة 500 مللتر ثم أضيف لهذا المزيج 20 مل من محلول EDTA (0.5 مولاري). عدل الرقم الهيدروجيني الىpH 8.0 وأكمل الحجم الى العلامة بالماء المقطر ذي الرقم الهيدروجيني pH 8.0، وعقم بالموصدة بدرجة 121 م لمدة 15 دقيقة.

3-5-3-1-2 محلول دارئ التحميل (Loading Buffer)

حضر هذا المحلول بأذابة 0.5 غرام من مادة SDS في 5 مل من محلول الدارئ TBE المركز مرتين (2X) في انبوبة زجاجية ذات سداد محكم، ثم أضيف 5 مل من الكليسرول (85 %) و 2.5 غرام من صبغة أزرق البروموفينول، ثم مزجت المحتويات جيدا في جهاز المزج (Vortex).

3-5-3-1-3 صبغة بروميد الاثيديوم (0.5%)

حضرت هذه الصبغة بأذابة 0.05 غرام من الصبغة في 10 مل من الماء المقطر في أنبوبة زجاجية ذات سداد محكم وحفظت في الظلام.

3-5-3-4 تحضير هلام الاكاروز (0.7 % و 2.0%)

1- أضيف 0.35 غم من بلورات الأكاروز الى 50 مل من محلول TBE الدارئ في دورق مخروطي للحصول على تركيز نهائي من هلام الأكاروز مقداره 0.7%، كما أضيف 1 غم من بلورات الأكاروز الى 50 مل من محلول TBE الدارئ للحصول على تركيز نهائي اخر من هلام الاكاروز مقداره 2%.
2- وضعت الدوارق في فرن الموجات الدقيقة (Microwave Oven) وسخنت المحتويات الى درجة الغليان مع التحريك المستمر لحين ذوبان جميع بلورات الاكاروز.
3- برد محلول هلام الاكاروز الى 55-60 °م، ثم اضيف 1مايكروليتر من صبغة ايثيديوم بروميبد Ethidium Bromide (EtBr) ليصبح تركيزها النهائي 0.5 مايكروغرام /مل في الهلام.

3-5-3-5 الصب الافقي لهلام الاكاروز Casting Of The Horizontal Agarose Gel

تم تهيئة قالب الصب (Tray) على سطح مستوي وثبت عليه المشط (Comb)، ثم صب هلام الاكاروز بهدوء وترك مثبت على سطح افقي لمدة 30 دقيقة حتى تصلب وتماسك الهلام بالكامل، ثم ازيل المشط بعناية وحذر، وبعد ذلك وضع قالب الصب الحاوي على الهلام في حوض الترحيل (Tank) المملوء بمحلول 1X TBE الداريء ليكون بمستوى 2-3 مل فوق مستوى سطح الهلام.

3-5-3-6 ترحيل الهلام الكهربائي Gel Electrophoresis

مزج 5 مايكروليتر من عينات الدنا مع 2 مايكروليتر من صبغة بروموفينول الزرقاء مع 5 مايكروليتر من دارئ التحميل في أنابيب ابندورف، ثم تم تحميل كل عينة من الحامض النووي

في الحفر وتم توصيل التيار الكهربائي وأجريت عملية الترحيل لمدة ساعة واحدة بفولتية مقدارها 6 فولت /سم. وبعد وصول الصبغة الى نهاية رقعةالهلام تم ايقاف عملية الترحيل وصورت حزم الحامض النووي تحت الاشعة فوق البنفسجية باستخدامTransilluminator UV-light.

3-5-3-7 تضخيم جين البين الابيضاضي -10

استخدمت تقنية PCR لتضخيم منطقة الحفاز (Promoter) لجين البين الابيضاضي 10 بأستخدام بادئات نكلوتيدية متخصصة لهذا الغرض ويبين الجدول (3-8) التعاقب النيوكلوتيدي لهذه البادئات. أجريت عملية التضخيم في مزيج التفاعل المبين في الجدول (3-9)واجري تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction) وفقا لبرنامج التضخيم المبين في الجدول (3-10) ، تم بعدها تحليل نواتج التضخيم على هلام الاكاروز (2%) بوجود دليل الدنا الحجمي (DNA Ladder Marker) بأحجام جزيئية مقدارها 100 زوج قاعدي.

جدول (3-8):البوادئ النكليوتيدية المستخدمة في تضخيم جين البين الابيضاضي-10 بتقنية PCR

نوع البادئ	التعاقب النكليوتيدي `3→`5	حجم ناتج التضخيم المتوقع زوج قاعدي	المصدر
الامامي	GGTGAGCACTACCTGACTAGC	400 زوج قاعدي	Yao واخرون، (2015)
الخلفي	CCTAGGTCACAGTGACGTGG		

جدول (3-9): مكونات مزيج التفاعل لتضخيم منطقة الحفاز لجين البين الابيضاضي- 10 بتقنية PCR

ت	المكونات		التركيز	الحجم(مايكروليتر)
1	مزيج التفاعل	GoTaq Green Mater mix	10X	10
2	البادئ الامامي	Forward Primer	10µM	1
3	البادئ الخلفي	Reverse Primer	10µM	1
4	ماء	H_2O	-	11
5	نموذج الدنا	DNA	50-100ng	2
الحجم النهائي				**25**

جدول (3-10): البرنامج الحراري لتضخيم منطقة الحفاز لجين البين الابيضاضي- 10بتقنية PCR

ت	الخطوة		درجات الحرارة (°م)	الوقت	عدد الدورات
1	المسخ الاولي	Initial Denaturation	95	4 دقيقة	1
2	المسخ	Denaturation	95	30 ثانية	30
3	الارتباط	Annealing	60	30 ثانية	
4	الاستطالة	Extension	72	30 ثانية	
5	الاستطالة النهائية	Final Extension	72	7 دقيقة	1

3-5-3-8 تحديد التعاقب النكليوتيدي لنواتج التضخيم

(Sequencing Of The Amplification Products)

أرسلت نواتج تفاعل البلمرة لتضخيم جين الالبين الابيضاضي- 10 الى شركة Macrogen /كوريا لتحديد التعاقبات النكليوتيدية لمنطقة حفاز الجين، تم بعدها مقارنة تسلسل هذه التعاقبات مع تعاقبات نفس الجين الموجودة في بنك الجينات للمركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI) باستخدام برنامج Geneious 9 أذ تم تحديد الطرز الوراثية لكل عينة.

3-5-3-9 التحليل الاحصائي (Statistical analysis)

استعمل البرنامج الإحصائي SAS- Statistical Analysis System (2012) في تحليل البيانات لعينات الدراسة ودرس تأثير المعاملات المختلفة في الصفات المدروسة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (LSD)، كما قورنت الفروق المعنوية بين النسب المئوية باختبار مربع كاي (Chi-Square) وتم حساب توزيع التراكيب الوراثية والتكرار الاليلي وفق قاعدة هاردي واينبرك (Hardy & Wienberg law).

4 - النتائج و المناقشة Results and Discussion

4 –1 عينات الدراسة

شملت عينة الدراسة مجموعتين من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بمجموع 32 مريض وداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى بمجموع 32 مريض، تم مقارنة المجموعتين بمجموعة السيطرة الاصحاء والذي كان مجموعهم 32 شخص تم توزيع المجاميع الدراسية وبحسب النسب المئوية بالنسبة للجنس، الفئة العمرية، الحالة الاجتماعية، دليل كتلة الجسم، مؤشرات الاعتلالات الدموية، المؤشرات المناعية، اختبار فعالية المرض ،كما تم توزيعها بالنسية للجانب الوراثي وكالآتي:

4–1–1 توزيع مجاميع الدراسة وبحسب النسب المئوية بالنسبة للجنس:

شملت الدراسة الحالية 64 مريضاً مصابين بداء الذئب الأحمراري ، منهم 32 مريض مصاب بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بأعمار تراوحت بين 13–50 سنة ،كان عدد الذكور واحداً منهم وبنسبة 3.13 %، وعدد الاناث 31 وبنسبة 96.87 %. أما المجموعة الثانية فكانت تضم 32 مريضاً بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى بأعمار تراوحت بين16–65 سنة، كان عدد الذكور منهم 3 وبنسبة 9.38%، وعدد الاناث 29 وبنسبة 90.62 % ، اما المجموعة الثالثة فكانت مجموعة السيطرة الاصحاء والتي كانت تضم 32 شخصاً بأعمار تراوحت بين 21–54 سنة وكان عدد الذكور منهم 15 وبنسبة 46.88%، وعدد الاناث 17 وبنسبة 53.12%، وكما مبين في الجدول (4–1).

تشير هذه النتائج الى أن عدد الاناث المصابات بالمرض أكثر من عدد الذكور في مجموعتي المفاصل والكلى بفرق معنوي إحصائيا ($P<0.01$). جاءت هذه النتائج مطابقة للعديد من الدراسات التي أشارت الى أن نسبة الاصابة بالمرض تكون أكبر لدى النساء مقارنة بالرجال، وهناك العديد من الأسباب المحتملة لميل الإناث للإصابة بالمرض منها تأثير هرمون الاستروجين الانثوي، وانخفاض مستويات الاندروجين و ارتفاع برولاكتين الدم (Hyperprolactinemia)، والاضطراب

في مستويات الهرمونات التي توجها الغدد التناسلية (Gonadotropin-releasing hormone) (GnRH) (Sherif وWasef، 2004).

جدول (4-1):العدد والنسبة المئوية بحسب الجنس لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الأصحاء

المجموعة	الذكور		الاناث		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	15	46.88	17	53.12	2.363
مجموعة المفاصل	1	3.13	31	96.87	** 14.78
مجموعة الكلى	3	9.38	29	90.62	** 13.94
قيمة مربع كاي	** 11.36		** 11.36		---
** (P<0.01)					

من ناحية أخرى فقد كانت النتائج موافقة لتلك التي أجراها Feng وأخرون (2010) في دراسة على مجموعة من المرضى الصينيين المصابين بداء الذئب الأحمراري وقد بينوا أن معظم المصابين البالغ عددهم 1,790 مريضاً كانوا من النساء وبشكل خاص النساء في سن الانجاب (Reproductive age) كما أشار Murphy وIsenberg ، (2013) الى إن الذكور عادة أقل أصابه بمرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بينما كانت نسبة الاصابة بالمرض الذي يصيب الكلى أكثر شيوعاً لدى الذكور مقارنة بالإناث.

4-1-2 توزيع مجاميع الدراسة حسب الفئات العمرية

يوضح الجدول (4-2) أعداد ونسب الإصابة بمرض داء الذئب الأحمراري لمجاميع الدراسة بحسب الفئات العمرية، إذ أشارت النتائج أن أعلى نسبة إصابة في الفئة العمرية 26-45 سنة وبنسبة 56.25% لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل وبنسبة (50.00)% لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى وبفرق معنوي (P<0.01) وأن أقل نسبة إصابة

ضمن الفئة العمرية (46–65) سنة وبمعدل (12.50) % بالنسبة لمجموعة المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل وبنسبة (18.75)% وفرق معنوي (P<0.01) بين مجموعتي الدراسة .

جدول (4–2):العدد والنسبة المئوية بحسب الفئات العمرية لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى والمفاصل مقارنة بالسيطرة الأصحاء

المجموعة	مجموعة المفاصل		مجموعة الكلى		مجموعة السيطرة		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	
25–10	10	31.25	10	31.25	4	12.50	** 7.271
45– 26	18	56.25	16	50.00	25	78.13	** 8.348
65– 46	4	12.50	6	18.75	3	9.37	* 4.919
العدد الكلي	32	%100	32	%100	32	%100	---
قيمة مربع كاي	** 9.372		** 9.026		** 11.835		---
* (P<0.05) ، ** (P<0.01)							

جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع نتائج Boddaert وأخرون، (2004) في دراسة أجريت على مجموعة من مرضى داء الذئب الاحمراري والذين أشاروا فيها ان أول مظاهر داء الذئب الاحمراري تظهر في سن 16–55 سنة ويكون أكثر أنتشاراً بين النساء في عمر الانجاب كما أشارت دراستهم امكانية الاصابة بالمرض بأي مرحلة عمرية.

3-1-4 الحالة الاجتماعية

درست ظاهرة الاصابة بمرض داء الذئب الأحمراري لدى المتزوجين وغير المتزوجين في عينة المرضى العراقيين، وقد أشارت النتائج المبينة في الجدول (4–3) الى وجود فرق معنوي إحصائيا (P<0.01) بين نسبة الإصابة بالمرض لدى المتزوجين وكانت الاكبر مقارنة بنسبة

الإصابة لدى الاشخاص غير المتزوجين في عينة شملت 32 مريضاً بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل ومثلها من المرضى المصابين بالمرض الذي يصيب الكلى. حيث بلغ عدد الأشخاص المتزوجين المصابين بالمفاصل جراء الإصابة بالمرض 21 مريضاً (65.63%) مقارنة بـ11مريضاً(34.37%) ممن هم من غير المتزوجين. وانطبقت نفس الأعداد والنسب المئوية للمتزوجين وغير المتزوجين المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل. تشير هذه النتائج الى أن المتزوجين هم أكثر عرضه للإصابة بالمرض مقارنة بغير المتزوجين، وقد يعود السبب في ذلك الى اعتلالات هرمونية أنثوية أو ذكرية تعد عامل خطورة (Risk Factor) للإصابة بالمرض.

الجدول (4-3) العدد والنسبة المئوية للحالة الاجتماعية في عينات المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى في عينة من المرضى العراقيين .

المجموعة	متزوج		غير متزوج		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة المفاصل	21	65.63	11	34.37	** 9.82
مجموعة الكلى	21	65.63	11	34.37	** 9.82
قيمة مربع كاي	* 4.52		* 4.52		---
* (P<0.05)، ** (P<0.01)					

4-1-4 دليل كتلة الجسم (BMI)

يعد عامل البدانة أحد عوامل الخطورة للإصابة بالعديد من الامراض ومنها امراض المناعة الذاتية. تشير النتائج المبينة بالجدول (4-4) الى عدم وجود فرق معنوي إحصائياً بين معدل كتلة الجسم (BMI) لمرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى والمفاصل بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الاصحاء، مما يشير الى عدم وجود تأثر لكتلة الجسم للأشخاص على الاصابة وشدة

المرض. تعد هذه النتائج موافقة لتلك التي توصل اليها Oeser وأخرون (2005) الذين بينوا ان الزيادة في دليل كتلة الجسم لا يعد من المؤشرات السريرية للمرض إلا أن لها تأثير على الإجهاد البدني والالام العضلية.

الجدول (4-4): معدل كتلة الجسم لداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	المتوسط ± الخطأ القياسي
مجموعة السيطرة	32	27.12 ± 0.98 أ
مجموعة المفاصل	32	27.03 ±0.79 أ
مجموعة الكلى	32	28.11 ±0.82 أ
قيمة LSD	---	2.451
P-value	---	0.624

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول المعدل العام ± الانحراف القياسي لدليل كتلة الجسم

2- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود أختلاف معنوي أحصائياً

4-2 مؤشرات الاعتلالات الدموية (Hematological parameters)

4-2-1 خلايا الدم البيضاء (White Blood Cells)

يعد هذا المؤشر أحد المعايير المعتمدة لتصنيف مرض داء الذئب الأحمراري بحسب تصنيف الجمعية الامريكية لأمراض الروماتيزم (Dias واخرون، 2009). وتتأثر أعداد خلايا الدم البيضاء تأثراً كبيراً بزيادة شدة المرض، حيث تنخفض أعدادها في الدم لدى الاشخاص المصابين مقارنة بالأصحاء. إلا ان نتائج الدراسة الحالية المبينة في الجدول (4-5) تشير الى عدم وجود فرق معنوي إحصائيا في أعداد كريات الدم البيضاء بين المجاميع الثلاث (مجموعة مرضى المفاصل ومجموعة مرضى الكلى و مجموعة السيطرة الأصحاء)، اذ بلغت أعداد خلايا الدم البيضاء في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى 8.47×10^3 خلية/مل و 9.13×10^3 خلية/مل على التوالي مقارنة بـ 7.99×10^3 خلية/مل لعينة السيطرة الأصحاء.

الجدول (4–5): أعداد خلايا الدم البيضاء في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	أعداد خلايا الدم البيضاء (خلية ×10^3/مل)
مجموعة السيطرة	32	7.99 ± 0.33 أ
مجموعة المفاصل	32	8.47 ± 0.59 أ
مجموعة الكلى	32	9.13 ± 0.66 أ
قيمة LSD	---	1.534
P-value	---	0.339

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول الى المعدل العام للعينات ± الانحراف المعياري

2- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود اختلاف معنوي إحصائيا (P<0.01).

وقد يعود السبب في ذلك الى خضوع جميع عينات مرضى داء الذئب الأحمراري المشمولين بالدراسة للعلاج السريري من خلال تعاطي الادوية المثبطة مناعياً (Gladman واخرون، 2002).

كما تعد هذه النتائج مشابهة لتلك التي توصل اليها Lertchaisataporn وأخرون (2013) في دارسة أجروها على 89 مريض بداء الذئب الأحمراري وقد وجدوا أن أعداد خلايا الدم البيضاء في الدم ضمن الحدود الطبيعية نظراً لتعاطي المرضى الادوية المثبطة للجهاز المناعي، أذ ان أغلب هؤلاء المرضى الذين خضعوا للدراسة كانوا يتعاطون الادوية المثبطة للجهاز المناعي ومن هذه الادوية Corticosteroidو Antimalarial Drugو Cyclophosphamide و Azathioprine و Mycophenolate Mofetil. وفي دارسة أجريت من قبل Al-Bakaa وAbdalrudha، (2008) على مجموعة من المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري والوافدين الى مستشفى الصدر التعليمي في محافظة النجف الأشرف حول تأثير عقار Dexamethasone على هجرة كريات الدم البيضاء لدى المرضى بقياس أعداد الخلايا البيضاء قبل وبعد أعطائهم الدواء ومقارنتها مع مجموعة السيطرة وأثبتت النتائج الى وجود هجرة لكريات الدم البيضاء ونقص في عددها قبل إعطاء الدواء مقارنة بمستوياتها الطبيعية بعد تعاطي العقار.

4-2-2 أعداد خلايا الدم الحمراء (Count Of Red Blood Cells)

يعد هذا المؤشر أحد معايير الاعتلالات الدموية المعتمدة لتصنيف مرض داء الذئب الأحمراري بحسب تصنيف الكلية الامريكية لأمراض الروماتيزم (Marossy وأخرون، 2009).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-6) الى وجود انخفاض معنوي إحصائيا ($P<0.01$) في أعداد خلايا الدم الحمراء في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بأعدادها في عينات الدم للسيطرة الاصحاء. حيث بلغت أعدادها 4.98×10^6 خلية/مل في عينات الدم للسيطرة الأصحاء مقارنة بـ 4.41×10^6خلية/مل و 4.32×10^6 خلية/مل في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى على التوالي، ولا يوجد فرق معنوي إحصائيا في أعداد كريات الدم الحمراء في عينات مرضى المفاصل والكلى.

الجدول (4-6): أعداد خلايا الدم الحمراء في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	أعداد خلايا الدم الحمراء (خلية $\times10^6$/مل)
مجموعة السيطرة	32	0.10 ± 4.98 أ
مجموعة المفاصل	32	0.13 ± 4.41 ب
مجموعة الكلى	32	0.14 ± 4.32 ب
قيمة LSD	---	0.354
P-value	---	0.0006

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول المعدل العام للعينات ± الانحراف المعياري

2- تشير الحروف المختلفة الى وجود اختلاف معنوي إحصائيا ($P<0.01$)، بينما تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فرق معنوي إحصائي

تتفق هذه الدراسة مع تلك الموصوفة من قبل Muravyov واخرون، (2009) الذين أشاروا الى وجود انخفاض معنوي إحصائيا في أعداد خلايا الدم الحمراء في عينات الدم لمرضى داء الذئب

الأحمراري إذ لوحظ حدوث تشوه بشكل كريات الدم الحمراء ويعود ذلك الى عوامل عدة هي الشكل واللزوجة الداخلية لغشاء الخلايا والخواص الميكانيكية لتركيب الخلايا.

4-2-3 تركيز الهيموغلوبين في الدم (Haemoglobin Concentration)

يعد النقص في تركيز هيموغلوبين الدم من العلامات المميزة للإصابة بداء الذئب الأحمراري وهو من المؤشرات الخاصة بنشاط وفعالية المرض بسبب الاعتلالات الدموية المختلفة بشكل عام والنقص الحاصل في أعداد كريات الدم الحمراء بشكل خاص (Gormezano وأخرون، 2016).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-7) الى وجود انخفاض معنوي إحصائياً ($P<0.01$) في تركيز هيموغلوبين الدم في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى

الجدول (4-7): معدل تركيز الهيموغلوبين في الدم في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	تركيز الهيموغلوبين(غم/ديسيلتر)
مجموعة السيطرة	32	0.28 ± 13.69 أ
مجموعة المفاصل	32	0.34 ±11.83 ب
مجموعة الكلى	32	0.32 ± 11.79 ب
قيمة LSD	---	0.9004 **
P-value	---	0.0001

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول المعدل العام للعينات ± الانحراف المعياري

2- تشير الحروف المختلفة الى وجود أختلاف معنوي أحصائياً ($P<0.01$)، ولا يوجد فرق معنوي أحصائي بين الحروف المتشابهة.

مقارنة بتركيزه في عينة السيطرة الاصحاء. حيث أنخفض تركيز الهيموغلوبين في عينات الدم للسيطرة للأصحاء 13.69 غرام/ ديسيلتر مقارنة بـ11.83غرام/ديسيلتر و11.79 غرام/ ديسيلتر في عينات الدم لمرضى المفاصل والكلى على التوالي. بينما تشير النتائج الى عدم وجود اختلاف معنوي إحصائيا في تركيز الهيموغلوبين في الدم لعينات مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل و الكلى.

تتفق هذه النتائج مع تلك التي توصل اليها Jiang وأخرون (2016) الذين أشاروا الى وجود انخفاض في تركيز الهيموغلوبين في الدم لعينات مرضى داء الذئب الأحمراري مقارنة بالسيطرة الاصحاء فضلاً عن ظهور التشوهات في أشكال الخلايا الدموية واعتلالات دموية أخرى. أن الانخفاض في تركيز الهيموغلوبين في الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري قد يكون ناجماً عن نقص الحديد في الدم مما يؤدي الى الاصابة بفقر الدم المناعي الانحلالي (Karpouzas، 2013). وقد يعزى انخفاض تركيز الهيموغلوبين الى النقص الحاد في أعداد خلايا الدم الحمراء بسبب أستهدافها من قبل الاجسام المضادة التي ينتجها الجهاز المناعي لهؤلاء المرضى (Conzalez-Naranjo واخرون 2015).

4-2-4 أعداد الصفيحات الدموية (Counts of Platelets)

تتأثر أعداد الصفيحات الدموية وأحجامها وأشكالها في حالات الاصابة بمرض داء الذئب الأحمراري(Leader وأخرون،2012)، إذ يمكن ان يحدث النقص بعدد الصفيحات الدموية بعدة اليات منها ضعف إنتاج الصفائح في النخاع، تدمير الصفائح من خلال الدورة الدموية الطرفية وان الغالبية العظمى من مرضى داء الذئب الأحمراري يعانون من ذلك النقص بالصفائح بسبب الاضداد المضادة للصفيحات (Kapouzas،2013).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-8) الى عدم وجود فرق معنوي إحصائيا بين أعداد الصفائح الدموية في عينات الدم لمجموعة السيطرة بالمقارنة مع أعدادها في عينات الدم لمجموعة المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل ومجموعة المرضى المصابين بداء

الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى كما لم يلحظ هناك فروق معنوية بين أعداد الصفائح الدموية لمجموعتي المفاصل والكلى، حيث بلغت أعدادها في مجموعة السيطرة الاصحاء 275.94 ×10^3 صفيحة دموية/ملليتر مقارنة بـ 270.81×10^3 صفيحة دموية/ ملليتر، 255.01×10^3 صفيحة دموية/ملليتر في مجموعتي المفاصل والكلى على التوالي .

لم تكن نتائج هذه الدراسة موافقة لما توصل اليهDelgado-García واخرون، (2016) الذين أشاروا الى أن معدل أعداد الصفيحات الدموية في عينات الدم للمرضى البالغين المصابين بداء الذئب الأحمراري عالي الشدة مقارنة بالمرضى الذي تكون لديهم فعالية المرض اقل شدة وفي دراسة قام بها Gasparyan وأخرون، (2011) تبين أن هناك ازدياداً في أعداد الصفيحات الدموية لدى المرضى الذين يعانون من التهابات نشطة للمرض كما وجد ان الصفائح المرتبطة بالمستضد IgG الموجودة في المصل والصفائح التي تشترك مع IgG تزداد لدى المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري مع نقص بأعداد الصفيحات الدموية في دراسة أجريت على 90 مريضاً مصاباً بالمرض

الجدول (4-8): أعداد الصفيحات الدموية في عينات دم المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة مع السيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	أعداد الصفيحات الدموية (صفيحة×10^3/ملليلتر)
مجموعة السيطرة	32	275.94 ± 22.91 أ
مجموعة المفاصل	32	270.81 ± 19.15 أ
مجموعة الكلى	32	255.01 ± 13.87 أ
قيمة LSD	---	53.402
P-value	---	0.720

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول المعدل العام للعينات ± الانحراف المعياري

2- تشير الحروف المختلفة الى وجود اختلاف معنوي إحصائيا (P<0.01)، ولا يوجد فرق معنوي إحصائي بين الحروف المتشابهة.

وقد وجد ان 29 من هؤلاء المرضى مصاباً بنقص في أعداد الصفيحات الدموية مع عدم وجود دلالة إحصائية على ارتباط وجود الاجسام المضادة ضد الصفيحات ومظاهر المرض باستثناء نقص الصفيحات الدموية في حين لم يكن لـ 25 مريضاً منهم نقص بالصفيحات الدموية ولا يوجد لديهم الاجسام المضادة ضد الصفيحات الدموية ويشتركون بفعالية المرض .والاخير يتفق مع ما توصلت اليه نتائج الدراسة الحالية.

4-2-5 معدل ترسيب كريات الدم الحمراء Erythrocyte Sedimentation Rate(ESR)

يعد هذا المؤشر واحداً من أهم وأكثر المؤشرات السريرية استخداما للكشف عن الالتهابات المصاحبة للإصابات الممرضة .كما ويعد اداة مفيدة لتشخيص و رصد نشاط امراض المناعة الذاتية وعلى وجه الخصوص داء الذئب الأحمراري (Sbong و Feldman ،2015) .

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-9) الى وجود ارتفاع معنوي ($P<0.01$) في معدل ترسيب كريات الدم الحمراء لعينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري مقارنة بعينة السيطرة الاصحاء.

الجدول(4-9): معدل ترسيب كريات الدم الحمراء لعينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	معدل ترسيب كريات الدم الحمراء (ملم/ نصف ساعة)
مجموعة السيطرة	32	1.98 ± 13.09 ب
مجموعة المفاصل	32	5.85 ± 38.53 أ
مجموعة الكلى	32	6.14 ± 44.00 أ
قيمة LSD	---	14.125
P-value	---	0.0001

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول المعدل العام للعينات ± الانحراف المعياري

2- تشير الحروف المختلفة الى وجود أختلاف معنوي أحصائياً ($P<0.01$)، ولا يوجد فرق معنوي أحصائي بين الحروف المتشابهة

إذ بلغ معدل ترسيب كريات الدم الحمراء في عينات الدم لمرضى المفاصل والكلى 38.58 و 44 ملم/نصف ساعة على التوالي مقارنة بـ13.09 ملم/ نصف ساعة للسيطرة الاصحاء. كما أشارت النتائج الى عدم وجود فرق معنوي إحصائيا بين مرضى داء الذئب الأحمراري لمجموعتي الكلى والمفاصل بسبب الاصابة بالمرض.

تتفق هذه النتائج مع تلك التي توصل اليها Dima واخرون، (2016) في دراسة أجراها على مرضى داء الذئب الأحمراري الذين أشاروا الى أن ESR يعد عاملاً مهماً لتحديد نشاط المرض كما جاءت النتائج مطابقة لما توصل اليه Stojan وأخرون، (2013) في دراسة أجروها لمعرفة تأثير معدل ترسيب كريات الدم الحمراء على نشاط مرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى والمفاصل حيث يرتفع معدل ترسيب كريات الدم الحمراء عند ازدياد نشاط المرض في كلا المجموعتين. ويعتقد سبب ارتفاع معدل ترسيب كريات الدم الحمراء هو انخفاض تركيز البروتينات في بلازما الدم فضلاً عن تغيير شكل سطح كريات الدم الحمراء والتصاقها مع بعضها (Yee وأخرون، 2007).

4-3 المؤشرات المناعية (Immunological biomarkers)

4-3-1 بروتين سي التفاعلي(C-reactive protein)

يعد هذا المؤشر من المؤشرات السريرية المهمة في تشخيص الاصابة بداء الذئب الأحمراري. أذ يزداد تركيز هذا البروتين في الدم عند الاصابة بالمرض، وتتناسب الزيادة طردياً مع شدة أو نشاط المرض(Firooz وأخرون،2011).

تشير النتائج المبينة في الجدول(4-10) الى وجود ارتفاع معنوي إحصائيا ($P<0.05$) في تركيز بروتين سي التفاعلي في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى مقارنة بعينة السيطرة الاصحاء، حيث بلغ تركيز البروتين في الدم في عينة مرضى الكلى 13.63ملغم/لتر مقارنة بـ 9.51 ملغم/لتر في عينة السيطرة الاصحاء. في حين تشير النتائج الى وجود انخفاض معنوي إحصائيا في تركيز بروتين سي التفاعلي في عينات الدم لمرضى داء الذئب

الأحمراري الذي يصيب المفاصل مقارنة بتركيزه في دم مرضى الكلى والسيطرة الاصحاء، إذ بلغ تركيزه في عينات الدم لمرضى المفاصل 7.64 ملغم/لتر.

تعد هذه النتائج موافقة لتلك التي توصل اليها Ali وأخرون (2014) في دراسة أجريت على مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى، حيث كانت مستويات بروتين سي التفاعلي أعلى بالمقارنة مع عينات السيطرة الاصحاء. كما توافقت نتائج هذه الدراسة التي قام بها Kakati واخرون (2003) الذين أشاروا الى وجود ارتفاع معنوي في تركيز بروتين سي التفاعلي لعينة مرضى داء الذئب الأحمراري الذين يعانون من أصابه شديدة بالمرض. من ناحية أخرى فقد أشارة Gabay واخرون (1993) أيضاً الى أن مستوى بروتين سي التفاعلي يكون مرتفع عادة في مصول الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري بغض النظر عن درجة نشاط المرض. وفي دراسة أخرى جريت على مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل وجد بأن مستوى بروتين سي التفاعلي ينخفض لدى المرضى الذين يعانون من التهابات المفاصل غير التآكلي مقارنة بمستواه في عينة المرضى الذين يعانون من التهاب المفاصل التآكلي من جراء الاصابة بالمرض (Spronk واخرون ،1992).

الجدول(4–10): معدل تركيز بروتين سي التفاعلي في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	تركيز بروتين سي التفاعلي (ملغم/لتر)
مجموعة السيطرة	32	9.51 ± 1.49 أ ب
مجموعة المفاصل	32	7.64 ± 0.67 ب
مجموعة الكلى	32	13.63 ± 3.08 أ
قيمة LSD	---	5.660
P–value	---	0.047

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول المعدل العام للعينات ± الانحراف المعياري

2- تشير الحروف المختلفة الى وجود اختلاف معنوي إحصائيا (P<0.05) ، ولا يوجد فرق معنوي إحصائي بين الحروف المتشابهة

4 -3-2 أضداد الدنا مزدوج الخيط (ds-DNA antibodies)

وهي من الأضداد عالية التخصص للدنا مزدوج الخيط التي تنتج وتفرز الى مجرى الدم عند الاصابة بمرض داء الذئب الأحمراري. وقد اكتشفت في أمصال الدم لأكثر من 80% من المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري. وتعد هذه الاضداد من المعايير المهمة لتشخيص المرض وفقاً للتصنيف المعتمد من قبل الكلية الامريكية لأمراض الروماتيزم (Arbuckle واخرون ،2003).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-11) الى وجود ارتفاع معنوي($P<0.01$) في مستوى أضداد الدنا مزدوج الخيط في أمصال الدم لعينة مرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بمستواها في أمصال الدم لعينة السيطرة الاصحاء. حيث بلغ تركيز هذه الأضداد في أمصال الدم لعينة السيطرة الاصحاء 5.19 وحدة/مل مقارنة بـ65.15 و60.39 وحدة / مل في عينة المفاصل والكلى على التوالي .ولا يوجد فرق معنوي إحصائي في تركيز هذه الاضداد في أمصال الدم لعينات مرضى المفاصل والكلى.

تعد هذه النتائج متوافقة مع ما توصل اليه كلٌ من Yung وChan ، (2016) الذين أشاروا الى وجود ارتفاع معنوي في مستوى اضداد الدنا مزدوج الخيط في أمصال الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى، وأن مستوى هذه الاضداد يزداد بزيادة شدة المرض مما يؤدي الى زيادة أفراز السايتوكينات، وفي دراسة أجراها Tiao واخرون (2016) حول معايير تشخيص المرض وفق المعايير المستخدمة من قبل الكلية الامريكية لأمراض الروماتيزم ومن قبل العيادات الدولية التعاونية لداء الذئب الأحمراري، وجد ان المرضى الذين يعانون التهاب الجلد الذئبي الحاد يتميزون بارتفاع تركيز أضداد الدنا مزدوج الخيط وأن الزيادة في مستوى هذه الأضداد في مصل الدم يعود الى تحفيز الجهاز المناعي لنظام المتمم البديل و أرتباطها الحقيقي (Euchromation)

الجدول (4-11) أضداد الدنا مزدوج الخيط في مصل الدم لعينة مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى والمفاصل مقارنة بعينة السيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	تركيز أضداد الدنا مزدوج الخيط (وحدة/مل)
مجموعة السيطرة	32	0.96 ± 5.19 ب
مجموعة المفاصل	32	10.89 ± 65.15 أ
مجموعة الكلى	32	10.32 ± 60.39 أ
قيمة LSD	---	24.393
P-value	---	0.0001

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول المعدل العام للعينات ± الانحراف المعياري

2- تشير الحروف المختلفة الى وجود أختلاف معنوي أحصائياً (P<0.01)، ولا يوجد فرق معنوي أحصائي بين الحروف المتشابهة

لجزيئات الدنا مزدوجة الخيط وكما هو موصوف من قبل Rekvig واخرون ، (2012). أن الزيادة العالية في مستوى هذه الاضداد يؤدي الى حدوث المضاعفات الثانوية كالتهاب الكلى لارتباطها بالدنا الموجود في الخلايا وتكوين معقدات مناعية تترسب في مجرى الدم ومن ثم استقرارها في الكلى في قاعدة الاغشية الكبيبية وتحرير بروتينات البيلة (Proteinuria) وحدوث النزف الدموي (Compagno وأخرون، 2015).

4-3-3 تركيز المتمم الثالث (Complement-3 Concentration)

يعد هذا المؤشر من المؤشرات الكيموحيوية المهمة في تشخيص العديد من أمراض المناعة الذاتية ومنها داء الذئب الأحمراري، وينتج عادة لمنع الاصابة بهذه الامراض أو تفاقمها . وأن التباين الوراثي في جين المتمم الثالث يعد عاملاً من عوامل الخطورة للإصابة بداء الذئب الأحمراري (Leffler وأخرون، 2014)، ويشكل هذا المتمم ما مقداره 70% من بروتينات النظام المتمم (Acosta واخرون ،2004).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4–12) الى وجود انخفاض معنوي ($p<0.01$) في تركيز المتمم الثالث في مصل الدم لعينة مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء حيث أنخفض تركيزه من 116.08 ملغم/ديسيلتر في عينة السيطرة الاصحاء الى 104.2 و89.03 ملغم / ديسيلتر في عينة مرضى الكلى والمفاصل على التوالي.

الجدول(4–12): تركيز المتمم الثالث في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	تركيز المتمم الثالث(ملغم/ديسليتر)
مجموعة السيطرة	32	116.08 ±2.55 أ
مجموعة المفاصل	32	104.27 ±7.98 أب
مجموعة الكلى	32	89.08 ±6.23 ب
قيمة LSD	---	16.933
P-value	---	0.0082

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول المعدل العام للعينات ± الانحراف المعياري

2- تشير الحروف المختلفة الى وجود أختلاف معنوي أحصائياً ($P<0.01$)، ولا يوجد فرق معنوي إحصائي بين الحروف المتشابهة

تعد هذه النتائج موافقة لتلك التي توصل اليها Walport(2001). في دراسة أجراها حول تأثر المتمم على أمراض المناعة الذاتية ووجد أن نقص C3 يرتبط مع التهاب الكبيبات الكلوية وله تأثير على إحداث داء الذئب الأحمراري. وفي دراسة أخرى قام بها Li وأخرون (2013) على347 من المرضى الصينين المصابين بداء الذئب الأحمراري حيث وجد انخفاض معنوي بمستوى المتمم الثالث لدى المرضى. يمكن أن يحدث تفعيل للنظام المتمم بثلاث آليات مختلفة تلتقي في تفعيل المتمم الثالث والخامس يتكون المتمم الثالث من المسارات الثلاثة المسار التقليدي والبديل ومسار

اللكتين تلتقي المسارات الثلاث فيؤدي تباعا الى تكوين المعقدات المناعية التي تهاجم على الاغشية(Membrane Attack Complex) كمستجيب نهائي مشترك فتعطل غشاء الخلية من خلال تشكيل المسام على غشاء الخلية مما تسبب في تحلل الازموزي للخلايا (Nesargikar واخرون، 2012)، وتشترك في النشاط المفرط وغير المنضبط للمتمم في مجموعة من الامراض المناعية نقصه يؤدي الى امراض المناعة الذاتية (Vignesh وأخرون، 2016) .

4-3-5 تركيز المتمم الرابع C_4 (Complement 4 Concentration)

يعد هذا المتمم احد عناصر النظام المتمم للجهاز المناعي الذي يشترك مع الاجسام المضادة والخلايا البلعمية في مقارعة المسببات المرضية (Chen واخرون 2010) ويتأثر مستواه في مصل الدم في حالة حدوث الألتهابات الناجمة عن الاصابة بداء الذئب الأحمراري مما يؤدي الى تلف الانسجة والتلف الجهازي، وله وظائف وقائية مهمة ضد المرض، وإن نقصان تركيز هذا المتمم في المصل يعد أحد عوامل الخطورة للإصابة بمرض داء الذئب الأحمراري (Hagen واخرون، 2013 ؛ Bryan ، 2014).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-13) الى حدوث انخفاض معنوي إحصائيا ($P<0.01$) في تركيز المتمم الرابع في مصل الدم لعينات مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بعينة السيطرة الاصحاء. إذ انخفض تركيزه من 28.7 ملغم/ ديسيلتر في عينة السيطرة الاصحاء الى 20.64 ملغم/ ديسيلتر و20.51 ملغم/ ديسيلتر في عينة مرضى المفاصل والكلى على التوالي .

تعد هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه Watanabe وأخرون (2015) حيث وجد ان هناك نقص بمستويات C_4 في مصل دم المرضى كما أكدت دراستهم أن النقص الحاصل هو أحد عوامل الخطر لمرض داء الذئب الأحمراري. وفي دراسة قام بها Jonsson واخرون، 2007 على مرضى الكوريين المصابين بداء الذئب الأحمراري وجد أن سبب الاصابة يعود الى أن اوجه القصور في المتمم الرابع نادرة بطبيعة الحال، ولكن الاختلافات في تعبير الجين شائعة، حيث يعبر

الجدول(4-13): تركيز المتمم الرابع في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	تركيز المتمم الرابع (ملغم/ديسليتر)
مجموعة السيطرة	32	28.70 ± 1.03 أ
مجموعة المفاصل	32	20.64 ± 1.83 ب
مجموعة الكلى	32	20.51 ± 1.71 ب
قيمة LSD	---	4.401
P-value	---	0.0003

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول المعدل العام للعينات ± الانحراف المعياري

2- تشير الحروف المختلفة الى وجود اختلاف معنوي إحصائيا (P<0.01)، ولا يوجد فرق معنوي أحصائي بين الحروف المتشابهة

عن المتمم الرابع بنوعين من الجينات C_4A وC_4B تؤثر على مستويات المتمم في البلازما وهو الاهم لمراقبة فعالية المرض لدى المريض حيث وجد ان انخفاض تعبير الجين C_4A يزيد من خطر الاصابة بالمرض و تكمن الوقاية من المرض بازدياد تعبير الجين. بينما لا يوجد اي تأثير لجين C_4B على مرض داء الذئب الأحمراري. وفي دارسات أخرى قام بها Boteva واخرون، (2012) على مجاميع مختلفة من مرضى الذئب الاحمراري من شمال أوربا وجنوبها بينت هذه الدراسة أن نقص المتمم الرابع من اهم عوامل الخطر في مرض داء الذئب الأحمراري، ويعتقد وجود الاجسام المضادة التي تتكون في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري هي السبب في تنشيط نظام المتمم مما يؤدي الى تشكيل المركبات المناعية المعقدة التي تترسب في الكبيبات الكلوية وتعمل على تفعيل طريقة المتمم الكلاسيكية مما تسبب تلفاً في الانسجة وبالتالي حدوث التهاب الكلية الذئبية Lupus Nephritis (LN) (Eriksson واخرون ،2011).

4-3-6 الاجسام المضادة الضد النووية ANA

أكتشفت الاجسام المضادة ضد النووية منذ أكثر من خمسين عاماً وجدت بأنها مترافقة مع أمراض النسيج الضام (CTD) وتعتبر المعيار الرئيس في تشخيص الاضطرابات المناعية المختلفة كما تم أكتشاف حساسية وخصوصية مضادات النواة للكشف عن الاجسام المضادة الاخرى وهي من التقنيات الحديثة المهمة للكشف عن الاجسام المضادة المترافقة مع امراض الجهاز المناعي (Kumar واخرون، 2009). ومن هذه الأجسام المضادة التي تم التحري عنها هي كل مما يأتي:

4-3-6-1 الاجسام المضادة ضد الجسيم النووي (Antinucleosome Antibodies)

هي عبارة عن أجسام مضادة ينتجها الجهاز المناعي عند الاصابة بأمراض المناعة الذاتية ومنها داء الذئب الأحمراري والتي توجه ضد المستضدات النووية مثل الكروماتين ويعد الجسيم النووي الوحدة التركيبية للكروماتين. ويتألف الجسيم المركزي من الحامض النووي DNA مزدوج الخيط متعشق ببروتينات الهستونات النووية. وتقسم الأجسام ضد الكروماتين الى مجموعتين أحداهما اجسام مضادة موجهة ضد مكونات الكروماتين مثل الحمض النووي والاجسام المضادة الموجهة ضد الجسيم النووي وأن وجود هذه الاضداد في مصل الدم يعد مؤشراً للإصابة بالمرض (Liu وأخرون، 2005).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-14) الى ظهور أضداد الجسيم النووي في أمصال الدم لـ87.50% من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل، حيث أظهر اختبار التحري عن هذه الأضداد نتيجته موجبة في 28%مريضاً ضمن هذه العينة من المرضى وبفرق معنوي إحصائي ($P<0.01$) عن عينة المرضى (12.50%)الذين لم تظهر هذه الأضداد (نتيجة سالبة) في أمصالهم الدموية ضمن المجموعة نفسها. كما تشير النتائج المبينة في الجدول (4-14) أيضاً الى ظهور أضداد الجسيم النووي (نتيجة موجبة) في أمصال الدم لـ 65.63% من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى وبفرق معنوي ($P<0.01$) عن المرضى (34.37%) الذين لم تظهر هذه الأضداد في أمصالهم الدموية (نتيجة سالبة) ضمن نفس المجموعة. كما لم تظهر هذه الاضداد في أمصال الدم لأي عينة من عينات الدم لمجموعة السيطرة الأصحاء، مما يبين الى أن

هذه الأضداد تعد أحدى أهم المؤشرات المناعية لتشخيص المرض. من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة في الجدول (4-14) الى ظهور أضداد الجسيم النووي في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (نتيجة موجبة) بنسبة (87.50 %) أكبر من ظهورها في مصل الدم في مصل الدم لمرضى الكلى (65.63 %) وبفرق معنوي إحصائيا ($P<0.01$) مما يشير الى أن هذه الأضداد تعد أحدى أهم المؤشرات السريرية المناعية لتشخيص داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بالدرجة الرئيسة وبعدها مؤشراً لداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى.

الجدول (4-14):التحري عن أضداد الجسيم النووي في أمصال الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء

المجموعة	نتيجة موجبة (+)		نتيجة سالبة (−)		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	0	0.00	32	100.0	**15.00
مجموعة المفاصل	28	87.50	4	12.50	** 13.84
مجموعة الكلى	21	65.63	11	34.37	** 9.75
قيمة مربع كاي	** 13.92		** 13.92		---
** ($P<0.01$)					

تعد هذه النتائج مطابقة لما توصل اليهSaigal واخرون، (2013) في دراسة حول المؤشرات التشخيصية لداء الذئب الأحمراري إذ أشاروا الى أن أضداد الجسيم النووي يعد واحداً من مؤشرات الإصابة بداء الذئب الأحمراري كما أشاروا الى ظهور هذه الأضداد بمستويات عالية مقارنة بالمؤشرات السريرية الأخرى كأضداد الدنا مزدوج الخيط وبتراكيز أعلى من تراكيز المتمم الثالث. وفي دراسة أخرى أجراها Hochberg، (1997) الذي أشار الى أن أضداد الجسيم النووي تعد من المؤشرات المهمة لتشخيص المرض ومدى شدته. وفي دراسة أخرى أجراها Simon واخرون

(2004) فقد أشاروا الى حدوث زيادة في الاجسام المضادة ضد الجسم النووي مؤكد دور هذه الاجسام بالتسبب بالذئب الكلوية (Lupus Nephritis).

هنالك دراسة أجراها Bizzaro واخرون (2012) على مجموعة من المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري وجدوا أن هناك ارتفاعا في أضداد الجسيم النووي في مصول الدم لهؤلاء المرضى، كما بينت الدراسة ان هذه الاجسام تسبق عادة ظهور الاضداد النووية الاخرى في مرضى داء الذئب الأحمراري وأن لها الدور الاساس والمهم في التسبب بالذئب الكلوية وان سبب ذلك يعود الى أن الخلايا المناعية التائية والبائية تحفز انتاج هذه الأضداد وأضداد الدنا المزدوج الخيط وأضداد الهستون ألا أن أضداد الجسيم النووي هي الأول ظهوراً في أمصال المرض. وهذا ما اكده ايضاً Van وBerden (2011) في الدراسات التي أجروها حول أضداد الجسيم النووي في التسبب بالذئب الكلوية، وقد يعود السبب في ذلك الى حدوث موت الخلايا المبرمج (Apoptosis) مما يؤدي الى ظهور مكونات الكروماتين على سطح خلايا الموت المبرمج، تحرر أضداد الجسيم النووي من الخلايا ذات الموت المبرمج لتنتشر بصورة كبيرة في أمصال الدم لهؤلاء المرضى الامر الذي يؤدي الى تمييزها من قبل الجهاز المناعي فتتحفز الخلايا البائية و التائية للإنتاج الاجسام المضادة. والسبب الاخر في ظهور أضداد الجسيم النووي يعود الى ان تلك الاجسام المضادة تؤدي دورا محورياً في تطوير الآفات الكلوية التي تتوسط ارتباطها بتكوين الاجسام المضادة في الاغشية القاعدية. . ومن الجدير بالذكر فأن الدراسة الحالية تعد أول دراسة محلية عن التحري عن أضداد الجسيم النووي لدى المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى والمفاصل.

4-3-6-2 أضداد سميث SmD1 (Anti-Smith Antibodies)

تعد أضداد سميث من الاجسام المضادة ضد المستضدات النووية والهيولية وصفت لأول مرة من قبل الباحثين TanوKunkel ، إذ تعد علامة محددة للمرضى البالغين المصابين بداء الذئب الأحمراري وفقا لمعايير الجمعية الامريكية لأمراض الروماتيزم وقد ينخفض تكرارها لدى المرضى

البالغين بمعدل 5% الى 30% بالاعتماد على الاختبارات المصلية والعرقية . تتألف هذه الأضداد بما لا يقل عن تسع من البروتينات المتعددة المختلفة (SmB1 و SmB و SmB3 وSmD1 و SmD2وSmD3 و SmE وSmF و SmG، ومن أهم تلك الانواع الببتيدية SmD1 و SmB(Jaekel وأخرون، 2001).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4–15) الى ظهور أضداد سميث في مصل الدم لـ93.75 % من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل، إذ أعطى اختبار التحري عن هذه الأضداد نتيجة موجبة في 30 عينة سريرية من أصل 32 عينة مصابة بالمرض وبفرق معنوي إحصائيا ($P<0.01$) عن المرضى الأخرين ضمن هذه المجموعة الذين لم تظهر هذه الأضداد في أمصالهم الدموية (6.25%). كما تشير النتائج كذلك الى ظهور هذه الأضداد في مصل الدم لـ26 مريضاً (81.25%) بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى وبفرق معنوي ($P<0.01$) عن المرضى الاخرين ضمن المجموعة نفسها (18.75%) المصابين ولم تظهر هذه الأضداد في أمصالهم الدموية. كما لم تظهر أضداد سميث في أمصال الدم لأي عينة من مجموعة السيطرة الأصحاء (نتيجة سالبة للاختبار) وعلى ضوء نتائج الدراسة الحالية يعد هذا المؤشر (النتيجة الموجبة لأضداد سميث) مؤشراً مهماً للتحري عن الإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى . من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة أن أضداد الجسيم النووي في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (نتيجة موجبة) بنسبة (93.75%) أكبر من ظهورها في مصل الدم في مصل الدم لمرضى الكلى (81.25 %) وبفرق معنوي إحصائيا ($P<0.01$) مما يشير الى أن هذه الأضداد تعد أحدى أهم المؤشرات السريرية المناعية لتشخيص داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بالدرجة الرئيسة وبعدها يؤشر لداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى. و تعد هذه الدراسة هي الاولى محلياً تضمنت التحري عن أضداد سميث في عينات المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى.

تعد هذه النتائج موافقة لتلك التي توصل اليها Migliorini واخرون (2005) الذين أشاروا الى أن ظهور أضداد سميث في مصل الدم يعد مؤشراً مهماً للإصابة بداء الذئب الأحمراري فضلاً

عن انه مؤشراً لنشاط أو شدة المرض، وهذا ما أكده Yang واخرون (2016) من أن ظهور هذه الأضداد في مصل الدم يعد من مؤشرات الإصابة وشدة المرض.

الجدول (4-15) : التحري عن أضداد سميث في أمصال الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء

المجموعة	نتيجة موجبة (+)		نتيجة سالبة (-)		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	0	0.00	32	100.0	**15.00
مجموعة المفاصل	30	93.75	2	6.25	** 14.47
مجموعة الكلى	26	81.25	6	18.75	** 13.19
قيمة مربع كاي	** 14.52		** 14.52		---
(P<0.01) **					

4-3-6-3 مستضدات السنترومير (Centromere Antibodies)

وهي من الأضداد التي تظهر في مصل الدم للمرضى الذين يعانون من أمراض المناعة الذاتية ومنها مرض التصلب الجهازي SScl (Systemic sclerosis) و ظاهرة رينود (Raynaud phenomenon) وتصلب المرئ (Esophageal dysmotility) وتصلب الاصابع (Sclerodactyly) وتوسع الشعيرات (Telangiectasia) ومتلازمة كريست (Crest Syndrome) وداء الذئب الأحمراري(SLE) ويعد من مؤشرات الاصابة الخطيرة بالمرض (Respaldiza وأخرون، 2006).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-16) الى ظهور أضداد السنترومير في أمصال الدم لـ28 عينة من أصل 32 عينة لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل، حيث أعطى اختبار التحري عن هذه الأضداد نتيجة موجبة في 87.5% من عينات المجموعة التي شملتها

الدراسة المصابة بهذا المرض وبفرق معنوي (P<0.01) عن المرضى الأخرين الذين لم تظهر هذه الأضداد في أمصالهم الدموية ضمن نفس المجموعة. كما تشير النتائج المبينة في الجدول (4-16) الى ظهور أضداد السنترومير في أمصال الدم لـ 18 مريضاً (56.2%) بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى وبفرق معنوي (P<0.01) عن بقية المرضى البالغ عددهم أربعة مرضى من ضمن المجموعة نفسها المصابين بالمرض ولم تظهر هذه الأضداد في أمصالهم الدموية. كما لم تظهر هذه الاضداد في أي عينة من مجموعة السيطرة الاصحاء (نتيجة سالبة لأضداد السنترومير). وعلى ضوء هذه النتائج يعد هذا المؤشر المناعي واحداً من المؤشرات السريرية للإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل و الكلى. من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة الى أن أضداد السنترومير في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (نتيجة موجبة) بنسبة (87.50%) أكبر من ظهورها في مصل الدم لمرضى الكلى (56.25 %) وبفرق معنوي إحصائيا (P<0.01) مما يشير الى أن هذه الأضداد تعد أحدى أهم المؤشرات السريرية المناعية لتشخيص داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بالدرجة الرئيسة وبعدها مؤشر لداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى.

جدول (4-16): التحري عن أضداد السنترومير في مصل الدم لعينات المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء

المجموعة	نتيجة موجبة (+)		نتيجة سالبة (-)		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	0	0.00	32	100.0	** 15.00
مجموعة المفاصل	28	87.50	4	12.50	** 13.84
مجموعة الكلى	18	56.25	14	43.75	* 4.96
قيمة مربع كاي	** 13.63		** 13.63		---
* (P<0.05) ، ** (P<0.01)					

تعد هذه الدراسة هي أول دراسة محلية يتم فيها التحري عن أضداد السنترومير في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى .

جاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه (Respaldiza وآخرون، 2006) في دراسة أجروها على مجموعة من المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري حيث لوحظت هذه الاجسام المضادة في مصول المرضى المصابين بالذئب الأحمراري.

4-3-6-4 اضداد مستضد متلازمة سوغرين من نوع Ss-A/Ro60 (Sjogrens Ss-A/Ro60 (Syndrome Antigen Antibodies

تعد هذه الاجسام المضادة من الاضداد التي ينتجها الجهاز المناعي في حالة الإصابة بداء الذئب الأحمراري أو أمراض المناعة الذاتية الأخرى. وتستهدف هذه الأضداد المستضدات البروتينية المصاحبة للجزيئات الصغيرة من الحامض النووي الرايبوزي التي يطلق عليها Ro-Ribonucleoproteins وتختصر Ro-RNPs. ويبلغ الوزن الجزيئي للبروتينات الداخلة في تركيبها 60000 دالتون ويطلق عليها Ro60 (Eriksson وأخرون،2011).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-17) الى ظهور أضداد مستضد متلازمة سوغرين من النوعSs-A/Ro60 في مصل الدم لجميع مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (100%) إذ أعطى اختبار التحري عن هذه الاضداد نتيجة موجبة لجميع العينات السريرية البالغ عددها 32 عينة مصابة بالمرض. كما تشير النتائج أيضاً الى ظهور هذه الاضداد في مصل الدم لـ 26 مريضاً (81.25%) بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى وبفرق معنوي إحصائيا ($P<0.01$) عن المرضى الاخرين (ستة مرضى) المصابين بالمرض (18.75%) ضمن نفس مجموعة الكلى الذين لم تظهر هذه الاضداد في أمصالهم الدموية. كما لم تظهر هذه الاضداد في مصل الدم لعينة السيطرة الاصحاء البالغ عددهم 32 شخصاً (نتيجة سالبة للاختبار) وعلى ضوء هذه النتائج يعد هذا المؤشر السريري مهماً للتحري عن الإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى، من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة في الجدول (4-17) الى أن أضداد متلازمة

سوغرين من النوع Ss-A/Ro60 في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (نتيجة موجبة) بنسبة (100.0%) أكبر من ظهورها في مصل الدم لمرضى الكلى (81.25 %) وبفرق معنوي إحصائيا (P<0.01) مما يشير الى أن هذه الأضداد تعد أحدى أهم المؤشرات السريرية المناعية لتشخيص داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بالدرجة الرئيسة وبدرجة اقل لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى. ومن الجدير بالذكر أن هذه الدراسة تعد أول دراسة محلية يتم فيها التحري عن أضداد مستضد متلازمة سوغرين من النوع Ss-A/Ro60 في مصل الدم للمرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الاحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى.

تعد هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه Kvarnstrom و اخرون (2013) ؛ Eriksson واخرون،2011 في دراسة أجريت حول مجموعة من المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري حيث اشاروا الى ظهور هذه الاجسام المضادة في مصول الاشخاص المرضى مقارنة بالسيطرة الأصحاء.

الجدول (4-17): التحري عن أضداد مستضد متلازمة سوغرين من النوع Ss-A/Ro60 في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة

المجموعة	نتيجة موجبة (+)		نتيجة سالبة (-)		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	0	0.00	32	100.0	** 15.00
مجموعة المفاصل	32	100.0	0	0.00	** 15.00
مجموعة الكلى	26	81.25	6	18.75	** 13.19
قيمة مربع كاي	** 15.00		** 15.00		---
(P<0.01) **					

4-3-6-5 الاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من نوع ss-A/Ro52

وهي عبارة عن بروتين للمستضد ss-A/Ro52 يسيطر على أنتاج الحركيات الخلوية كما بينت الدراسات ان هذه الاجسام المضادة الموجودة لدى مرضى داء الذئب الأحمراري تعمل على تثبيط Ro52 (Kvarnstrom وأخرون،2013).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-18) الى ظهور أضداد متلازمة سوغرين من النوع ss-A/Ro52 في أمصال الدم لـ 18 مريضاً من أصل 32 عينة لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل، حيث أعطى اختبار التحري عن هذه الاضداد نتيجة موجبة بنسبة56.25% في عينات المرضى التي شملتها الدراسة وبأرتفاع معنوي أحصائيا (P<0.01) عن المرضى الاخرين الذين لم تظهر هذه الاضداد في أمصالهم الدموية والبالغ عددهم 18 مريضاً (نتيجة سالبة) ضمن نفس المجموعة ،كما تشير النتائج المبينة في الجدول (4-18) الى ظهور أضداد ss-A/Ro52 في أمصال الدم لـ 14 مريضاً (43.75%) من المجموع الكلي للمرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى وبفرق معنوي أحصائياً (P<0.01) عن بقية المرضى البالغ عددهم 18 مريض من نفس المجموعة الذين لم تظهر هذه الاضداد في أمصالهم الدموية (نتيجة سالبة).

الجدول (4-18): التحري عن الاضداد ss-A/Ro52 في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى والمفاصل مقارنة بالسيطرة الاصحاء .

المجموعة	النتيجة الموجبة (+)		النتيجة السالبة (-)		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	0	0.00	32	100.0	**15.00
مجموعة المفاصل	18	56.25	14	43.75	* 4.96
مجموعة الكلى	14	43.75	18	56.25	* 4.96
قيمة مربع كاي	** 11.63		* 4.96		---
(P<0.01) **					

كما لم تظهر هذه الاضداد في أي عينة من عينات مجموعة السيطرة الاصحاء (نتيجة سالبة). وعلى ضوء هذه النتائج لا يعد هذا المؤشر المناعي من المؤشرات السريرية القوية للإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى في حين يعد واحداً من المؤشرات المناعية للمرض الذي يصيب المفاصل. ومن الجدير بالذكر فأن الدراسة الحالية تعد أول دراسة محلية عن التحري عن أضدادss-A/Ro52 لدى المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى.

جاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه Kvarnstrom و اخرون (2013) في دراسة اجروها على مجموعة من المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري للتحقق من المؤشرات السريرية للمرض ومستويات ss-A/Ro52 حيث لوحظ ان لهذه الاجسام المضادة أهمية تشخيصية في مرضى داء الذئب الأحمراري والتي ترتبط مع العديد من مظاهر المرض السريرية والمختبرية وعلى وجه الخصوص الاجسام المضادة للمستضد Ro52 التي تدل على نشاط المرض وان وجود هذه الاجسام المضادة في مصل الدم مهماً لتثبيط نشاط Ro52 كما انها تعد مهمة للسيطرة على الانتاج المفرط للحركيات الخلوية والمتضمن الانترفيرون النوع الاول (Espinosa واخرون ،2011).

4-3-6-6 الاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من النوع SS-B/La

تعد الاجسام المضادة ضد مستضدات متلازمة سوغرن من نوع Anti- Sjogren's B syndrome type B (SSB) من الاجسام المضادة الاكثر شيوعاً في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري وايضاً واحد من الاجسام المضادة التي يتم أنتاجها في وقت مبكر ويعد وجودها في مصل الدم من العلامات التشخيصية لداء الذئب الأحمراري (Peene وأخرون، 2002).

تبين النتائج المبينة في الجدول (4-19) الى ظهور أضداد المستضد SS-B/La في مصل الدم لـ 24 مريضاً من أصل 32 من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل، حيث أعطى اختبار التحري عن هذه الاضداد نتيجة موجبة بنسبة 75.00% في عينات المرضى التي شملتها الدراسة للمصابين بهذا المرض وبفرق معنوي إحصائيا ($P<0.01$) عن المرضى الاخرين

الذين لم تظهر هذه الاضداد في أمصالهم الدموية والبالغ عددهم 8 مرضى (نتيجة سالبة) ضمن نفس المجموعة من مرضى المفاصل، كما تشير النتائج المبينة في الجدول (4–19) الى ظهور أضداد المستضد SS-B/La في أمصال دم 15 مريض (46.88%) بنتيجة موجبة للمرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى وبفرق معنوي إحصائيا ($P<0.01$) عن بقية المرضى البالغ عددهم 17 مريض من مجموعة الكلى نفسها ولم تظهر هذه الاضداد في أمصالهم الدموية (نتيجة سالبة). كما لم تظهر هذه الاضداد في أي عينة من عينات مجموعة السيطرة الاصحاء (نتيجة سالبة). وعلى ضوء هذه النتائج يعد هذا المؤشر المناعي من المؤشرات السريرية القوية للإصابة بداء الذئب الأحمراري .

من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة أن أضداد SS-B/La في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (نتيجة موجبة) بنسبة (75.00%) أكبر من ظهورها في مصل الدم لمرضى الكلى (46.88 %) وبفرق معنوي أحصائياً ($P<0.01$) مما يشير الى أن هذه الأضداد تعد أحدى أهم المؤشرات السريرية المناعية لتشخيص داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بالدرجة الرئيسة وبدرجة أقل مؤشر لداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى. ومن الجدير بالذكر فأن الدراسة الحالية تعد أول دراسة محلية للتحري عن أضداد **SS-B/La** لدى المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى.

تتوافق هذه النتائج مع توصل اليه Rao وأخرون (2013) الذين أشاروا الى وجود الأجسام المضادة للمستضد SS-B/La في مصول المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري كما أثبت الدراسة أن هذه الاجسام المضادة للمستضد SS-B/La ذات خصوصية عالية لمرض داء الذئب الأحمراري حيث تصل درجة تخصصها للمرض بحدود 96.7%، ولها علاقة بالمظاهر واعراض المرض السريرية. كما جاءت نتائج هذه الدراسة موافقة لما توصل اليه Franceschini و Cavazzana (2005) الذين أشاروا الى وجود الاجسام المضادة للمستضد SS-B/La في أمصال المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري.

الجدول (4-19): التحري عن الاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من النوع SS-B/La في عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء

المجموعة	نتيجة موجبة (+)		نتيجة سالبة (-)		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	0	0.00	32	100.0	**15.00
مجموعة المفاصل	24	75.00	8	25.00	** 12.50
مجموعة الكلى	15	46.88	17	53.12	NS 2.28
قيمة مربع كاي	** 12.50		** 12.50		---
(P<0.01) **					

ويعتقد كل من Routsias و Tzioufas (2010) أن سبب توافر هذه الاجسام المضادة وبصورة مرافقة مع الاعراض المظهرية للمرض كاحمرار الوجنتين وتساقط الشعر والالتهابات المصلية يعود الى ترسيب او تشكيل معقدات مناعية ضد مستضدات الجسم والذي يسبب التهاب الاوعية الدموية في الجسم وزيادة نفاذيتها وكذلك حدوث اضطرابات الاوعية الدقيقة. ومن الجدير بالذكر فأن الدراسة الحالية تعد أول دراسة محلية عن التحري عن أضداد SS-B/La لدى المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى.

4-3-6-7 الاجسام المضادة لمستضد بروتين الحامض النووي الرايبوزي الصغير-U1 (U1 Small Nuclear Ribonucleic Acid Protiein Antibodies)snRNP

تسبب المستضدات البروتينية U1-snRNP بأمراض المناعة الذاتية ومن ضمنها داء الذئب الأحمراري (Kattah واخرون،2010).

تشير النتائج المبينة بالجدول (4-20) الى ظهور أضداد مستضدات الحامض النووي الرايبوزي الصغير في مصل الدم لجميع مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل

(100%)، حيث أعطى اختبار التحري عن هذه الاضداد نتيجة موجبة لجميع العينات السريرية البالغ عددها 32 عينة من مجموعة المفاصل . كما تشير النتائج المبينة في الجدول (4–20) الى ظهور هذه الاضداد أيضاً في مصل الدم لـ 27 مريضاً (84.38%) من المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى وبفرق معنوي إحصائيا ($P<0.01$) عن المرضى الاخرين وعددهم خمسة فقط (15.62%) مصابين بالمرض ولم تظهر هذه الأضداد في أمصالهم الدموية . كما لم تظهر هذه الاضداد في مصل الدم لعينة السيطرة الاصحاء . من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة في الجدول (4–20) الى أن الاجسام المضادة لمستضد بروتين الحامض النووي الرايبوزي الصغير في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (نتيجة موجبة) بنسبة 100.0% أكبر من ظهورها في مصل الدم في مصل الدم لمرضى الكلى (84.38%) وبفرق معنوي إحصائيا ($P<0.01$) مما يشير الى أن هذه الأضداد تعد أحدى أهم المؤشرات السريرية المناعية لتشخيص داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بالدرجة الرئيسة وبعدها مؤشر لداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى.

تعد هذه النتائج موافقة لما توصل اليه Shin واخرون (2012) الذين أشاروا الى وجود الاجسام المضادة ضد U1-snRNP في مصل الدم للمرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري كما أشار Kattah وأخرون (2010) أيضاً الى وجود هذه الاضداد في مصل الدم وقد أشاروا الى أن الخصائص الهيكلية لهذه المستضدات المعقدة تؤدي الى الموت المبرمج للخلايا البائية والتائية. ومن الجدير بالذكر فأن الدراسة الحالية تعد أول دراسة محلية للتحري عن أضدادU1-snRNP لدى المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى.

الجدول (4–20). التحري عن الاجسام المضادة لمستضد بروتين الحامض النووي الرايبوزي الصغير في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء

المجموعة	نتيجة موجبة (+)		نتيجة سالبة (–)		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	0	0.00	32	100.0	** 15.00
مجموعة المفاصل	32	100.0	0	0.00	** 15.00
مجموعة الكلى	27	84.38	5	15.62	** 13.59
قيمة مربع كاي	** 15.00		** 15.00		---
** (P<0.01)					

4–3–6–8 أضداد المستضد Mi–2

وهي مجموعة من الاجسام المضادة التي تستهدف المستضدات النووية من طراز Mi-2 التي تمثل واحدة من أهم السمات المميزة للأمراض المجهولة السبب. والتي ترتبط بقوة مع التهاب الجلد بنسبة تصل الى 31% (Ghirardello واخرون،2005) .

تشير نتائج التحري عن اضداد المستضد Mi-2 في مصل الدم لعينات الدراسة المختلفة المبينة في الجدول (4–21) الى ظهور هذه الاضداد في مصل الدم لـ 26 عينة من أصل 32 عينة من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل ، حيث أعطى هذا الاختبار نتيجة موجبة بنسبة 81.25% في عينات المجموعة التي شملتها الدراسة وبفرق معنوي إحصائيا (P<0.01) عن المرضى الاخرين الذين لم تظهر هذه الاضداد في امصالهم الدموية ضمن نفس المجموعة. كما تشير النتائج المبينة في الجدول (4–21) الى ظهور أضداد المستضد Mi-2 (نتيجة موجبة) في مصل الدم لـ22 مريضاً بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى، اي بنسبة 68.75% وبفرق معنوي إحصائيا (P<0.01) كما تبين النتائج الموضحة في الجدول (4–21) الى وجود ارتفاع معنوي أحصائيا (P<0.01) في عدد المرضى الذين ظهرت لديهم هذه الاضداد مقارنة بالمرضى

الجدول (4–21): التحري عن الاجسام المضادة للمستضد Mi-2 في مصل الدم لعينات مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء

المجموعة	نتيجة موجبة (+)		نتيجة سالبة (–)		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	0	0.00	32	100.0	** 15.00
مجموعة المفاصل	26	81.25	6	18.75	** 13.19
مجموعة الكلى	22	68.75	10	31.25	** 10.32
قيمة مربع كاي	** 13.89		** 13.89		---
** (P<0.01)					

الاخرين البالغ عددهم ستة مرضى ضمن نفس المجموعة الذين يشكلون 31.25 % من حجم العينة المدروسة والذين لم تظهر هذه الاضداد في أمصالهم الدموية (نتيجة سالبة)، كما لم تظهر هذه الاضداد في مصل الدم لأي عينة من عينات السيطرة الاصحاء.

وفقاً للنتائج المبينة أعلاه فإن ظهور هذه الاضداد في مصل الدم لمرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل. من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة أن أضداد Mi-2 في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (نتيجة موجبة) بنسبة (81.25%) أكبر من ظهورها في مصل الدم في مصل الدم لمرضى الكلى (68.75 %) وبفرق معنوي أحصائياً ($P<0.01$) مما يشير الى أن هذه الأضداد تعد أحدى أهم المؤشرات السريرية المناعية لتشخيص داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بالدرجة الرئيسة وبدرجة أقل لداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى .كما تعد هذه الدراسة هي أول دراسة محلية تم فيها التحري عن أضداد المستضد Mi-2 في المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري.

4-3-6-9 الاجسام المضادة للمستضد ku

تعرف المستضدات من نوع ku بأنها عبارة عن بروتين نووي يتآثر مع الحامض النووي مزدوج الخيط وقد وجدت هذه المستضدات في مصول الدم للمرضى المصابين بأمراض المناعة الذاتية الروماتيدية. يتكون مستضد ku من وحدتين فرعيتين Ku70 وKu80 التي تتآثر مع الحامض النووي DNA وبدرجة أقل مع الحامض النووي الرايبي RNA ويوجد هذا المستضد في معظم خلايا حقيقيات النواة (Mahler واخرون، 2016).

تشير نتائج التحري عن أضداد المستضد ku في مصل الدم لعينات الدراسة المختلفة المبينة في الجدول (4-22) الى ظهور هذه الاضداد في مصل الدم لـ 28 مريضاً بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل، أذ أعطى هذا الاختبار نتيجة موجبة لـ 87.5% من المجموع الكلي للعينات المدروسة ضمن هذه المجموعة وبفرق معنوي إحصائيا ($P<0.01$) عن مرضى المفاصل الاخرين الذي لم تظهر هذه الاضداد في أمصالهم الدموية (12.5%) نتيجة سالبة. كما تشير هذه النتائج الى ظهور هذه الاضداد أيضاً في مصل الدم لـ 26 مريضاً بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى أي بنسبة 81.25% وبفرق معنوياً إحصائيا ($P<0.01$) عن المرضى البالغ عددهم ستة مرضى من أصل 32 مصاباً بالمرض ضمن هذه المجموعة الذين لم تظهر هذه الاضداد في أمصالهم الدموية (18.75% نتيجة سالبة)، كما لم تظهر هذه الاضداد في مصل الدم لجميع عينات السيطرة الاصحاء (نتيجة سالبة) التي شملتهم الدراسة. تشير هذه النتائج ايضاً الى أن ظهور أضداد المستضد ku في مصل الدم يعد مؤشراً من المؤشرات المناعية للإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى. من ناحية أخرى تعد هذه الدراسة هي أول دراسة محلية يتم فيها التحري عن أضداد المستضد ku في مصل الدم لعينة المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى.

الجدول (4-22): التحري عن أضداد المستضد ku في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء

المجموعة	نتيجة موجبة(+)		نتيجة سالبة (-)		قيم مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	0	0.00	32	100.0	**15.00
مجموعة المفاصل	28	87.50	4	12.50	** 13.84
مجموعة الكلى	26	81.25	6	18.75	** 13.19
قيمة مربع كاي	** 13.85		13.85**		---
(P<0.01) **					

4-3-6-10 أضداد الهستون (Histons Antibodies)

إنَ الاجسام المضادة ضد الهستون لها دور مهم واساسي في تشخيص مرض داء الذئب الأحمراري تعد جزءاً من مكونات الكروماتين والتي تمثل المكون الرئيس للدنا النووي الملتف حول لب من بروتينات الهستون H2A وH2B و H3 و H4 حيث يحدث التهاب في وحدات تنقية الكلوية (الكبيبات الكلوية) نتيجة لترسب الكروماتين على شكل معقدات من اضداد الكروماتين مسببة أضراراً وتلف في الكلى (Dieker واخرون، 2016).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-23) الى ظهور أضداد الهستون في أمصال الدم لـ 87.50% من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل، إذ أظهر اختبار التحري عن هذه الاضداد نتيجة موجبة في 28 مريضاً ضمن هذه العينة من المرضى وبفرق معنوي إحصائيا (P<0.01) عن الاخرين (13%) من العينة نفسها من المرضى الذين لم تظهر فيها هذه الاضداد (نتيجة سالبة) في أمصالهم الدموية . كما تشير النتائج المبينة في الجدول (4-15) أيضاً الى ظهور أضداد الهستون (نتيجة موجبة) في أمصال الدم لـ 65.63% من مرضى داء الذئب

الأحمراري الذي يصيب الكلى وبفرق معنوي إحصائيا (P<0.01) عن الاخرين (34.37%) من نفس العينة من المرضى الذين لم تظهر هذه الأضداد في أمصالهم الدموية.

الجدول(4-23): التحري عن أضداد الهستون في أمصال الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء

المجموعة	نتيجة موجبة (+)		نتيجة سالبة (-)		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	
مجموعة السيطرة	0	0.00	32	100.0	**15.00
مجموعة المفاصل	28	87.50	4	12.50	** 13.84
مجموعة الكلى	21	65.63	11	34.37	** 9.75
قيمة مربع كاي	** 13.92		** 13.92		---
** (P<0.01)					

كما لم تظهر هذه الاضداد في أمصال الدم لأي عينة من عينات الدم لمجموعة السيطرة الأصحاء، مما يشير الى أن هذه الأضداد تعد أحدى المؤشرات المهمة المناعية لتشخيص المرض. من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة أضداد الهستون في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (نتيجة موجبة) بنسبة (87.50 %) أكبر من ظهورها في مصل الدم في مصل الدم لمرضى الكلى (65.63 %) وبفرق معنوي احصائياً (P<0.01) مما يشير الى أن هذه الأضداد تعد أحدى أهم المؤشرات السريرية المناعية لتشخيص داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بالدرجة الرئيسة وبعدها مؤشر لداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى.

جاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه Dieker واخرون، (2016) في دراستهم لمجموعة من المرضى المصابين بداء الذئب الاحمراري الذي يصيب المفاصل ومجموعة مرضى مصابين بداء الذئب الاحمراري الذين ليس لديهم أصابات كلوية ومجموعة السيطرة لوحظ وجود أعداد من اضداد الهستون المعدلة التي تسبب في نشاط المرض ومن هذه الأنواع الاجسام المضاد ضد الهستون غير محددة بالذئب الاحمراري كما في $H2Bp^{ac}$ و $H4p^{ac}$ في حين أن النوع $H2Bp^{ac}$ هو

على وجه الخصوص يرتبط بالتهاب الكلية الذئبية . وهناك دراسة قام بها Seredkina واخرون (2013) حيث تبين وجود تفاعل قوي مع الهستونات متعددة الببتيد المعدلة في غالبية المرضى المصابين بداء الذئب الاحمراري. وفي دراسة أخرى قام بها Shabana وآخرون (2009) على مجموعة من المرضى المصريين المصابين بداء الذئب الاحمراري من مستشفى جامعة المنصورة حيث أكدت دراستهم وجود الاجسام المضادة ضد الهستونات يرتبط الى حد كبير بالمرض وأن جودها تشخيص للأصابة المبكرة بالمرض وجاءت نتائجهم موضحة كون الاجسام المضادة ضد الهستونات حساسة ومحددة لمرض داء الذئب الاحمراري و كتشخيص مبكر للمرض وعلى وجه الخصوص للمرضى الذين تظهر لديهم السلبية للأجسام المضادة ضد الدنا الثنائي الشريط. ويعتقد ان سبب ذلك يعود الى كون البروتينات الهستونية وغير الهستونية والموجودة مع الحمض النووي (DNA) تميز وتشخص عن طريق مكوناته الخلوية (Cellular) والخلطية (Humoral) في جهاز المناعة لدى المرضى المصابين بداء الذئب الاحمراري كما أن المركبات المناعية من الاجسام المضادة ضد الهستونات المتراكمة تشير لكونها مؤشر قوي للمرض الى جانب توافرها مع الاجسام المضادة ضد الدنا الثنائي الشريط ، ولذلك عدت هذه الاضداد أداةً تشخيصية للمرض ورصد أضطراباته. ومن الجدير بالذكر تعد هذه الدراسة هي أول دراسة محلية تتضمن التحري عن أضداد الهستون في عينات المرضى العراقيين المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى والمفاصل.

4-4 اختبار فعالية المرض Disease activity test

يستخدم اختبار فعالية المرض لقياس شدة المرض وفعاليته وهو عبارة عن مجموعة من المؤشرات السريرية التي تستخدم لتقييم نشاط المرض في المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري وتشمل بنود محددة من أجل تقييم مظاهر المرض بما فيها المظاهر المفصلية النشطة حيث يتضمن هذا المرض 24 نقطة وتستخدم على نطاق واسع في التجارب السريرية وفي الممارسات السريرية الروتينية في المرضى الذين يعانون من التهاب المفاصل الروماتويدي ويعد وسيلة سهلة لأداء ونشاط المرض الذي يرتبط الى حد كبير بتشخيص الطبيب للمرض وحالة المريض على وفق التقييم

العالمي ويمكن تصنيف نشاط المرض الى أدنى مستوى (No Flare) أو معتدل (Mild Flare) او عالي الفعالية (Severe Flare)، ويمكن تحديده من خلاله شدة المرض(Fransen وأخرون ،2010). كما أستخدم هذا المقياس في رصد المرضى المصابين بداء الذئب الاحمراري الذي يشترك في بعض الخصائص السريرية مع التهاب المفاصل الروماتويدي (Salaffi و أخرون ،2014).

تشير النتائج المبينة في الجدول (4-24) الى وجود انخفاض معنوي احصائيا بين مجموعة السيطرة وبين مجموعة المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل ومجموعة المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى كما ويوجد انخفاض معنوي احصائيا بين مجموعتي المفاصل والكلى حيث بلغت عدد النقاط المحسوبة في مجموعة السيطرة (0) نقطة بينما بلغت أعدادها في مجموعة المفاصل 38.28 نقطة وبلغت أعدادها في مجموعة الكلى 45.34 نقطة. وتعد هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه George واخرون، (2017) الذين أشاروا الى أن المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى تزداد لديهم فعالية المرض كما أشار Marks واخرون ،(2010) الى ان فعالية المرض تزداد ويزداد نشاط المرض بتأثره بمؤشرات حيوية معينة كاختبارات الدم، ومعدل ترسيب كريات الدم الحمراء، ومعدل بروتين سي التفاعلي، والاضداد النووية، والاضداد ضد الدنا الثنائي الشريط، والمتمم المناعي C_3 و C_4 وكما شملت اختبارات أخرى متعلقة بمصل الدم كالشوارد والكرياتين والزلال وتعداد الدم الكامل (Full Blood Count) وفحص الادرار العام المتضمن كمية البروتين مع الالبومين ومعدل الكرياتين. وفي دراسات قام بها Mikdashi وNived ،(2015) في دراسة حول قياس نشاط المرض في البالغين الذين يعانون من داء الذئب الأحمراري حيث وجد الباحثان أن هذا المقياس يبين حكم أذا ما كان المريض بداء الذئب الأحمراري أفضل أم أسوء ويوضح كيفية التعامل مع المرضى وكيفية السيطرة على المرض والهدف منه هو تحسين حالة المرض او على الاقل درىء تدهوره ويحدد بدقة نشاط المرض وحالته الشديدة بالاعتماد على قائمة مكونة من عدد من الادلة ذات المغزى السريري وفق معايير ذات استجابة حساسة جدا وقابلة للتكرار وقابلة للتغيير والاستجابة حسب حالة كل مريض.

الجدول (4-24): معدل قياس فعالية المرض لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء*

المجموعة	العدد	معدل قياس فعالية المرض
مجموعة السيطرة	32	ج 0.00 ± 0.00
مجموعة المفاصل	32	ب 2.40 ± 38.28
مجموعة الكلى	32	أ 2.33 ± 45.34
قيمة LSD	---	** 5.433
P-value	---	0.0001
** (P<0.01)		

(*) 1- تمثل القيم المبينة في الجدول المعدل العام للعينات ± الانحراف المعياري

2- تشير الحروف المختلفة الى وجود اختلاف معنوي احصائيا (P<0.01)، ولا يوجد فرق معنوي احصائيا بين الحروف المتشابهة

4- 5 الدراسة الجزيئية

4-5-1 استخلاص الدنا المجيني (Extraction of Genomic DNA)

تم استخلاص الدنا المجيني من عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل (32 عينة) والكلى (32 عينة)، وعينات السيطرة الأصحاء(ستة عينات). وقد أُجريت عملية الاستخلاص بأستخدام عدة الاستخلاص ReliaPrep Blood gDNA miniprep system المجهز من شركة بروميكا. وقد أشارت النتائج الى ان تركيز الدنا المستخلص لجميع العينات قد تراوح بين 90 - 120 نانوغرام\مايكروليتر ونقاوة عالية تراوحت بين 1.7 الى 2.0 . كما تشير النتائج المبينة في الشكل (4-1) الى أنه قد تم الحصول على حزم دنا حادة بعد الترحيل



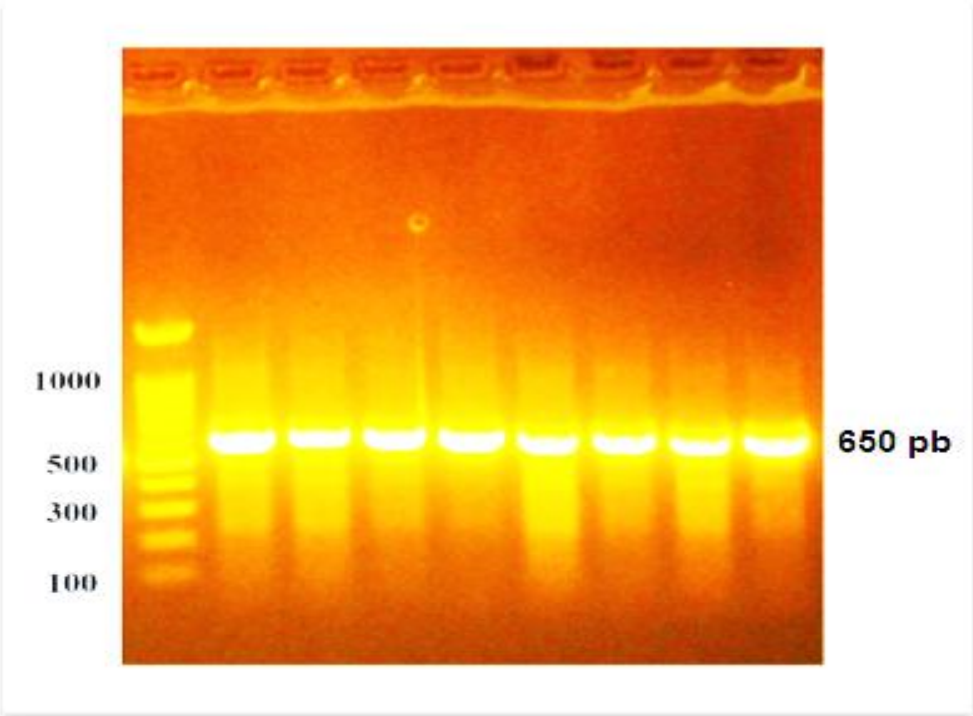
الشكل (4-1): الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(3%) للدنا المجيني المستخلص من عينات الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري والسيطرة الاصحاء ولمدة ساعة واحدة وبفولتية 5 فولت /سم

الكهربائي على هلام الاكاروز (3%) مما يشير الى كفاءة طريقة الاستخلاص باستخدام عدة الاستخلاص المذكورة.

أجريت عملية الاستخلاص باستخدام عدة استخلاص حاوية على اعمدة فصل المكون الاساسي لها هي مادة السليلوز التي تساعد في الحصول على الدنا بنقاوة عالية. تتميز طريقة التنقية هذه بأنها اكثر كفاءة من مثيلاتها المعتمدة على اعمدة الفصل المتكونة من مادة السليكا، حيث لم يتم في هذه الطريقة استخدام الكحول الأثيلي لغرض ارتباط وغسل الدنا المستخلص مما أعطى كفاءة اعلى لتنقية الدنا، اذ ان الكحول قد يمنع ذوبان الدنا اذا ما تمت ازالته نهائيا من محلول الاستخلاص (Hill،2011).

4-5-2 تضخيم جين البين الابيضاضي – 10

استخدمت تقنية تفاعل السلسلة لأنزيم البوليميريزPCR لتضخيم منطقة حفاز جين البين الابيضاضي – 10 باستخدام بادئات نكلوتيدية متخصصة لهذا الغرض . تشير نتائج التضخيم المبينة في الشكل (4-2) الى أنه قد تم الحصول على حزمة واحدة بحجم 650 زوج قاعدي تمثل منطقة حفاز الجين (Promoter) المراد دراستها وتحديد طبيعة تعاقبها النكليوتيدي وعلاقته بالإصابة بداء الذئب الأحمراري.



الشكل (4-2): الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (3%) لنواتج تضخيم منطقة حفاز جين البين الابيضاضي – 10 لمدة ساعة واحدة وبفولتية 5 فولت /سم

4-5-3 تحديد التعاقب النكليوتيدي لنواتج التضخيم DNA Sequencing for Amplified) products)

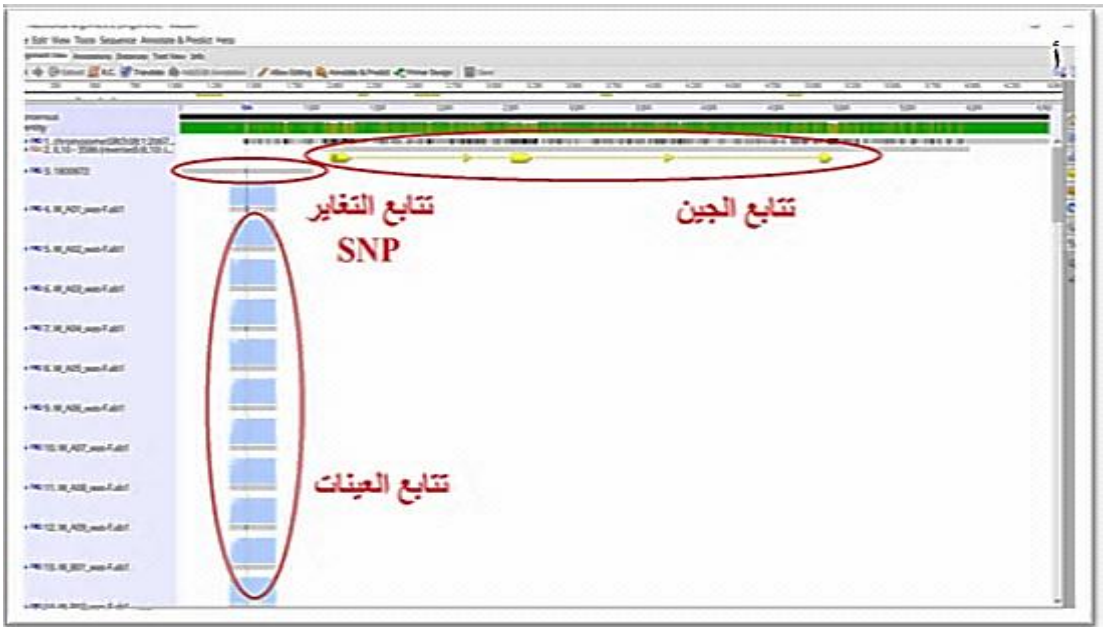
أجريت عملية تحديد التعاقب النكليوتيدي لمنطقة الحفاز لجين البين الابيضاضي -10 التي تم تضخيمها في الخطوة السابقة، تم بعدها تحليل التعاقبات النكليوتيدية للعينات جميعها المشمولة بالدراسة حاسوبياً بأستخدام برنامج Geneious المتاح على الشبكة العنكبوتية (Internet). وقد أجريت مقارنة التعاقبات النكليوتيدية لكل عينة من عينات مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى والسيطرة الاصحاء مع التعاقب النكليوتيدي المسجل للمنطقة نفسها في قواعد البيانات NCBI وبضمنها موقع التباين 206773062 في حفاز جين البين الابيضاضي-10 (rs1800872)، إذ تشير قواعد البيانات الى النكليوتيدة الموجودة في هذا الموقع هي من نوع سايتوسين (cytosine) في الجنس البشري (*Homo Sapiens*).

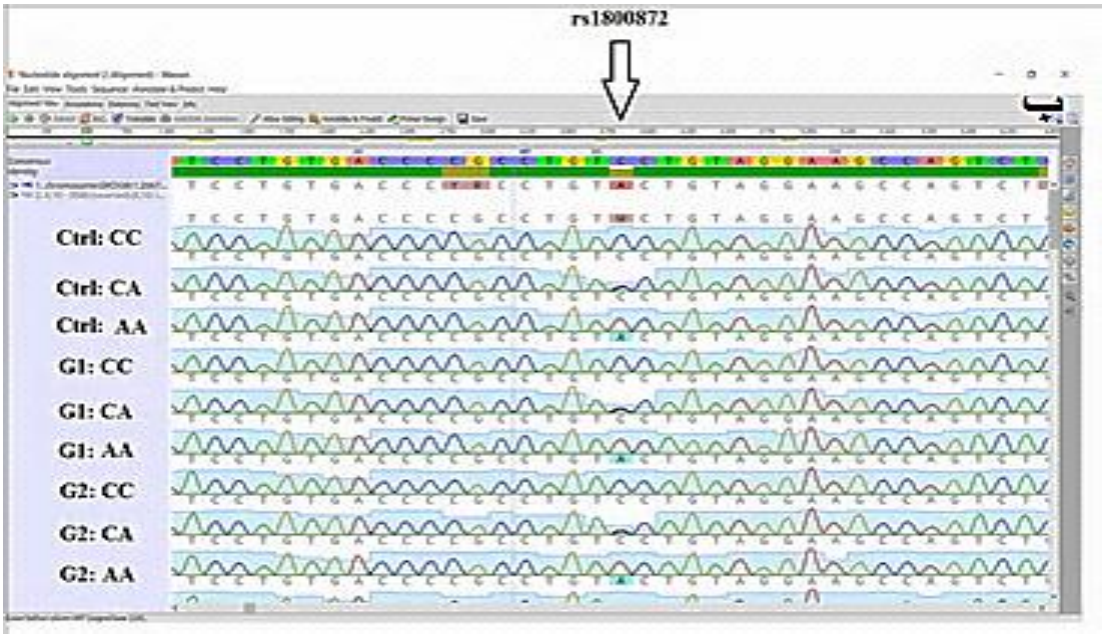
تشير النتائج المبينة في الشكل (4-3أ) الى التتابع النكليوتيدي والخارطة الوراثية لجين البين الابيضاضي-10 ومنطقة الحفاز وموقع التباين لعينات الدراسة المختلفة. من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة في الشكل (4-3 ب) ظهور التباين من نوع أدنين (Adenine) في موقع التباين نفسه لعينات مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى فضلاً عن ظهور هذا التباين في عدد من عينة السيطرة الاصحاء.

كما تشير النتائج المبينة في الشكل (4-3 ب)الى ظهور ثلاثة أنماط من الطرز الوراثية هي الطرز الوراثية البرية غير المتباينة المتجانسة (Non-Polymorphic Homozygous) من نوع (CC)، والطرز الوراثية المتباينة غير المتجانسة (Polymorphic Heterozygous) من نوع (CA)، والطرز الوراثية المتباينة المتجانسة(Polymorphic Homozygous) من نوع (AA)الخاص بتحليل نتائج تتابعات الدنا. بعد ازالة القراءات الخاطئة من طرفي التتابعات تمت مقارنة تتابعات الدنا الخاصة بالمرضى وعينات السيطرة مع التتابع المسجل في قواعد البيانات NCBI والتتابع الخاص بالتغاير rs1800872 وقد اظهرت النتائج وجود التغايرات في كل من عينات المرضى والسيطرة وكما موضح في الشكل (4-3). حيث ظهر التركيب الوراثي المتجانس CC في 4 عينات من أصل 6 عينات كما يبين التركيب الوراثي المتغاير CA و AA لعينة واحدة

فقط كما يوضح ظهور التركيب الوراثي المتجانس CC في 15 عينة من أصل 32 عينة من عينات الدنا المجيني في عينات المرضى المصابين بداء الذئب الاحمراري الذي يصيب المفاصل و 11 عينة تحمل التتابع الوراثي المتغاير CA و 6 عينات تحمل التتابع الوراثي المتغاير AA ، كما يبين الشكل ظهور التركيب الوراثي المتجانس CC في منطقة الحفاز لمجموعة مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى لدى 13 عينة من مجموع 32 عينة بينما ظهر التركيب الوراثي المتباين CA في 15 عينة والتباين الوراثي AA في 4 عينات من عينات الدنا المجيني في التتابع الخاص بالدنا بوجود تغاير وراثي في منطقة الحفاز لجين البين الابيضاضي -10 للمجاميع المدروسة حيث أظهر نتائج التتابع ظهور التباين الوراثي لمنطقة الحفاز عند التركيب الوراثي CA.

من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة في الشكل (4-3 ب) الى أن التباين الوراثي (C > A) في الموقع 206773062 هو من نوع cSNP في معظم عينات السيطرة الاصحاء (66%) في حين كانت من نوع aSNP في عينة مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بنسبة 53% وبفرق معنوي احصائياً ($p< 0.01$) عن نسبتها في عينة السيطرة الاصحاء (33%) وكما مبين في الجدول(4-25). كما بلغت نسبة التباين aSNP في عينة مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى 59% وبفرق معنوي احصائياً ($p< 0.01$) عن نسبتها في السيطرة الاصحاء (33%) مما يشير الى أن التباين الوراثي (A > C) يعد واحداً من عوامل الخطورة للإصابة بداء الذئب الأحمراري في عينة المرضى العراقيين.





الشكل (4-3): الخارطة الوراثية في التعاقب النكليوتيدي لجين البين الابيضاضي -10 .(أ) التعاقب النكليوتيدي مصغر مئات المرات للجين والتعاقب النكليوتيدي لحفاز الجين الذي يتضمن موقع التباين لعينات السيطرة الاصحاء ومرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى .(ب): التعاقب النكليوتيدي لحفاز الجين وموقع التباين لعينات الدراسة المختلفة

4-5 تحديد التركيب الوراثي لجين البين الابيضاضي – 10 في مرض داء الذئب الأحمراري

اعتمدت الدراسة على مقارنة ثلاث مجاميع من الحالات. المجموعة الاولى والثانية شملت المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى على التوالي. بينما شملت المجموعة الثالثة كانت تمثل عينات السيطرة الاصحاء في منطقة الحفاز لجين البين الابيضاضي 10 للتغاير rs1800872 من خلال نتائج التحليل الاحصائيا لتردد الأليلي(Allel freguency) وقد أشارت النتائج الى وجود تغايرات ما بين مجاميع السيطرة والمفاصل والكلى لموقع التباين (C > A) أذ تشير النتائج المبينة في الجدول (4-25) ظهور التركيب الوراثي البري (CC) المتجانس غير المتباين في 15 عينة من مجموعة مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل وبنسبة 46.88% بينما ظهر وجوده في 13 عينة من مجموعة مرضى الكلى وبنسبة 40.63% وبفرق معنوي احصائيا (P<0.01) بينما اظهرت نتائج التحليل الاحصائيا ظهور التركيب الوراثي المتباين غير المتجانس (CA) في 11 عينة من مجموعة مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل وبنسبة 34.38% بينما ظهر التركيب الوراثي غير المتجانس نفسه في 15 عينة من مجموعة مرضى الكلى وبنسبة 46.88% وبفرق معنوي احصائيا(P<0.01) بالمقارنة بـ 16.67% لمجموعة السيطرة الاصحاء. كما بلغت نسبة الطرز الوراثية المتغايرة المتجانسة (AA) في نفس الموقع 18.75% و 12.50% في مجموعتي المفاصل والكلى على التوالي مقارنة بـ 16.67% لمجموعة السيطرة الاصحاء.

تشير هذه النتائج أيضاً الى ارتباط التغايرات الوراثية بداء الذئب الأحمراري كما ان وجود التغاير الوراثي CA في مجموعة الكلى بنسبة اعلى من مجموعة المفاصل مؤشر على ان هذه التغاير الوراثي يمثل عامل من عوامل الخطورة للإصابة بداء الذئب الأحمراري.

جاءت هذه النتائج متطابقة لما توصل اليه Iyer وCheng ،(2012) في دراسة أجريت حول دور البين الابيضاضي-10 في تنظيم التعبير الجيني في الامراض المناعية والالتهابية إذ أشارا في دراستهم الى وجود عدد من التباينات الوراثية في مواقع مختلفة في منطقة الحفاز لجين البين الابيضاضي 10 لدى المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري كما أكدت دراستهما أن وجود

هذه التغايرات تعد عامل من عوامل الخطورة للإصابة بمرض داء الذئب الأحمراري. وفي دراسة أجراها Egger وأخرون، (1997) فقد أشاروا الى ان التباين الوراثي في جين البين الابيضاضي 10 له علاقة بقابلية الاصابة بداء الذئب الأحمراري بالمرض وقد يعود ذلك لكون البين الابيضاضي 10 من البروتينات المثبطة لعمل الخلايا المقدمة للمستضد والخلايا التائية وبالتالي فإنه يؤدي دوراً مهماً في المناعة والعمليات الالتهابية غير المعروفة السبب التي تساهم في تطور أمراض المناعة الذاتية (Wakkach وFournier، 2003).

من ناحية أخرى تشير النتائج المبينة في الشكل (4–3 ب) والجدول (4–25) الى أن التباين الوراثي (A > C) في موقع التغاير 206773062 هو من نوع cSNP في معظم عينات السيطرة الاصحاء (66%) في حين كانت من نوع aSNP في مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل بنسبة 53% وبفرق معنوي احصائياً ($p<0.01$) عن نسبتها في عينة السيطرة الاصحاء (33%). كما بلغت نسبة التباين aSNP في مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى 59% وبفرق معنوي احصائياً ($p<0.01$) عن نسبتها في عينة السيطرة الاصحاء(33%) مما يشير الى أن التباين الوراثي (A > C) يعد واحداً من عوامل الخطورة للإصابة بداء الذئب الأحمراري في عينة المرضى العراقيين المشمولين بالدراسة.

الجدول (4-25): توزيع التراكيب الوراثية والتكرار الاليلي في مرضى داء الذئب الاحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى بالمقارنة مع السيطرة الاصحاء

التركيب الوراثي (Genotype)	مجموعة السيطرة		مجموعة المفاصل		مجموعة الكلى		قيمة مربع كاي
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	
CC	4	66.67	15	46.88	13	40.63	** 8.19
CA	1	16.67	11	34.38	15	46.88	** 9.38
AA	1	16.67	6	18.75	4	12.50	NS 2.925
قيمة مربع كاي	** 11.064		** 10.967		** 10.251		---
التكرار الاليلي							
C	0.64		0.64		0.75		---
A	0.36		0.36		0.25		---

* (P<0.05)، ** (P<0.01)

الاستنتاجات Conclusions

1- عدم تأثر معدل كتلة الجسم بالإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى.

2- عدد الإناث المصابات بمرض داء الذئب الأحمراري اكثر من عدد الذكور في مجموعتي المفاصل والكلى وبفرق معنوي مرتفع .

3- عدم وجود اختلاف معنوي إحصائيا بين أعداد خلايا الدم البيضاء لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة مع السيطرة الاصحاء .

4- لوحظ وجود انخفاض معنوي إحصائيا ($p<0.01$) في أعداد خلايا الدم الحمراء في مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة مع السيطرة الاصحاء وبذلك يعد هذا المؤشر الكيموحيوي من مؤشرات الدم السريرية المصاحبة للإصابة بالمرض.

5- لوحظ وجود انخفاض معنوي إحصائياً ($p<0.01$) في تركيز الهيموغلوبين في عينات الدم المأخوذة من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة تركيزه في عينات الدم السيطرة الأصحاء ، وبذلك يعد هذا المؤشر الكيموحيوي من مؤشرات الدم السريرية المصاحبة للإصابة بالمرض .

6- عدم تأثر أعداد الصفيحات الدموية بالإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى .

7- لوحظ وجود ارتفاع معنوي إحصائيا($p<0.01$) في معدل ترسيب كريات الدم الحمراء في مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بالسيطرة الاصحاء وبذلك يعد هذا المؤشر الكيموحيوي من مؤشرات السريرية المصاحبة للإصابة بالمرض .

8- لوحظ وجود ارتفاع معنوي إحصائياً ($p<0.01$) في تركيز بروتين سي التفاعلي في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى بالمقارنة مع تركيزه في مصل الدم لعينة السيطرة الاصحاء ، وبذلك يعد هذا المؤشر الكيموحيوي من المؤشرات المناعية لتشخيص الاصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى .

9- عدم وجود فرق معنوي إحصائي في تركيز بروتين سي التفاعلي في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل وتركيزه في مصل الدم للسيطرة الاصحاء .

10- لوحظ وجود اختلاف معنوي إحصائيا ($p<0.01$) في تركيز اضداد الدنا المزدوج الخيط في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بتركيزه في مصل الدم لعينة السيطرة الاصحاء ،وبذلك يعتبر هذا المؤشر الكيموحيوي من المؤشرات المناعية لتشخيص الإصابة بالمرض .

11- لوحظ وجود انخفاض معنوي إحصائيا ($p<0.01$) في تركيز المتمم الثالث في مصل الدم لمرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بتركيزه في مصل الدم للسيطرة الاصحاء وبذلك يعتبر هذا المؤشر الكيموحيوي من المؤشرات المناعية لتشخيص الاصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى .

12- لوحظ وجود انخفاض معنوي إحصائيا ($p<0.01$) في تركيز المتمم الرابع في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بتركيزه في مصل الدم للسيطرة الاصحاء وبذلك يعد هذا المؤشر الكيموحيوي من المؤشرات المناعية لتشخيص الاصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى .

13- ظهور الاجسام المضادة للجسيم النووي وأضداد سميث وأضداد السنترومير والاجسام المضادة لمستضد متلازمة سوغرين من النوع SS-A/Ro60 والاجسام المضادة لمستضد بروتين الحامض النووي الرايبوزي الصغير والاجسام المضادة للمستضد Mi-2 والاجسام المضادة لمستضد Ku وأضداد الهستون في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى ، وعدم ظهور اي من هذه الاجسام المضادة في مصل الدم للسيطرة الاصحاء ، وبذلك يعتبر ظهور هذه الاجسام المضادة في مصل الدم من المؤشرات المناعية المصاحبة للإصابة بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى .

14- ظهور الاجسام المضادة لمستضدي متلازمة سوغرين من النوع SS-A/Ro52 والنوع SS-B/La في مصل الدم لمرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل من المؤشرات المناعية المصاحبة للإصابة بالمرض .

15- شدة الاصابة (فعالية المرض) بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى كانت أكثر من شدة الاصابة بالمرض الذي يصيب المفاصل في عينة المرضى المشمولين بالدراسة مقارنة بانعدام فعالية أو شدة المرض في عينة السيطرة الاصحاء لعدم تعرضهم للإصابة بالمرض.

16- أن التباين الوراثي في جين الانترلوكين -10 في الموقع 206773062 هو من نوع aSNP بنسبة 53% و59% من مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى على التوالي مقارنة بـ cSNP بنسبة 66% في عينة السيطرة الاصحاء وبفرق معنوي إحصائيا($p<0.01$) .

17- لوحظ وجود نوعين من الطرز الوراثية في موقع التباين لجين الانترلوكين -10 في مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى وهما كل من الطراز الوراثي غير المتجانس (CA) والطراز الوراثي (AA) مقارنة بالطراز الوراثي المتجانس (CC) لعينة السيطرة الاصحاء (النوع البري).

18- تعد الطرز الوراثية غير المتجانسة المتباينة وراثياً من النوع (CA) أكثر سيادة من الطرز الوراثية المتجانسة المتباينة وراثياً من النوع (AA) في مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى .

19- نسبة الطرز الوراثية غير المتجانسة المتباينة وراثياً من النوع (CA) في مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى كانت أكثر من نسبتها في مرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل .

20- نسبة الطرز الوراثية المتجانسة المتباينة وراثياً من النوع (AA) في مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل كانت أكثر من نسبتها في مرضى داء الذئب الأحمراري الذي يصيب الكلى.

21- حدوث التباين الوراثي A< C في موقع التباين 206773062 (rs:1800872) لجين الانترلوكين -10 يعد أحد عوامل الخطورة للإصابة بداء الذئب الأحمراري لعينة المرضى العراقيين المشمولين بالدراسة .

التوصيات Recommendations

1- دراسة التعبير الجيني لجين أنترلوكين – 10 في مرض داء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى مقارنة بنمط التعبير الجيني في السيطرة الأصحاء.

2- التحري عن التباين الوراثي أحادي النكليوتيدة في المواقع الجينية الاخرى لجين الانترلوكين – 10 (مناطق الاكسونات و الانترونات و المقاطع غير المترجمة للجين) وعلاقتها بالإصابة بداء الذئب الأحمراري.

3- التحري عن التباين الوراثي أحادي النكليوتيدة في المواقع الجينية الاخرى التي قد يكون لها علاقة بالإصابة بالمرض .

4- دراسة العلاقة بين نمط الطرز الوراثية في مواقع التباين ودرجة الإصابة بالمرض أو شدتها.

5- تحديد العلاقة بين التباين الوراثي في الجينات المختلفة والمؤشرات المناعية ومؤشرات الدم السريرية المصاحبة للإصابة بالمرض .

6- دراسة التأثيرات الهرمونية الأنثوية على المؤشرات السريرية المتعلقة بالإصابة بداء الذئب الأحمراري .

References:

A

- **Abdallah, E.; Waked, E.; Abdelwahab, M.; (2016).** Evaluating the association of interleukin-10 gene promoter -592 A/Cpolymorphism with lupus nephritis susceptibility. Kidney Res Clin Pract 35 (2016) 29-34.
- **Acosta, J.; Qin, X.; and Halperin, J. (2004).** Complement and complement regulatory proteinsas potential molecular targets for vascular disease. Curr.Pharm. Des., 10: 203-211.
- **Alarcon, G.S.; McGwin, G.; Bertoli, A. ; Fessler, B. ; Calvo-Alén J. and Bastian, H. (2007)**. Effect of hydroxychloroquine on the survival of patients with systemic lupus erythematosus: data from Lumina, a multiethnic US cohort (LUMINAL) . Ann Rheum Dis., 66(9): 1168–1172.
- **Al-Bakaa, H.A. and Abdalrudha,A. S.(2008).** Effect of Dexamethasone administration on leukocyte migration in femal patients with Systemic Lupus Erythematosus. AL-Qadisiya J. Vet. Med. Sci. 7(1).
- **Ali, E. ; Issa, A. ; Hammadi, S. and Hussain, M.(2014).** Elevated Levels of IL- 6 in serum of SLE patients correlated with High- sensitivity CRP and ESR. Basrah Journal of S cience (B) .32(2): 112-136.
- **Arbuckle, M. ; McClain, M. ; Rubertone, R. ; Scofield, G. ; Dennis, J. ; James, J. and Harley. (2003)**. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. N Engl. J Med., 349 :1526-1533.
- **Azizoddin, D. ; Olmstead, R. ; Cost, C. ; Jolly, M. ; Ayeroff, J. ; Racaza, G. ; Sumner, L. and Nicassio, P.(2017).** Multi-group confirmatory factor analyses of the LupusPRO between southern California and Filipino samples of patients with systemic lupus erythematosus . Lupus 0, 1–8.

B

- **Bain, BJ; Lewis, S M. ; Dacie, J V.(2012).** Dacie and Lewis practical haematology. [Edinburgh] : Elsevier Churchill Livingstone, Print book : English : 11th.

- **Belizna, C. ; Henrion, D. ; Beucher, A. ; Lavigne, C. ; Ghaali, A. and Levesque, H.(2010).** Anti-Ku antibodies: Clinical, genetic and diagnostic insights. Autoimmune. Rev., 9: 691–69.
- **Benjamini, E. ; Coico, R. and Sunshine, G.(2000).** Immunology: A Short Course. 4th Ed.Wiley-Liss, Inc. USA.
- **Bertsias, G. ; Ioannidis, J. and Aringer, M. (2010b).** EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestations: report of a task force of the EULAR standing committee for clinical affairs. Ann. Rheum. Dis.,69:2074–82.
- **Bertsias, G. ; Salmon, J. and Boumpas, D. (2010a).** Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: state of the art and prospects for the new decade. Ann. Rheum. Dis.,69:1603–11.
- **Bizzaro , N.; Villalta, D.; Giavarina, D. and Tozzoli R.(2012).** Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker thananti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and astudy of metanalysis. Autoimmunity Reviews, 12 : 97–106.
- **Boddaert, J.; Huong, D. and Amoura, Z .(2004).** Late-onset systemic lupus erythematosus: a personal series of 47 patients and pooled analysis of 714 cases in the literature. Medicine (Baltimore), 83(6):348–359.
- **Boteva, L.; Morris, D.; and Cortes-Hernandez, J. (2012).** Genetically determined partial complement C4 deficiency states are not independent risk factors for SLE in UK and Spanish populations. Am J Hum Genet;90:445–56.
- **Brahms, H.; Raker, V.; Van Venrooij, W. and Luhrmann, R.(1997).** Amajor novel systemic lupus erythematosus autoantibody class recognizes the E, F, and G Sm snRNP proteins as an E-F-Gcomplex but not in their denatured states. Arthritis Rheum. ,40(4):672–682.
- **Bryan, A. and Wu E. (2014).** Complement deficiencies in systemic lupus erythematosus. Curr. Allerg. Asthm. Rep., 14:448.

C

- **Chai, H. ; Phipps, M. and Chua, K. (2012) .** Genetic Risk Factors of Systemic Lupus Erythematosus in the Malaysian Population: A Minireview. Clinical and Developmental Immunology. Article ID 963730, 9 pages .
- **Chen, M.; Daha, M. and Kallenberg C.** (**2010).** The complement system in systemic autoimmune disease. J. Autoimmune,34:J276–86.
- **Compagno, M.; Rekvig, O.; Bengtsson, A.; Sturfelt, G.; Heegaard, N. H.; Jonsen, A.; Jacobsen, R.; Eilertsen, G.; Fenton, C. and Truedsson, L. (2015).** Clinical phenotype associations with various types of anti-dsDNA antibodies in patients with recent onset of rheumatic symptoms. Results from a multicentre observational study others.Lupus science and medicine 2014,1,e000007. doi:10.1136/lupus-2013-000007 .
- **Conde, S.; Feitosa, R.; Freitas, F.; Hermes, R.; Demachki, S.; Araujo, M.; Soares, M.; Ishak, R. and Vallinoto, A. (2013).** Association of cytokine gene polymorphisms and serum concentrations with the outcome of chronic hepatitis B. Cytokine, 61:940-944.
- **Conrad K.(2002).** Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases-A Dignosticr Reference; pabst science publishers, lengerich.Berlin,Riga, Rom,Viernheim,Wien,Zagreb,2002. NLM ID: 101182698 [Book].
- **Contran, R.; Kumar, V. and Robbins, S.(1989).** Robbins pathologic Bases of Disease .4th Ed. W.B .Saunders Co. Philadelphia. pp: 193-194.
- **Cope, A., LeFriec, G., Cardone, J. and Kemper, C. (2011).** The Th1 life cycle: molecular control of IFN-γ to IL-10 switching. Trends Immunol., 32: 278-286.
- **Crispin, J. and Tsokos, G. (2010).** IL-17 in systemic lupus erythematosus. J. Biomed. Biotechnol., Article ID 943254, 4 pages http://dx.doi.org/10.1155/2010/943254.
- **Crispin, J.; Hedrich, C. and Tsokos, G.(2013).** Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. Nat. Rev. Rheumatol. ,9: 476–484.

D

- **Dai, C.; Chuang, W. and Lee, L. (2008).** Association between transforming growth factor–beta 1 polymorphism and virologic characteristics of chronic hepatitis C. Transplant Res., 152:151-156 .

- **Danchenko, N., Satia, J. and Anthony M. (2006).** Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. Lupus, 15: 308-318 ..
- **Danowski, A.; Magder, L. and Petri, M. (2006).** Flares in lupus: Outcome Assessment Trial (FLOAT), a comparison between oral methylprednisolone and intramuscular triamcinolone. J. Rheumatol. ,33:57–60.
- **Das, A.; Ellis, G.; Pallant, C.; Lopes, A.R.; Khanna, P. and Peppa, D. (2012).** IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. J. Immunol., 189:3925-3935.
- **D'Cruz, D.; Khamashta, M. and Hughes, G.(2007).** Systemic lupus erythematosus. Lancet, .369(9561):587-96.
- **Deapen, D.; Escalante, A. and Weinrib, L. (1992).** A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus, Arthrit . Rheumat., 35(3): 311-318.
- **Delgado-García, G.; Galarza-Delgado,D.; Colunga-Pedraza, I.; Borjas-Almaguer,O.; Mandujano-Cruz, I. Benavides-Salgado, D. Martínez-Granados, R. and Atilano-Díaz, A.(2016).** Mean platelet volume is decreased in adults withactive lupus disease. Rev. Bras. Reumatol . ,56 (6):504-508.
- **Dema, B. and Charles, N.(2014).** Advances in mechanisms of systemic lupus erythematosus. Discov. Med., 17:247–255.
- **Denise, RF.; Juliana, B.; Fatima, RM.; Risoneide,B.; and Freddy,G.(2014).** Starting glargine in insulin-naïve type 2 diabetic patients based on body mass index is safe. World J Diabetes. 15; 5(1): 69–75.
- **Dias, A.; Do-Couto M.; Duarte, C.; Ines, L. and Malcata, A. (2009)**. White blood cell count abnormalities and infections in one-year follow-up of 124 patients with SLE. Ann. N Y Acad. Sci. 1173:103–107.
- **Dieker, J.; Tel, J. Pieterse, E.; Thielen, A.; Rother, N. and Bakker M.(2016).** Circulating apoptotic microparticles in SLE patients drive the activation of DC subsets and prime neutrophils for NETosis. Arthritis Rheumatol.,68: 462–72. doi: 10.1002/art.39417. Pubmid:26360137.

- **Dima, A.**; **Opris, D.**; **Jurcut, C. and Baicus, C.(2016).** Is there still a place for erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in systemic lupus erythematosus? Lupus 25(11: 1173-1179).
- **Doan, T.; Melvold, R.; Viselli, S. and Waltenbaugh, C. (2008).** Lppincotts IIIustrated Review: Immunology, Lippincott Williams and Wilkins, pp 67.

E

- **Egger, M.; Smith, G. and Phillips, A. (1997).** Meta-analysis: principles and procedures. Brit.Med.J 315: 1533–1537.
- **Eisenberg, RA; Thor,LT and Dixon, FJ .(1990).** Serum-Serum Interactions in Autoimmune Mice.Arthrit. Rheum., 22: 1074-1081.
- **Elizabeth, KE.; Krishnan, V. and Vijayakumar T. (2008).** Umbilical cord blood nutrients in low birth weight babies in relation to birth weight and gestational age. Indian J. Med. Res. 128(2):128-33.
- **Eriksson, C.; Kokkonen, H, and Johansson, M. (2011).** Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. Arthritis Res. Ther.,13:R30.
- **Espinosa, A.; Hennig, J. and Ambrosi, A. (2011).**Anti-Ro52 autoantibodies from patients with Sjogren's syndrome inhibit the Ro52 E3 ligase activity by blocking the E3/E2 interface. J. Biol. Chem., 286: 36478–36491.

F

- **Fakanya, W. and Tothill, I. (2014).** Detection of the inflammation biomarker C-Reactive Protein in serum sample : towards an optimal biosensor formula. Bio. J. 2(1) : 340-357.
- **Fang, F.; Yu, L.; Zhong, Y. and Yao, L. (2010).** TGFB1 509 C/T polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis. Medicine, 27:1324-1328.
- **Fareed, M. and Afzal, M. (2013).** Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service. Egypt, J. Med. Hum. Genet., 14:123-134.

- **Farhat, S.; Silva, C.; Orione M.; Campos, L.; Sallum, A.; and Braga, A.(2011).** Air pollution in autoimmune rheumatic diseases:a review. Autoimmune Rev.,11(1):14-21.
- **Fatima,D.andArumugam,N.(2014)**.Immunology.Saras publication, Kanayakumari ,India: 686.
- **Feng, J.; Ni, J.; Yao, X.; Pan, H.; Li, X.; Xu, J. Pan, F. Xu, S. and Ye, D. (2010).** Gender and age inXuence on clinical and laboratory features in Chinese patients with systemic lupus erythematosus :Rheum.30:1017-1023.
- **Fernández, M.; Alarcón, G.; Apte, M. Andrade R.; ViláL, M. and Reveille, J. (2007)**. Systemic lupus erythematosus in amultiethnic UScohort: XLIII. Thesignifi-cance of thrombocytopenia as a prognostic factor. Arthritis Rheum.,56:614–21.
- **Ferucci, E.; Johnston, J.; Gaddy, J.; Sumner, L.; Posever, J.; Choromanski, T.; Gordon, C.; Lim, S. and Helmick, C. (2014).** Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in a population-based registry of American Indian and Alaska Native people, 2007-2009. Arthritis Rheumatol., 66(9):2494-250.
- **Firooz, N.; Albert, D.; Wallace, D.; Ishimori, M.; Berel, D. and Weisman, M. (2011).**High-sensitivity C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in systemic lupus erythematosus. Lupus.,20:588–97.
- **Franceschini, F. and Cavazzana, I. (2005).** Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies. Autoimmunity, 38(1): 55–63.
- **Fransen, J H.; Vlag, J v.; Ruben, J.; Adema, GJ.; Berden, JH.; and Hilbrands, LB.(2010).** The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther. 12(2): 207.

G

- **Gabay, C.; Roux-Lombard, P. and De Moerloose P.(1993).** Absence of correlation between interleukin 6 and C-reactive protein blood levels in systemic lupus erythematosus compared with rheumatoid arthritis. J. Rheumatol ,20:815-21.
- **Gambhir, M.; Basanez, M-G.; Blake, IM. and Grassly NC. (2010).** Modelling Trachoma for Control Programmes, Modell Parasite Transmiss and Contr, 673:141-156.

- **Gasparyan, AY.; Ayvazyan, L.; Mikhailidis, DP, and Kitas GD.(2011).** Meanplatelet volume: a link between thrombosis and inflammation? Curr Pharm Des ,17:47–58.
- **George, A.; Wong-Pak, A.; Peschken, Ch A. ; Silverman, E.; Pineau, Ch.; Smith, CD.; Arbillaga, H.; Zummer, M.; Bernatsky, S.; Hudson, M .; Hitchon, C .; Fortin, P R.; Nevskaya, T .and Pope, J E.(2017).** Influence of Education on Disease Activity and Damage in Systemic Lupus Erythematosus: Data From the 1000 Canadian Faces of Lupus. Arthritis Care and Research : 69(1), pp 124–132. DOI 10.1002/acr.22922.
- **Ghirardello, A.; Zampieri, S.; laccarino, L.; Tarricon, E.; Bendo, R.; Gambari, PF. and Doria, A.(2005).** Anti-Mi-2 antibodies. Autoimmunity., 38(1):79-83.
- **Giannouli, S.; Voulgarelis, M.; Ziakas, PD. and Tzioufas, AG.(2006).** Anaemia in systemic lupus erythematosus: from pathophysiology to clinical assessment. Ann Rheum Dis. ,65(2):144-8.
- **Gladman, DD.; Hussain, F. and Ibanez, D.(2002).**The nature and outcome of infection in systemic lupus erythematosus. Lupus., 11:234 Y239.
- **González, LA.; Toloza, SM. and Alarcón GS. (2014):** Impact of race and ethnicity in the course and outcome of systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am., 40(3):433-454.
- **González-Naranjo,LA.; Betancur,OM.; Alarcón,GS.;Macr,MD.; Ugarte-Gil,MF.; Jaramillo-Arroyave,D.; Wojdyla,D.; Pons-Estel,G.; Rondón-Herrera,F.; Rondón-Herrera,GM.; Quintana-López,GD.; Silva,NA.; Tavares-Brenol,GC.; Reyes-Llerena,G.; Pascual-Ramos, V.; Amigo,MC.; Massardo,L.; Alfaro-Lozano,J.; Segami, MI.; Esteva-Spinetti, MH.; Iglesias-Gamarra, A. and Pons-Estel, BA .(2015)**. Features associated with hematologic abnormalities and their impact in patients with systemic lupus erythematosus: Data from a multiethnic Latin American cohort. No.52-21.
- **Gormezano, NWS.; Kern,D.; Pereira,OL.;E steves, GCX.; Sallum, AME.; Aikawa,NE.; Pereira, RMR;. Silva,CA. and Bonfa, E.(2016).´** Autoimmune hemolytic anemia in systemic lupus erythematosus at

diagnosis: differences between pediatric and adult patients. Lupus,26(4) :426- 430.

- **Grosr, P. ; Milder F.j. and Janssen, B.J. (2008).** Complement driven by conformational changes. Nat. Rev. Immunol; 8:48-58.
- **Gullstrand, B.; Lefort, MH. and Tyden, H. (2012).** Combination of autoantibodies against different histone proteins influences complement-dependent phagocytosis of necrotic cell material by polymorphonuclear leukocytes in systemic lupus erythematosus.J.Rheumatol., 39:1619–27.

H

- **Hagen,JP.; Muller,PC.; Bredius,RG, and Cate,R.(2013).** Low complement levels in paediatric systemic lupus erythematosus and the risk of bacteraemia.Brit.Med J., Case Rep. doi:10.1136/bcr-2013-010378.
- **Hill, CE. (2011).** Nucleic acid isolation: overview of sample preparation methods: 119-125. In D.H. Persing (ed.), Molecular microbiology: diagnostic principles and practices, 2nd ed. ASM Press,Washington, DC.
- **Hochberg,MC.(1997).** Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum .40: 1725.
- **Hollegaard, M. V. and Bidwell, J. L. (2006).** Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. Genes Immun., 7:269-276.

I

- **Ingle, P. and Patel, D. (2011).** C-Reactive Protein in Various Disease Condition-An Overview. Asian J. Pharm. Clin. Res., 4(1) : 1-5 .
- **Ippolito, A.; Wallace, D.J.; Gladman, D.; Fortin, P.R.; Urowitz, M.; Werth, V.; Costner, M.; Gordon, C.; Alarcón, G.S.; Ramsey-Goldman, R.; Maddison, P.; Clarke,A.; Bernatsky, S.; Manzi, S.; Merrill, J.T.; Ginzler,E.; Hanly, J.G.; Nived, O.; Sturfelt, G.; Sanchez-Guerrero, J.; Bruce, I.; Aranow, C.; Isenberg, D.; Zoma,**

A.; Magder, L.S.; Buyon, J.; Kalunian, K.; Dooley, M.A.; Steinsson, G.; Vollenhoven,R.F.; Stoll, T.; Weisman, M. and Petri, M.(2011). Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity.Lupus.,20,250–255.DOI: 10.1177/0961203310385738.

- **Islam, L.N. ; Hossain, M. and Shamim, H.Z. (2006).** Complement mediated bactericidal activity and humoral immune respone in type 2 diabetes mellitus. Int. J. Diab. Metab; 14:92-97.
- **Iyer S.S, and Cheng G. (2012).** Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. Crit. Rev. Immunol . 32: 23–63.

J

- **Jaekel, H.P.; Klopsch, T.; Benkenstein, B.; Grobe, N.; Baldauf A,and Schoessler, W. (2001).** Reactivities to the Sm autoantigenic complex and the synthetic SmD1‐aa83‐119 peptide in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. J Autoimmun.,17: 347‐54. doi: 10.1006/ jaut.2001.0545.
- **Jean, L. ; Bolongia, M.D. ; Joseph, L. ; Jorizzo and Julie, V. (2012).** British Library Cataloguing in Puplication Dermatology, 3rd(Ed). Ebook Dermatology. 1:1-2561.
- **Jiang, P.; Bian, M.; Ma, W.; Liu, Ch.; Yang, p.; Zhu,B.; Xu, Y.; Zheng,M.; Qiao, J.; Shuai, Z.; Zhou, X.; and Huang, D.(2016).** Eryptosis as an Underlying Mechanism in Systemic Lupus Erythematosus-Related Anemia**.** Cell Physiol Biochem ., 40:1391-1400.
- **Johnson, A.D., Wang, D. and Sadee,W. (2005).** Polymorphisms affecting gene regulation and mRNA processing: broad implications for pharmacogenetics. Pharmacol Ther., 106:19-38.
- **Johnson, H.L.; Chiou C.C .; and Cho C.T .(1999).**Application of acute phase reactants in infectious diseases J. Microbiol.Immunol.Infect. 32(2):73-82 (1999).
- **Jonsson,G.; Sjoholm.A.G. and Truedsson, L.(2007).** Rheumatological manifestations, organ damage and autoimmunity in hereditary C2 deficiency. Rheumatology, 46:1133–9.

K

- **Kakati, S.; Doley, B. and Sarma, P.k . (2003)**. C – Reactive Protein In Systemic Lupus Erythematosus. J. Indian Rheumatol Assoc ., 11 : 66 – 70.
- **Karpouzas, G.A.(2013)**. Hematological and Lymphoid Abnomalities in SLE. In: Wallace DJ, Hahn BH, eds. DUBOIS' Lupus erythmatosus and Related Syndomes. 8th edn. Philadelphia: Elsevier 426–37.
- **Kattah, N. H., Kattah, M. G. and Utz, P. J. (2010).** The U1-snRNP complex: structural properties relating to autoimmune pathogenesis in rheumatic diseases. Immunol. Rev:. 233: 126–145.
- **Katz, U. and Zandman-Goddard, G. (2010).** "Drug-induced lupus: an update".Autoimmunity reviews. 10 (1): 46–50 .
- **Kaufmann, S.H.E. ; Rouse, B.T. and Sacks, D.L.(2011).** The Immune Response to Infection. ASM Press; 17: 85-93.
- **Kaur, G. and Mehra,N.(2012).**Cytokine gene polymorphisms: methods of detection and biological significance. Methods Mol Biol. ,882:549-68. doi: 10.1007/978-1-61779-842-9_31.
- **Kim, k. ; Kim, B.M. ; Moon, H.W. ; Lee, S.H. and Kim, H.R**. (2015). Role of C-Reactive Protein in osteoclastogenesis in rheumatoid. arthritis , Arth.Res, J; 6(1) : 17-41.
- **Kolse, A. ; Wenede, E. ; Wareham, K.J. and Monk, P.N. (2013).** International Vnion of pharmacology Complement peptide C5a , C4a and C3a receptors pharmaco. Rev., 65(1): 500-543.
- **Kozora, E.;Filley, C.M.; Zhang, L.; Brown, M.S.; Miller, D.E.;Arciniegas, D.B.; Pelzman, J.L; West, S.G.(2012).** Immune function and brain abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus without overt neuropsychiatric manifestations. Lupus ., 21:402-11.
- **Krishnamurthy S. and Mahadevan S. (2011):** Definition and etiology of acute kidney injury in children. Indian Pediatr., 48(9):744 .
- **Kumar, Y.; Bhatia, A. and Minz, R.W. (2009).** Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. Diagnostic Pathology : 4:1 .doi:10.1186/1746-1596-41.

- **Kvarnstrom, M.; Dzikaite-Ottosson, V.; Ottosson, L.; Gustafsson, J.T.; Gunnarsson, I.;Svenungsson, E. and Wahren-Herlenius,A. (2013).** Autoantibodies to the functionally active RING-domain of Ro52/SSA are associated with disease in patients with lupus. Lupus ., 22, 477–485.

L

- **Lawrence ,MT ; Stephen, J.M and Maxine A.P.(1996).**Current Medical Diagnosis and Treatment. 35th Ed.Appleton & langg , Stanford, CT. pp:742-754.
- **Leader, A.; Pereg,D.; Lishner,M.(2012).** Are Platelet Volume indices of clincal use ? A multidisciplinary review. Ann Med.44:805-16.
- **Lee, H.; Kim, T.; Bang, S.; Young, Ji. Na.; Kwangwoo Kim,Jae-Kim, H., Chung, Y.;Shin, Y.; Kang, Y.; Shim, S.; Suh, C.; Park, Y.; Kim, J.; Kang, C. and Bae S. (2014):** Ethnic specificity of lupus-associated loci identified in a genome-wide association study in Korean women. Ann Rheum Dis., 73:1240-1245.
- **Lee, H.S. and Bae SC. (2015).** Recent advances in systemic lupus erythematosus genetics in an Asian population. Int J Rheum Dis., 18(2):192-199.
- **Lee, H.S. and Bae, S.C. (2010)**. What can we learn from genetic studies of systemic lupus erythematosus? Implications of genetic heterogeneity among populations in SLE, Lupus, 19(12):1452-1459.
- **Leffler, J.; Bengtsson, A.A. and Blom, A.M**.(2014). The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. Ann Rheum. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205287.
- **Leone, A.; Sciascia, S.; Kamal, A.; Khamashta, M.** (2015).Biologicals for the treatment of systemic lupus erythematosus: Current status and emerging therapies. Expert. Rev. Clin. Immunol., 11, 109–116 .
- **Lertchaisataporn, K.; Kasitanon, N.; Wangkaew,S.;Pantana,S.** ; **Sukitawut, W. and Louthrenoo,W.(2013).** An Evaluation of the Association of Leukopenia and Severe Infection in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. Clin Rheumatol .,19: 115-120.

- **Li, T.; Prokopec, S.D.; Morrison, S.; Lou, W.; Reich, H.; Gladman, D.; Urowitz, M.; Scholey, J.; Fortin, PR.; Boutros, P.C.; Wither, J. and Landolt - Marticorena,A.(2015).** Anti-nucleosome antibodies outperform traditional biomarkers as longitudinal indicators of disease activity in systemic lupus erythematosus. Rheumatology ., 54:449_457. doi:10.1093/rheumatology/keu326.
- **Li,W.; Li,H.; Song,W.; Hu,Y.; Liu,Y.; Rong, D.A.; Chen,X.; LI,Y;. Ling,H.; Zhong,Z. and Zhang,F.(2013).** Differential diagnosis of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis with complements C3 and C4 and C-reactive protein Experimental And Therapeutic Medicine 6: 1271-1276, 2013. DOI: 10.3892/etm.2013.1304.
- **Liu, CC.; Manzi, S.and Ahearn, JM.(2005).** Biomarkers for systemic lupus erythematosus: a review and perspective. Curr Opin Rheumatol .,17:543_9.
- **Liu, P.; Songm J.; Su, H.; Li, L.; Lu, N.; Yang, R. and Peng Z. (2013).** IL-10 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. 8(7): e69547.
- **Llorente, L.Y.; Richaud-Patin, J; Couderc, D.; Alarcon-Segovia, R.; Ruiz-Soto,N.; Alcocer-Castillejos, J.; Alcocer-Varela, J.; Granados, S.; Bahena, P.; Galanaud, and D. Emilie. (1997).** Dysregulation of interleukin-10 production in relatives ofpatients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum., 40:1429.
- **Lloyd, P.; Doaty, S. and Hahn, B.H. (2016).** Systemic Lupus Erythematosus.OxfordUniversityPress:1006.10.1093/med/9780198739180.003.0002.
- **Longhi, R.; Zembrzuski, V.; Basta, P. and Croda, J.** (2013). Genetic polymorphism and immune response to tuberculosis in indigenous populations: a brief review. Braz J Infect Dis., 17:363-368.

M

- **Mahler, M. and Fritzler, M. (2010).** Epitope specificity and significance in systemic autoimmunediseases. Ann .NY Acad. Sci.1183:267–87.

- **Mahler, M.; Meroni, P.; Bossuyt, X. and Fritzler, M. (2014).** Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. J. Immunol. Res.; 315-179.
- **Mahler, M.; Swart, A.; Wu, J.; Szmyrka-Kaczmarek, M.; Seneca, J.; Troyanov, Y.; Hanly, J. and Fritzler, M. (2016).** Clinical and serological associations of autoantibodies to the Ku70/Ku80 heterodimer determined by a novel chemiluminescent immunoassay. Lupus. ,25, 889–896.
- **Maniatis , T.; Fritsch, E. F. and Samboork, J. (1982) .** Molecular cloning : Alaboratory Manual . Cold spring Harbor Laboratory . New York, 458pp.
- **Manolios, N. and Schrieber, L. (1997) .** Systemic Lupus Erythematosus In: Bradley, J. McCluskey, J. "Clinical Immunology". Oxford Univ. Press. pp: 329-345.
- **Marks, S.; Shah, V. and Pilkington, C. (2010).** Urinary monocyte chemoattractant protein-1 correlates with disease activity in lupus nephritis . Pediatr. Nephrol. 25:2283–2288.
- **Marossy, P.; Svorc, I.; Kron and Gresova, S. (2009).** Hemorheology and circulation, Clin. Hemorheol. Microcirc. 42(4), 239–258.
- **Mehta,T.(2006).**Promoting ALA as a source of omega-3.*Can. Fam.* Physician, 10; 52(10): 1205-1206.
- **Mierau, R.; Moinzadeh, P. and Riemekasten, G.(2011).** Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of theGerman Network for Systemic Scleroderma: Correlation with characteristic clinical features. Arthritis. Res. Ther. 13: R172.
- **Migliorini, P.; Baldini, C.; Rocch, V. and Bombardier, S.(2005)**. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. Autoimmunity, 38(1): 47–54.
- **Mikdashi, J. and Nived, O. (2015)**. Measuring disease activity in adults with systemic lupus erythematosus: the challenges of administrative burden and responsivenessto patient concerns in clinical research. Arthritis Research and Therapy, 17:183.
- **Mitchell, L.; Gao, J.; Wal, R.; Gigliotti, A.; Burchiel, S. and McDonald, J. (2007)**: Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. Toxicol. Sci.;100(1):203-14.

- **Mohan, C. and Putterman, C. (2015):** Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. Nature. Rev. Nephrol., 11,329-341.
- **Mok, C.C.; Lanchbury, J.S.; Chan, D.W. and Lau C. S. (1998).** Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus.Arthritis Rheum. 41:1090.
- **Monneaux, F.; Lozano, J.; Patarroyo, M.; Briand, J. and Muller, S. (2003).** T cell recognition and therapeutic effect of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MR/lpr mice. Eur. J. Immunol. 33(2):287–296.
- **Moore, K.; O'Garra, A.; de Waal, M.; Vieira, P. and Mossman, T. (1993):** Interleukin-10. Annu. Rev. Immunol., 11:165-190.
- **Muravyov, A.; Tikhomirova, I.; Maimistova, A. and Bulaeva, S. (2009)**. Extra- and intracellular signaling pathways under red blood cell aggregation and deformability changes . Clinical Hemorheology and Microcirculation 43 , 223–232.
- **Murphy, G. and Isenberg, D. (2013).** Effect of gender on clinical presentation in systemic lupus erythematosus. Rheumatology; 52: 2108–2115.

N

- **Nadeem, A.; Mumtaz S.; Naveed, A.; Aslam, M.; Siddiqui, A.; Lodhi, G. and Ahmad, T. (2015):** Gene-gene, gene-environment, gene-nutrient interactions and single nucleotide polymorphisms of inflammatory cytokines. World J. Diabetes, 15;6(4):642-647 .
- **Nath, N.; Chattopadhyay, M.; Rodes, D.; Nazarenko, A.; Kodela, R. and Kashfi, K. (2015).** Nitric Oxide-Releasing Aspirin Suppresses NF-KB Signaling in Estrogen Receptor Negative Breast Cancer Cells in Vitro andinVivo.Molecules,20(7):12481-99.doi: 10.3390/molecules200712481.
- **Nesargikar, P.; Spiller, B. and Chavez, R. (2012)**. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. Eur. J. Microbiol. Immunol. 2(2): 103–11.

- **Ning, S.; Zhao, Z.;Ye, J.; Wang, P.; Zhi, H.; Li, R.; Wang, T. and Li, X.(2014).** Link SNP: a database of linking disease-associated SNPs to human large intergenic non-coding RNAs. BMC. Bioinformatics.,15:152.

O

- **Oeser, A.; Chung, C. and Asanuma, Y.(2005).** Obesity is an independent contributor to functional capacity and inflammation in systemic lupuserythematosus. Arthritis Rheum,11:3651–3659.

P

- **Patra, S.; Krishnamurthy, S.; Seth, A.; Beri, S. and Aneja, S. (2011):** "Bilateral optic neuritis in pediatric systemic lupus erythematosus with antiphospholipid antibody syndrome," Indian Journal of Pediatrics, 78(2): 234-236.
- **Patsinakidis, N.; Gambichler, T.; Lahner, N.; Moellenhoff, K. and Kreuter, A. (2016).** Cutaneous characteristics and association with antinuclear antibodies in 402 patients with different subtypes of lupus erythematosus. European Academy of Dermatology and Venereology. DOI: 10.1111/jdv.13769.
- **Peacman, M. and Vergani, D. (1997).** Basis and Clinical Immunology. Churchill Livingstone,UK. pp:163-182.
- **Peene, I.; Meheus, L.; Veys, E. and De Keyser, F. (2002).** Diagnostic associations in a large and consecutively identified population positive for anti-SSA and/or anti-SSB: the range of associated diseases differs according to the detailed serotype. Ann. Rheum. Dis. 61: 1090-1094.
- **Peter, M.; Kim, M. and Kalunian, K. (2005).** Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. N. Engl. J. Med.;353:2550-8.
- **Petri, A.; Orbai, G. and Alarcon, (2012)**. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus, Arthritis Rheum. 64 : 2677–2686.

- **Poulsen, N.; Pedersen, M.; Ostergaard, J.; Petersen, N.; Nielsen, C.; Heegaard, N. and Jensen, H. (2016).** Flow-Induced Dispersion Analysis for Probing Anti-dsDNA Antibody Binding Heterogeneity in Systemic Lupus Erythematosus Patients: Towards a New Approach for Rapid Diagnosis and Patient Stratification Cases. Rheumatol. Int. 30:1017–1023.

ℝ

- **Rahman, A. and Isenberg, D.A. (2008).** Systemic Lupus Erythematosus. N Engl. J. Med., 358 (9): 929-939.
- **Rai, G.; Ray, S. and Shaw, RE.,(2006)**. Models of systemic lupus erythematosus:developmentof autoimmunity following peptide immunization of noninbred pedigreed rabbits. J Immunol 2006; 176:660–667.
- **Rao, L.; Liu, G.; Li, C.; Li, Y.; Wang, Z.; Zhou, Z.; Tong, S. and Wu, X. (2013).** Specificity of anti‑SSB as a diagnostic marker for the classification of systemic lupus erythematosus. Experimental and Therapeutic Medicine. 5: 1710-1714.
- **Recasens, M.; Leung, S.; Grimm, S.; Nowak, R.; Escera, C.; Rekvig, O. and Nossent, J. (2005).** Anti-double-stranded DNA antibodies, nucleosomes, and systemic lupus erythematosus: Arthritis & Rheumatism ., 48. (2), pp 300–312.
- **Rekvig, O.; Putterman, C.; Casu, C.; Gao, H.; Ghirardello, A. and Mortensen, E. (2012).** Autoantibodies in lupus: culprits or passive bystanders. Autoimmune Rev.;11: 596-603.
- **Respaldiza, N.; Wichmann, I.; Ocana, C.; Garcia-Hernandez, F.; Castillo, M.; Magarino, M.; Magarino, R.; Torres, A.; Sanchez-Roman, J. and Nunez-Roldan, A.(2006).** Anti-centromere antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Scand. J. Rheumatol.;35:290–294.
- **Richardson, B. and Primer**, (2007). Epigenetics of autoimmunity. Nat. Clin. Pract. Rheumatol.;3 (9):521_527.

- **Riha,R.;Yang,A.;Rabnott,G.;Tunnicliffe,A.;Fong,K.andZimmerman, P.** (2004). Cytokine gene polymorphisms in idiopathic pulmonary fibrosis. J. Intern Med., 34:126-129.
- **Robinson, E. and Werth, V. (2015).** The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. Cytokine, 73(2):326-340.
- **Routsias, J. and Tzioufas, A.** (2010).B-cell epitopes of the intracellular autoantigens Ro/SSA and La/SSB: tools to study the regulation of the autoimmune response. J. Autoimmune 35: 256-264 .

S

- **Salaffi, F.; Ciapetti, M.; Carotti, S.; Gasparini, and Gutierrez, M. (2014).** "Disease activity in psoriatic arthritis: comparison of the discriminative capacity and construct validity of six composite indices in arealworld,BioMed.Res.International,http://dx.doi.org//0.1155/2014/5L8 105.
- **Sambrook, J. and Russell, D. (2001).** Molecular Cloning A Laboratory Manual. 3rd edn, Cold Spring Harbor Press,New York, USA.
- **Sanchez-Munoz, F.; Dominguez-Lopez, A. and Yamamoto-Furusho, J.K.** (2008).Role of cytokines in inflammatory bowel disease. World, J. Gastroenterol., 14: 4280-4288.
- **Saraiva, M. and O'Garra, A. (2010).** The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat. Rev. Immunol., 10: 170–181.
- **Sarzi-Puttini, P.; Atzeni, F.; Iaccarino, L.; Doria, A. (2005)** Environment and systemic lupuserythematosus: an overview. Autoimmunity .; 38:465–472.
- **Saigal, R.; Goyal, LK.; Agrawal, A.; Mehta, A.; Mittal, P.; Yadav, RN.; Meena, PD.; and Wadhvani, D.(2013).** Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker and its comparison with anti-dsDNA antibody.JAssoc Physicians India 61(6):372-7.
- **Sbong S, and Feldman M.(2015).** Frequency and causes of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate disagreements in adults. Int J Rheum Dis. ,18(1):29-32.

- **Schueler, M. G.; Swanson, W. and Thomas, P. (2010).** NISC Comparative Sequencing Program and Green, E. D. Adaptive evolution of foundation kinetochore proteins in primates. Mol. Biol. Evol. 27, 1585–1597.
- **Seredkina, N.; Van Der Vlag, J.; Berden, J.; Mortensen, E. and Rekvig, O. (2013)** Lupus nephritis: enigmas, conflicting models and an emerging concept. Med.;19:161–9.
- **Shabana, A.; El-Ghawet, A.; Machaly, S.; Abu Hashim, E.; El-Kady, B. and Shaat,R. (2009).** Anti-chromatin and anti-histone antibodies in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus . Clin. Rheumatol. 28(6):673–678.
- **Sherif, Z.; and Wasef, M. (2004)**. Gender Differences in Systemic Lupus Erythematosus.Gender Medicine.,.1(1).
- **Shin, M.; Kang, Y.; Lee, N.; Kim, S.; Kang, K.; Lazova, R. and Kang, I.(2012).** U1-Small Nuclear Ribonucleoprotein Activates the NLRP3 Inflammasome in Human Monocytes. The J. Immunol., 188: 4769–4775.
- **Silva, J.; Addobbati, C.; Sandrin-Garcia, P. and Crovella, S. (2014).** Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes versus Clinical Manifestations. Curr. Genomics, 15(1): 52-65.
- **Simon, J.; Cabiedes, J. and Ortiz, E.(2004).** Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. Rheumatology;43:220_4.
- **Sofian, M.; Kalantar, E.; Aghakhani, A.; Hosseini, S.; Banifazl, M.; Eslamifar, A.;Jourabchi, A.; Farazi, A.A. and Ramezani A. (2013).** No correlation between interleukin-10 gene promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection outcome. Hepat .,13(5):e8803.
- **Somers, E.; Marder, W.; Cagnoli, P.; Lewis, E.; DeGuire, P.; Gordon, C.; Helmick, C.; Wang, L.; Wing, J.; Dhar J.; Leisen, J.; Shaltis, D. and McCune, W. (2014):** Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: the Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance program. Arthritis Rheumatol., 66(2):369-378.

- **Spronk, P.; Borg, E. and Kallenberg, C.(1992).** Patients with systemic lupus erythematosus and Jaccoud's arthropathy: a clinical subset with an increased C reactive protein response? Ann. Rheum. Dis.;51:358_61.
- **Squatrito, D.; Emmi, G.; Silvestri, E.; Ciucciarelli, L.; D'Elios, M.; Prisco, D. and Emmi, L. (2014):** Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: from bench to bedside. Autoimmune Highlights., 14;5(2):33-45.
- **Stojan, H.; Fang, L.; Magder, and Petri, M. (2013).** Erythrocyte sedimentation rate is a predictor of renal and overall SLE disease activity .Lupus ., 22(8), 827–834.
- **Stone, R.; Feng, D.; Deng J., Singh S., Yang L., Fitzgerald-Bocarsly P, Eloranta M.L., Rönnblom, L. and Barnes, B. (2012):** Interferon regulatory factor 5 activation in monocytes of systemic lupus erythematosus patients is triggered by circulating autoantigens independent of type I interferons. Arthritis Rheum., 64(3):788-798.
- **Sun, X.Y.; Shi, J.; Han, L.; Su, Y. and Li, ZG.(2008).** Anti-histones antibodies in systemic lupus erythematosus: prevalence and frequency in neuropsychiatric lupus. J Clin Lab Anal. 22(4):271-7. doi: 10.1002/jcla.20248.

T

- **Tan, E.; Cohen, A. and Fries J. (1982).** The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus (SLE). Arthritis Rheum., 25:1271-1277.
- **Tedgui, A. and Mallat, Z. (2006).** Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol. Rev., 86(2):515-581.
- **Tiao, J.**; **Feng, R.**; **Carr, K.; Okawa, J. and Werth, V. (2016).** Using the American College of Rheumatology (ACR) and Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) criteria to determine the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE) in patients with subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE) ., Inc. J. Am. Acad. Dermatol.12,029.

- **Tornwall, J.; Carey, A.; Fox, R. and Fox, H. (1999).** Estrogen in Autoimmunity : Expression of Estrogen Receptors In Tymic and Autoimmune T Cell. J. Gender-Specific Med., 2 (5):33- 40.
- **Tsokos, G. (2011):** Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med., 365: 2110-2121.

U

- **Ulger, M.; Emekdas, G.; Aslan, G.; Tas, D.; Ilvan, A.; Tezcan, S.; Calıkoglu, M.; Erdal, M. and Kartaloglu, Z. (2014).** Determination of the cytokine gene polymorphism and genetic susceptibility in tuberculosis patients. Microbiyol. , Bul., 47: 250-264 .
- **Ullal, A.; Reich, C.; Clowse, M.; Criscion-Schreiber, L.; Tochacek, M. and Monestier, M. (2011).** Microparticles as antigenic targets of antibodies to DNA and nucleosomes in systemic lupus erythematosus. J. Autoimmun.;36:173-80.

V

- **Van, J. and Berden, J. (2011).** Lupus nephritis: role of antinucleosome antibodies. Semin Nephrol. ,31:376-89.
- **Vandenbroeck, K. (2012).** Cytokine Gene Polymorphisms and Human Autoimmune Disease in the Era of Genome-Wide Association Studies. J. Interf. Cytok. Res., 32(4):139-151 .
- **Vignesh, P.; Rawat, A.; Sharma, M. and Singh, S.(2016)**. Complement in autoimmune diseases . Clinic. Chimic. Act., (16)30519.

W

- **Wadr, P. and Gao, H. (2009).** Complement and the dysregulated inflammatory response. J.Cell.Med; 13 : 4154-4160.
- **Wakkach, A.1; Fournier, N; Brun, V;Breittmayer, J.P; Cottrez, F; Groux, H**. **(2003**). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. Immunity.,18(5):605-17**.**

- **Walport, M.J.(2001).** Complement. Second of two parts. N Engl J Med. ,344(15):1140–4.
- **Watanabe, H.; Sugimoto, M.; Asano, T.; Sato, S.; Suzuki, E. and Takahashi, A. (2015).** Relationship of complement activation route with clinical manifestations in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: a retrospective observational study. Med. Rheumatol. Jpn. Rheum. Assoc.,25:205-9.
- **Wei, L.; Sivakumar, R.; Titov, A.; Choi, S. and Morel, L .(2016).** Metabolic Factors that Contribute to Lupus Pathogenesis. Crit. Rev. Immunol. 75-98.
- **Whitacre, C.; Reingold, S. and O'Looney, P.(1999).** A Gender Gap in Autoimmunity. Science, 283:1277-1278.
- **William, B. and Eshler, M. (2012).** Interlukine-6 A cytokine for Gerontologists. J. Amer. Geriat. Soc., 41(2):176-181.
- **Wolff, K.; Goldsmith, L.; Katz. S.; Gilchrest, B.; Paller, A. and Leffell, D. (2009).** Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine., 7,th ;2; 2402.
- **Wolin, S. and Steitz, J. (1984).** The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: Identification of the antigenic protein and its binding site on the Ro RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci ., 81: 1996–2000.

Y

- **Yang, B.; Treweek, J.; Kulkarni. R.; Deverman, B.; Chen, C.; Lubeck, E.; Shah, S.; Cai, L. and Gradinaru, V. (2014):** Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing Cell, 158(4):945-58.
- **Yang, H.; Zhang, X. and Fu, Q. (2016).** Evaluating Anti-SmD1-amino-acid 83-119 Peptide Reactivity in Children with Systemic Lupus Erythematosus and Other Immunological Diseases. Chin. Med. J.;129:2840-4.
- **Yao, F.Y.; Mehta, N.; Flemming, J.; Dodge, J.; Hameed, B.; Fix, O.; Hirose, R.; Fidelman, N.; Kerlan, R.K. and Roberts.J.P.(2015)**.

Downstaging of hepatocellular cancer before liver transplant: long-term outcome compared to tumors within Milan criteria. Hepatology. ,61(6):1968-77. doi: 10.1002/hep.27752.

- **Yap, D. and Lai, K. (2013):** The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus - from bench to bedside. Nephrology, 18(4):243-255.
- **Yee, C.; Farewell, V. and Isenberg, D.(**2007**).** British Isles Lupus Assessment Group 2004 index is valid for assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum.; 56: 4113–4119 .
- **Yu, C.; Gershwin, M. and Chang, C. (2014).** Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: a critical review. J. Autoimmun., 48-49:10-13.
- **Yung, S.; and Chan, TM.(2016).** Anti-dsDNA antibodies and resident renal cells — Their putative roles in pathogenesis of renal lesions in lupus nephritis. Clinical Immunology: doi: 10.1016/j.clim.2016.09.002.

Z

- **Zandman-Goddard, G.; Solomon, M.; Rosman, Z.; Peeva, E. and** Shoenfeld,Y. (2012). Environment and lupus-related diseases. Lupus;21(3):241-50.
- **Zhao, Qi.; Chunshu, Y.; Jianing, W.; Yujia, L. and Pingting, Y .(2016).** Serum level of DNase1l3 in patients with dermatomyositis/ polymyositis, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, and its association with disease activity. Clin. Exp. Med. DOI 10.1007/s10238-016-0448-8 .
- **Zieve, G. and Khusial, P.(2003).** The anti-Sm immune response in autoimmunity and cell biology. Autoimmun. Rev., 2(5):235–240 .

ملحق (1)

استمارة المعايير المعتمدة من قبل الكلية الامريكية لأمراض الروماتيزم لتشخيص مرض داء الذئب الأحمراري

أسم المريض .....،مجموعة الكلى ( )، مجموعة المفاصل ( )

ت	الدليل التشخيصي	√	×
1	الطفح الجلدي Malare Rash		
2	الطفح القرصي Discoid Rash		
3	الحساسية لضوء الشمس Photosensitivty		
4	التقرحات الفموية Oral Ulcers		
5	التهاب المفاصل Arthritis		
6	التهابات المصلية Serosit		
7	التهابات كلوية Renal Disorde		
8	اضطرابات عصبية Nurologic Disorde		
9	اضطرابات دمية Hematologic Disorder		
10	اضطرابات مناعية Immunological Disorders		
11	الاضداد النووية Antinuclear Antibody		

ملحق (2)

الاستمارة الخاصة بالمريض

أستمارة معلومات للمرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري

- ✓ رقم المريض:
- ✓ التأريخ:
- ✓ الاصابة المرضية: المفاصل( ) ، الكلى ( )
- ✓ الاسم :
- ✓ الجنس:
- ✓ العمر :
- ✓ السكن:
- ✓ التحصيل الدراسي:
- ✓ المهنة:
- ✓ الحالة الاجتماعية:
- ✓ عددالاولاد:
- ✓ تأريخ الاسرة الوراثي:
- ✓ الطول:
- ✓ الوزن:
- ✓ فترة الاصابة بالمرض:
- ✓ الاختبارات المناعية التي أجريت على المريض:
- ✓ الاختبارات الوراثية التي أجريت على المريض:

ملحق (3)

استمارة مؤشرات نشاط مرض داء الذئب الأحمراري

SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY INDEX
SELENA MODIFICATION

Physicians Global Assessment _____

0 None | 1 Mild | 2 Mod | 3 Severe

SLEDAI SCORE

Check box: If descriptor is present at the time of visit or in the proceeding 10 days

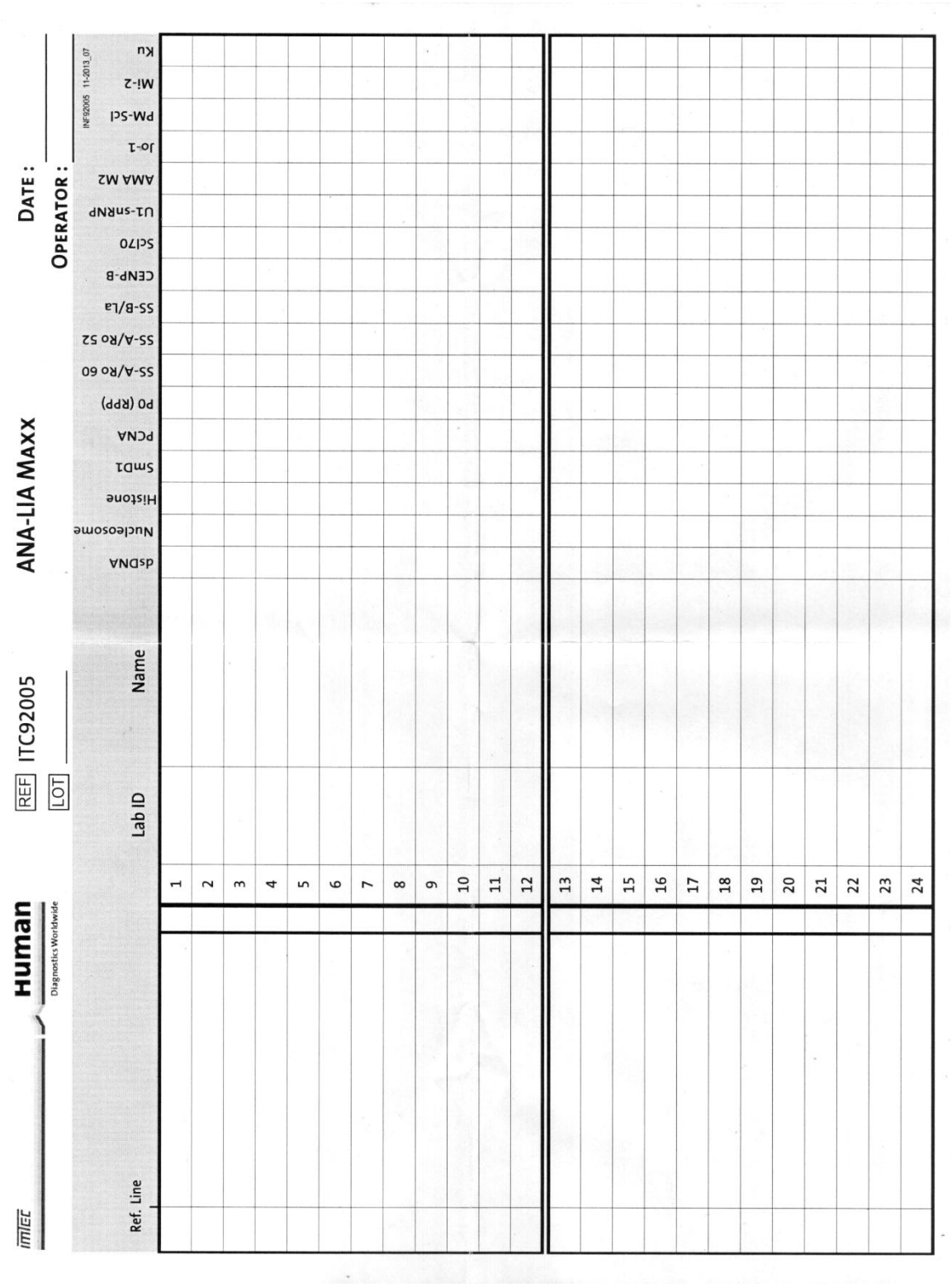
Wt	Present	Descriptor	Definition
8	☐	Seizure	Recent onset. Exclude metabolic, infectious or drug cause
8	☐	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized, or catatonic behavior. Excluded uremia and drug causes.
8	☐	Organic Brain Syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory or other intelligent function, with rapid onset fluctuating clinical features. Include clouding of consciousness with reduced capacity to focus, and inability to sustain attention to environment, plus at least two of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious or drug causes.
8	☐	Visual Disturbance	Retinal changes of SLE. Include cytoid bodies, retinal hemorrhages, serious exudate or hemorrhages in the choroids, or optic neuritis. Exclude hypertension, infection, or drug causes.
8	☐	Cranial Nerve Disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8	☐	Lupus Headache	Severe persistent headache: may be migrainous, but must be non-responsive to narcotic analgesia.
8	☐	CVA	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis
8	☐	Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual, infarction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis
4	☐	Arthritis	More than 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e. tenderness, swelling, or effusion).
4	☐	Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.
4	☐	Urinary Casts	Heme-granular or red blood cell casts
4	☐	Hematuria	>5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection or other cause.
4	☐	Proteinuria	>0.5 gm/24 hours. New onset or recent increase of more than 0.5 gm/24 hours.
4	☐	Pyuria	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	☐	New Rash	New onset or recurrence of inflammatory type rash.
2	☐	Alopecia	New onset or recurrence of abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
2	☐	Mucosal Ulcers	New onset or recurrence of oral or nasal ulcerations

2	□	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	□	Pericarditis	Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion, or electrocardiogram confirmation.
2	□	Low Complement	Decrease in CH50, C3, or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory.
2	□	Increased DNA binding	>25% binding by Farr assay or above normal range for testing laboratory.
1	□	Fever	>38˚C. Exclude infectious cause
1	□	Thrombocytopenia	<100,000 platelets/mm3
1	□	Leukopenia	<3,000 White blood cell/mm3. Exclude drug causes.

_____ TOTAL SCORE (Sum of weights next to descriptors marked present)

ملحق (4)

استمارة تحاليل الاجسام الضد النووية



ملحق (5)

اقطار الدوائر المتكونة حول الحفر لمتمم الثالث والرابع في عينات المرضى المصابين بداء الذئب الأحمراري الذي يصيب المفاصل والكلى





ملحق (6)

استمارة التراكيز القياسية للمتمم الثالث (C3)

RADIAL IMMUNODIFFUSION PLATE

C3

LOT A113.16
2018/04

VALORI NORMALI / *NORMAL VALUE*
91-156 mg/dl

TABELLA DI CONVERSIONE / *CONVERSION TABLE*

DIAMETRO *DIAMETER*	Valore / *Value* mg/dl
4	17,2
4,1	19,5
4,2	21,9
4,3	24,4
4,4	26,9
4,5	29,5
4,6	32,1
4,7	34,8
4,8	37,5
4,9	40,3
5	43,2
5,1	46,1
5,2	49,0
5,3	52,1
5,4	55,2
5,5	58,3
5,6	61,5
5,7	64,8
5,8	68,1
5,9	71,5
6	74,9
6,1	78,4
6,2	81,9
6,3	85,5
6,4	89,2
6,5	92,9
6,6	96,7
6,7	100,5
6,8	104,4
6,9	108,4
7	112,4
7,1	116,5
7,2	120,6
7,3	124,8
7,4	129,0
7,5	133,3

DIAMETRO *DIAMETER*	Valore / *Value* mg/dl
7,6	137,7
7,7	142,1
7,8	146,5
7,9	151,1
8	155,7
8,1	160,3
8,2	165,0
8,3	169,8
8,4	174,6
8,5	179,5
8,6	184,4
8,7	189,4
8,8	194,4
8,9	199,5
9	204,7
9,1	209,9
9,2	215,2
9,3	220,5
9,4	225,9
9,5	231,4
9,6	236,9
9,7	242,5
9,8	248,1
9,9	253,8
10	259,5
10,1	265,3
10,2	271,2
10,3	277,1
10,4	283,1
10,5	289,1
10,6	295,2
10,7	301,3
10,8	307,5
10,9	313,8
11	320,1
11,1	326,5

La tabella di conversione è stata determinata dalla media delle prove effettuate utilizzando materiale di riferimeto interno calibrato contro **ERM-DA470k/IFCC**.

*Conversion table was determined by the average of the tests performed using internal reference material calibrated against **ERM-DA470k/IFCC**.*

Incertezza / *Uncertainty* = 5,0 %

L'incertezza estesa è calcolata con k = 2 corrispondente ad un livello di confidenza del 95%.

The extended uncertainty is calculated with k = 2 corresponds to a confidence level of 95%.

I dati riportati sono validi solo per la tabella valori allegata del lotto relativo. In caso di utilizzo di un calibratore fare riferimento alle informazioni di tracciabilità del calibratore stesso.

The reported data are valid only for the enclosed table values of the reported batch. If you are using a calibrator refer Traceability information of the calibrator.

ملحق (7)

استمارة التراكيز القياسية للمتمم الثالث (C4)

RADIAL IMMUNODIFFUSION PLATE

C4

LOT E196.16
2018/07

VALORI NORMALI / *NORMAL VALUE*
20-50 mg/dl

TABELLA DI CONVERSIONE / *CONVERSION TABLE*

DIAMETRO *DIAMETER*	Valore / *Value* mg/dl
4	6,9
4,1	7,9
4,2	8,9
4,3	9,9
4,4	10,9
4,5	12,0
4,6	13,1
4,7	14,2
4,8	15,3
4,9	16,4
5	17,6
5,1	18,8
5,2	20,1
5,3	21,3
5,4	22,6
5,5	23,9
5,6	25,2
5,7	26,5
5,8	27,9
5,9	29,3
6	30,7
6,1	32,2
6,2	33,6
6,3	35,1
6,4	36,6
6,5	38,2
6,6	39,7
6,7	41,3
6,8	42,9
6,9	44,5
7	46,2
7,1	47,9
7,2	49,6
7,3	51,3
7,4	53,1
7,5	54,8

DIAMETRO *DIAMETER*	Valore / *Value* mg/dl
7,6	56,6
7,7	58,4
7,8	60,3
7,9	62,2
8	64,1
8,1	66,0
8,2	67,9
8,3	69,9
8,4	71,9
8,5	73,9
8,6	75,9
8,7	78,0
8,8	80,1
8,9	82,2
9	84,3
9,1	86,4
9,2	88,6
9,3	90,8
9,4	93,1
9,5	95,3
9,6	97,6
9,7	99,9
9,8	102,2
9,9	104,5
10	106,9
10,1	109,3
10,2	111,7
10,3	114,2
10,4	116,6
10,5	119,1
10,6	121,6
10,7	124,2
10,8	126,7
10,9	129,3
11	131,9
11,1	134,5

La tabella di conversione è stata determinata dalla media delle prove effettuate utilizzando materiale di riferimeto interno calibrato contro **ERM-DA470k/IFCC**.
Conversion table was determined by the average of the tests performed using internal reference material calibrated against ***ERM-DA470k/IFCC***.

Incertezza / Uncertainty = **5,8 %**
L'incertezza estesa è calcolata con k = 2 corrispondente ad un livello di confidenza del 95%.
The extended uncertainty is calculated with k = 2 corresponds to a confidence level of 95%.

I dati riportati sono validi solo per la tabella valori allegata del lotto relativo. In caso di utilizzo di un calibratore fare riferimento alle informazioni di tracciabilità del calibratore stesso.
The reported data are valid only for the enclosed table values of the reported batch. If you are using a calibrator refer Traceability information of the calibrator.

Summary

This study was conducted on a sample of Iraqi patients with systemic lupus erythematosus (SLE) for both lupus arthritis and lupus nephritis. Blood samples were collected from 32 lupus arthritis patients with age ranged between 13and 50 years, The female percentage was 96.87%.Anothre 32 blood samples were collected from lupus nephritis patients with age ranged between 16and 65 years, where the female percentage was 90.62% .For comparison, a total of 32 blood sample were also collected from normal individuals (healthy controls), with age ranged between 21 and 54years, where the female percentage was 53.12%. Body mass index (BMI) was calculated for each case study and normal controls. Results showed that there is no significant difference in BMI between lupus arthritis (27.03± 0.79) and lupus nephritis patients (28.11± 0.82) and healthy controls (27.12± 0.98), which indicates that body mass doesn't affected by the incidence of SLE.

Relationship was studied between clinical blood biomarkers like counts of white and red blood cells and platelets, hemoglobin concentration and erythrocytcite sedimentation rate (ESR) and the incidence of SLE. Results showed that there is no significant difference between count of WBC in lupus arthritis (8.47×10^3 cell/ml) and lupus nephritis patients (9.13×10^3 cell/ml) and healthy controls (7.99×10^3 cell/ml), while it was found that there is a significant decrease ($P<0.01$) in RBC count for both lupus arthritis (4.41×10^6 cell/ml) and lupus nephritis patients (4.32×10^6 cell/ml) in comparison with RBC count in healthy controls (4.98×10^6 cell/ml). Results also showed that there is a significant decrease ($P<0.01$) in hemoglobin concentration in serum sample for both lupus arthritis (11.83g/dl) and lupus

nephritis patients (11.79g/dl) in comparison with hemoglobin concentration (13.69g/dl) in healthy controls. On the other hand it was found that there is no any significant difference between platelets count in lupus arthritis (270.81×10^3 platelet/ml) and lupus nephritis patients (255.01×10^3 platelet/ml) and normal healthy controls (275.94×10^3 platelet/ml) . Results also showed that there is a significant increase ($P<0.01$) in ESR for both lupus arthritis (38.53mm/hr) and lupus nephritis patients (44.0 mm/hr) in comparison with ESR for healthy controls (13.09mm/hr). According to these results, clinical blood biomarker including RBC count, hemoglobin concentration and ESR were regarded a clinical biomarkers for detecting SLE in Iraqi patient.

Relationship between immunological biomarkers and the incidence of SLE was also studied .These biomarkers includes the concentration of CRP, ds-DNA, antibodies, concentration of complements 3 and 4 and antinuclear antibodies. Results showed that there is a significant increase ($P<0.01$) in CRP concentration in blood serum of lupus nephritis patients(13.63 mg/l) in comparison with it concentration in blood serum of healthy controls (9.51 mg/l), while there is no any significant difference between CRP concentration in blood serum of lupus arthritis patient (7.64 mg/l) and its concentration in blood serum of healthy controls, which refer that this biomarker was regarded as an important immunological biomarker for detecting lupus nephritis. Results also showed that there is a significant increase ($P<0.01$) in the concentration of ds-DNA antibodies in blood serum for both lupus arthritis (65.15u/ml) and lupus nephritis patients (60.39 u/ml) in comparison with the concentration of these antibodies in blood serum of healthy control (5.19u/ml) which referred that this immunological parameter

is one of the important parameters for detecting SLE. On the other hand, results showed that there is a significant decrease ($P<0.01$) in the concentration of complement-3 in blood serum for both lupus arthritis patients (104.27 mg/dl) and lupus nephritis patients (89.08mg/dl) in comparison with its level in blood serum of healthy controls (116.08 mg/dl), which referred that this immunological parameter is one of the important parameter for detecting SLE. Level of complement-4 was also studied, results showed that there is a significant decrease ($P<0.01$) in concentration of this complement in blood serum of both lupus arthritis patient (20.64 mg/dl) and lupus nephritis patients (20.51 mg/dl) in comparison with its level in blood serum of the healthy controls (28.70 mg/dl) which indicates that complement-4 level in blood serum is one of the immunological parameter for detecting SLE.

The association between the presences of antinuclear antibodies and the incidence of SLE was studied at the time that all these antibodies were not detected in blood serum of normal healthy controls. It was noticed that positive result for anti-nucleosome antibodies was detected for 87.5% and 65.63% from the total patient for both lupus arthritis and lupus nephritis respectively. A positive result for anti-smith antibodies was also detected for 93.75% and 81.25%, and for concentration antibodies for 87.5% and 56.25%, and for sjogrens syndrome antibodies types SS- A/Ro 60 in a percentage of 100% and 81.25%, Sjogrens syndrome antibodies type SS-A/Ro52 in a percentage of 56.25% and 43.75%, Sjogrens syndrome antibodies type SS-B/La in a percentage 75.0% and 46.88%, and for small nuclear ribonucleic acid protein antibodies in a percentage of 100% and 84.38% , and for Mi-2 antibodies in a percentage of 81.25% and 68.75%,

and for Ku antibodies in a percentage of 87.5% and 81.25%, and for histone antibodies in a percentage of 87.5% and 65.63% from the total patient of lupus arthritis and lupus nephritis respectively for all these immunological parameters. According to these results, the presence of anti-nucleosome antibodies, anti-smith antibodies, centromere antibodies, Sjogrens syndrome antibodies type SS-A/Ro60, small nuclear ribonucleic acid protein antibodies. Mi-2 antibodies, Ku antibodies and histone antibodies in blood serum are important immunological parameters for detecting lupus arthritis and lupus nephritis. On the other hand, the presence of Sjogrens syndrome antibodies type SS-A/Ro52 and type SS-B/La in blood serum are other immunological parameters for detecting lupus arthritis.

Disease activity of SLE was also studied in both lupus arthritis and lupus nephritis patients according to the classification of American college of rheumatology. Results showed that disease activity was more severely in lupus nephritis patients with a significant difference ($P<0.01$) than disease activity was absent because they are not suffering from SLE .

In order to study the genetic response for SLE, the association of the single nucleotide polymorphism in interlukin-10 gene as one of the risk factors for incidence of SLE was studied. Primarily, genomic DNA was extracted from SLE patients and healthy controls. Results showed that genomic DNA was extracted with high purity of 1.7-2.0 with a concentration of 90-120 µg /ml. Then site of polymorphism (C>A) rs1800872 position 206773062 located in the promoter region of Interlukin-10 gene was amplified by using specific primers. Results of amplification showed that a DNA fragment of 650 bp was obtained after electrophoresis on agarose gel (3%), and then nucleotide sequence for this fragment was determined.

Results of sequencing showed that most of normal healthy controls (66%) are cSNP at the position 206773062 of the detected SNP(rs 1800872), while 53% and 59% of lupus arthritis and lupus nephritis patients are aSNP respectively. Results also showed that there is a significant difference between the percentage of CA heterozygous alleles (34.38%) and 46.88% in lupus arthritis and lupus nephritis patient respectively in comparison with 66.67% for healthy controls with a significant difference ($p>0.01$). On the other hand it was found that allele frequency of a SNP in both lupus arthritis and lupus nephritis patients was significantly differ ($p>0.01$) from allele frequency of the wild –type genotype (cSNP) in healthy controls.

These results refers that the occurring of cSNP in the position 206773062 at interlukin-10 gene (rs 1800872) is one of risk factors associated with the incidence of SLE in Iraqi patients.

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



Detection of some immunological parameters and genetic diversity of interlukine – 10 gene in some Iraqi patient with Systemic Lupus of Erythematosus

A thesis
Submitted to the Council of College of Education for pure Science as a Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of M.Sc.in Biology

By
Wasan Abdulateef Majeed Al-Azawi
B.Sc. Biology, 2007

Supervised by

Professor
Dr. Abbas A. Farhan

Professor
Dr. Hameed M. Jasim

March
2017M

Rajab
1438 H

الفصل الاول

المقدمة

INTRODUCTION

الفصل الثاني

استعراض المراجع

REVIEW OF LITERATURE

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

MATERIALS AND METHODS

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

RESULTS AND DISCUSSION

الاستنتاجات والتوصيات

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

المراجع

REFERENCES

الملاحق

APPENDIXES