



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء الحيوية السريرية والأحياء الدقيقة

استقصاء التعدد الشكلي لجين مستقبل الفيتامين د عند  
مرضى الربو

**Investigation of Vitamin D Receptor  
Gene (VDR) Polymorphisms in  
Asthmatic Patients**

أطروحة قدمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في التشخيص المخبري

إعداد: هيثم عبد الرزاق الدرة

إشراف: أ. د. شادن حداد

العام 1436 هـ / 2015 م

استغرق البحث مدة زمنية من (2011/ 5 / 22) وحتى (2015 / 10 / 28)

تم انجاز البحث في كلية الصيدلة-جامعة دمشق والهيئة العامة للتقانة الحيوية

تاريخ مناقشة الرسالة 2015 / 10 / 28

أسماء أعضاء لجنة الحكم: برئاسة: أ.د. فوزة منعم

الفاحص الأول: م.د. مجد الجمالي

الفاحص الثاني: أ.م.د. شادن حداد

## الإهداء

إلى من أحمل اسمهما بكل فخر، إلى حكمتي وعلمي إلى طريقي المستقيم إلى ينبوع الصبر والتفاؤل  
والأمل إلى كل من لي في الوجود إلى من آثروني على أنفسهم إلى من علموني علم الحياة.

أبي وأمي

إلى من كانوا ملاذي وملجئي إلى من تذوقت معهم أجمل اللحظات إلى القلوب الطاهرة الرقيقة  
والنفوس البريئة إلى رياحين حياتي

إخوتي: منار، محمود، أنور، حسام وعبد الرحمن

إلى رفيقة دربي، إلى من حركت في قلبي نبضه وأضاءت بوجودها حياتي، إلى من كانت جانبي  
دوماً مهما صعبت الأوقات وأعطتني الأمل في كل مرة انطفأ في نفسي إلى أطيّب وأنقى قلب أعرفه

خطيبي أمني

إلى أصدقائي الذين تحلو بالإخاء وتميزوا بالوفاء والعطاء إلى من معهم سعدت، وبرفقتهم في دروب  
الحياة الحلوة والحزينة سرت إلى من كانوا معي على طريق النجاح والخير

أصدقائي غالب، محمد، عبد الرحمن، عدنان وسمير

## كلمة شكر

أبدأ شكري لله عز وجل الذي عليه توكلي واعتمادي.

أتوجه بالشكر إلى إدارة كلية الصيدلة متمثلة بالعميد الأستاذ الدكتور عبد الحكيم نتوف ونائبه للشؤون العلمية والإدارية الأستاذ الدكتور مصطفى العموري و الأستاذة الدكتورة جمانة الصالح.

خالص الشكر والامتنان للأستاذة الدكتورة شادن حداد لتفضلها بالإشراف على البحث وبذلها كل الوقت والجهد لإتمام هذا العمل.

الشكر الجزيل للأستاذة الدكتورة فوزة منعم والدكتور مجد الجمالي لتفضلهما بالتحكيم على الرسالة واغناءها بالملاحظات القيمة لتنتهي في أكمل صورة.

أتوجه بالشكر إلى رئاسة قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة متمثلة بالدكتور مروان البحتري.

أتوجه بالشكر إلى إدارة الهيئة العامة للتقانة الحيوية لإتاحة الفرصة لي لانجاز هذا العمل وأخص بالذكر الدكتور عبد القادر رحمو.

الشكر لجميع أساتذتي في سنوات الدراسة وأخص بالذكر أساتذتي في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة الذين لولا جهودهم لما وقفت اليوم.

كما أتوجه بالشكر إلى إدارة مستشفى الأسد الجامعي و مستشفى المواساة وكذلك العاملين في قسم الصدرية لتسهيلهم جمع العينات وجمع بيانات المرضى بدقة.

شكر خاص للصديق عمر الشاعر في الهيئة العامة للتقانة الحيوية لما قدمه من دعم وتسهيل لانجاز العمل.

## Curriculum Vita (CV)

الاسم: هيثم الدرة

الجنسية: العربية السورية

تاريخ الولادة: 1985/8/26

العنوان: ريف دمشق، النتل، شارع الكورنيش

البريد الالكتروني: haithamlab@gmail.com

حاصل على الثانوية العامة السورية عام 2003

حاصل على إجازة في الصيدلة والكيمياء الصيدلانية من جامعة دمشق عام 2008

أدرس لنيل درجة الماجستير في التشخيص المخبري من كلية الصيدلة في جامعة دمشق

## تصريح

الاسم الكامل: هيثم عبد الرزاق الدرة

مكان وتاريخ الولادة: ريف دمشق 1985

عنوان البحث باللغة العربية: استقصاء التعدد الشكلي لجين مستقبل الفيتامين د عند مرضى الربو

لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم اقتباسه بالكامل من عمل علمي آخر أو أنجز للحصول على شهادة أخرى في جامعة دمشق أو أية جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي داخل أو خارج القطر.

لم يتم قبض أي مبلغ مادي أو مكافأة عينية سواء بشكل مباشر أو غير مباشر مقابل القيام بعمل يمس جوهر هذه الأطروحة أو نتائجها.

أتعهد بأنني لم أقل إلا الحقيقة ولم أخف شيئاً تحت طائلة المعاقبة والمحاسبة القانونية وعليه أوقع

التاريخ (2015 / 10 / 28)

توقيع الباحث

اسم الباحث الثلاثي

هيثم عبد الرزاق الدرة

## المحتويات

6.....	قائمة الأشكال.....
7.....	قائمة الجداول.....
8.....	قائمة المصطلحات.....
11.....	قائمة الاختصارات.....
13.....	تمهيد.....
14.....	الدراسة النظرية.....
15.....	1- الربو.....
15.....	1-1- الربو من الناحية الفيزيولوجية المرضية.....
16.....	1-2- الربو من الناحية السريرية.....
16.....	1-3- الربو علاجياً.....
17.....	1-4- أسباب الربو.....
17.....	1-4-1- العوامل البيئية.....
18.....	1-4-2- العوامل البيئية وبدء هجمة الربو.....
18.....	1-4-3- العوامل الجينية.....
19.....	1-4-4- الجينات المترافقة مع الربو.....
23.....	1-4-5- التأثيرات جين-جين.....
23.....	1-4-6- التأثيرات جين-بيئة.....
24.....	1-5- تدبير الربو.....

- 24.....6-1- تشخيص الربو .....
- 25.....7-1- امراضية الربو.....
- 26.....8-1- آلية الربو.....
- 29.....9-1- آلية الالتهاب في الطرق التنفسية.....
- 30.....10-1- الأنماط الظاهرية والداخلية للربو.....
- 32.....11-1- وبائيات الربو.....
- 33.....2- الفيتامين د.....
- 35.....1-2- اصطناع الفيتامين د.....
- 36.....2-2- تنظيم مستويات الفيتامين د البلازمية.....
- 38.....3- مستقبل الفيتامين د.....
- 38.....1-3- بنية مستقبل الفيتامين د.....
- 39.....2-3- الميدان AIB.....
- 39.....3-3- الميدان الرابط للدنا.....
- 40.....4-3- الميدان D.....
- 40.....5-3- الميدان الرابط للجين.....
- 40.....6-3- آلية عمل مستقبل الفيتامين د.....
- 43.....4- جين مستقبل الفيتامين د.....
- 44.....1-4- التعددات الشكلية .....
- 44.....1-1-4- تعريف التعدد الشكلي.....
- 45.....2-1-4- اختلال التوازن الارتباطي.....
- 45.....3-1-4- التعددات الشكلية لجين VDR.....
- 47.....4-1-4- وظائف التعددات الشكلية.....

47	الريو.....
51	الدراسة العملية.....
52	1- مسوغات البحث.....
52	2-تصميم الدراسة.....
52	3- هدف الدراسة.....
52	4- مجموعات الدراسة.....
54	5- الاعتيان.....
57	6- المواد والطرق.....
57	6-1-1- المواد المستخدمة.....
57	6-1-2- تحضير محاليل استخلاص الدنا.....
57	6-1-3- مراحل استخلاص الدنا.....
60	6-2- تفاعل البوليميراز التسلسلي.....
64	6-3- الهضم بأنزيمات الاقترع.....
66	6-4- تحري نواتج الهضم.....
67	الدراسة الإحصائية.....
68	النتائج.....
69	نتائج العمل.....

- 1-1- ناتج تفاعل تضخيم جين VDR.....69
- 1-2- ناتج تفاعل الهضم لنواتج التضخيم بإنزيم الاقترع *Apal*.....70
- 1-3- ناتج تفاعل الهضم لنواتج التضخيم بإنزيم الاقترع *BsmI*.....71
- 1-4- ناتج تفاعل الهضم لنواتج التضخيم بإنزيم الاقترع *TaqI*.....72
- 1-5- النمط الجيني وتواترات الأليل للتعدد الشكلي *Apal* في جين VDR لعينات المرضى والشاهد.....73
- 1-5-1- دراسة توزيع الأنماط الجينية عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي *Apal* في جين VDR.....75
- 1-5-2- دراسة توزيع الألائل عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي *Apal* في جين VDR.....76
- 1-6- النمط الجيني وتواترات الأليل للتعدد الشكلي *BsmI* في جين VDR لعينات المرضى والشاهد.....76
- 1-6-1- دراسة توزيع الأنماط الجينية عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي *BsmI* في جين VDR.....78
- 1-6-2- دراسة توزيع الألائل عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي *BsmI* في جين VDR.....79
- 1-7- النمط الجيني وتواترات الأليل للتعدد الشكلي *TaqI* في جين VDR لعينات المرضى والشاهد في جين VDR.....79
- 1-7-1- دراسة توزيع الأنماط الجينية عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي *TaqI* في جين VDR.....80

1-7-2- دراسة توزع الألائل عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي *TaqI* في

جين VDR.....81

المناقشة.....82

الاستنتاجات.....86

التوصيات والمقترحات.....87

الملخص.....88

المراجع.....90

قائمة الأشكال		
الصفحة	اسم الشكل	الشكل
28	الآليات الامراضية في الربو عند ذوي التأهب الوراثي	الشكل (1)
32	الأنماط الداخلية المترافقة مع Th2	الشكل (2)
36	اصطناع الفيتامين د	الشكل (3)
37	تنظيم مستويات الفيتامين د البلازمية	الشكل (4)
40	بنية مستقبل الفيتامين	الشكل (5)
43	ارتباط المعقد RXR-VDR مع العناصر المستجيبة لفيتامين د	الشكل (6)
45	جين VDR البشري	الشكل (7)
47	بنية جين مستقبل الفيتامين د ومواقع التعددات الشكلية المعروفة	الشكل (8)
50	المستويات المختلفة لتأثير التعددات الشكلية لجين VDR على الوظائف الحيوية وكيفية ربطها مع الأمراض	الشكل (9)
53	توزع مجموعات الدراسة	الشكل (10)
69	نتائج تفاعل PCR للعينة باستخدام زوجين من المشاريع لجين VDR على هلامة الأغاروز 1.5% الملونة ببروميدي الإيثيديوم	الشكل (11)
70	التعدد الشكلي <i>Apal</i> في جين VDR	الشكل (12)
71	التعدد الشكلي <i>BsmI</i> في جين VDR	الشكل (13)
72	التعدد الشكلي <i>TaqI</i> في جين VDR	الشكل (14)
75	مقارنة توزع الأنماط الجينية للتعدد الشكلي <i>Apal</i> لجين VDR بين مجموعة المرضى ومجموعة الشاهد	الشكل (15)
78	مقارنة توزع الأنماط الجينية للتعدد الشكلي <i>BsmI</i> لجين VDR بين مجموعة المرضى ومجموعة الشاهد	الشكل (16)
81	مقارنة توزع الأنماط الجينية للتعدد الشكلي <i>TaqI</i> لجين VDR بين مجموعة المرضى ومجموعة الشاهد	الشكل (17)

قائمة الجداول		
الصفحة	اسم الجدول	الجدول
20	الجينات المرتبطة مع الربو من الناحية الوظيفية.	الجدول (1)
73	توزع الأنماط الجينية وتواترات الأليل للتعدد الشكلي <i>Apal</i> في جين VDR لعينات المرضى والشاهد	الجدول (2)
77	توزع الأنماط الجينية وتواترات الأليل للتعدد الشكلي <i>BsmI</i> في جين VDR لعينات المرضى والشاهد	الجدول (3)
80	توزع الأنماط الجينية وتواترات الأليل للتعدد الشكلي <i>TaqI</i> في جين VDR لعينات المرضى والشاهد	الجدول (4)
86	الدراسات التي تربط التعددات الشكلية في جين VDR مع مرض الربو	الجدول (5)

قائمة المصطلحات	
Adhesion molecules	جزيئات التصاق
Aeroallergens	مهيجات هوائية
Allergen	مستأرج
Angiogenesis	تولد الأوعية
Apo receptor	صميم المستقبل
Autoimmunity	مناعة ذاتية
B2 fast acting agonists	ناهضات $\beta 2$ سريعة التأثير
Bronchial tree	الشجرة القصبية
Candidate-gene approaches	مقاربات الجين المرشح
Cloning	التنسيل
Coactivator	مفعل تشاركي
Conformation	هيئة
Coregulator	منظم تشاركي
Corepressor	تميم كظيم
Endocrine	صماوي
Endotype	نمط داخلي
Gene	جين
Haplotype	نمط فرداني
Helper T-cell	خلايا تائية مساعدة
Heterodimer	متنوي متغاير
Heterodimerization	التمائر المتغاير
Heterozygotic	متغاير الزيغوت
Hinge	مفصلة
Holo antagonist	مناهض كامل
Homozygotic	متماثل الزيغوت
Hyperplasia	فرط تنسج

Hyperresponsiveness	فرط التفاعلية
Hypertrophy	ضخامة
Incidence	وقوع المرض
Inflammation	التهاب
Innate immunity	مناعة فطرية
Intrinsic asthma	ربو داخلي المنشأ
Isoleucine	إيزولوسين
Isocyanates	الأيزوسيانات
Ligand	لحين
Linkage analysis	تحاليل الارتباط
Linkage Disequilibrium	اختلال التوازن الارتباطي
Linkage studies	دراسات الارتباط
Locus	موضع
Microbial load	الحمل الميكروبي
Natural Killer (NK)	الخلايا القاتلة الطبيعية
Nuclear Receptor Superfamily	عائلة المستقبلات النووية
Osteomalacia	تلين العظام
Parathyroid Hormone (PTH)	هرمون الدريقات
Pathophysiology	الفيزيولوجية المرضية
Persistent asthma	الربو المستديم
Phenotype	نمط ظاهري
Phytoplankton	عوالق نباتية
Pollutants	الملوثات
polymorphism	تعدد شكلي
Prevalence	انتشار
Primer	مشرع
Pro-inflammatory cytokines	سيتوكينات التهابية

Promoter	معزاز
Receptor dimerization	تماثر المستقبل
Remodeling	تبدل البنية
Rickets	الرخد
Sensitization	التحسيس
Severity	وخامة
Splenocytes	خلايا طحالية
Sputum	القشع
Transcription factor	عامل انتساخ
Vitamin D endocrine system	نظام فيتامين د الصماوي
Thermal isoerization	مصاوعة حرارية
Zinc-finger motif	منطقة إصبع الزنك

قائمة الاختصارات	
<b>ADAM33</b>	Disintegrin and Metalloprotease33
<b>CCR2</b>	Chemokine receptor 2
<b>CMA1</b>	Mast cell chymase
<b>COPD</b>	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
<b>DBD</b>	DNA Binding Domain
<b>DRIP</b>	Vitamin D-receptor interacting protein
<b>FcεRIβ</b>	β-chain of the high-affinity receptor for IgE
<b>FEV1</b>	Forced Expiratory Volume of the first second
<b>HAT</b>	Histone Acetyl Transferase
<b>HREs</b>	Hormone Response Elements
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LBD</b>	Ligand Binding Domain
<b>LD</b>	Linkage Disequilibrium
<b>NAT2</b>	N-Acetyltransferase 2
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NSAIDs</b>	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
<b>OR</b>	Odds Ratio
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PEF</b>	Peak Expiratory Flow
<b>PHF11</b>	PDH Finger Protein 11
<b>PTH</b>	Parathyroid Hormone
<b>PHF11</b>	PDH Finger Protein 11

<b>PTH</b>	Parathyroid Hormone
<b>Reg Tcell</b>	Regulatory T Cell
<b>RFLPs</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RXR</b>	Retinoid X Receptor
<b>SRC</b>	Steroid Receptor Coactivators
<b>STAT6</b>	Signal Transducer and Activator Of Transcription 6
<b>TGF <math>\beta</math>1</b>	Transforming Growth Factor Beta 1
<b>Th</b>	T helper
<b>TNF-<math>\alpha</math> and TNF-<math>\beta</math></b>	Tumor Necrosis Factor $\alpha$ And $\beta$
<b>TRIP1</b>	Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein
<b>TSLP</b>	Thymic Stromal Lymphopoietin
<b>VDB</b>	Vitamin D Binding Protein
<b>VDR</b>	Vitamin D Receptor

## تمهيد

الربو هو مشكلة صحية رئيسة تؤثر على حياة الملايين من الأشخاص حول العالم، يملك الربو معدل انتشار prevalence متزايد في الدول المتقدمة والذي يكلف الحكومات والمؤسسات الصحية تكاليف اقتصادية هائلة. لسوء الحظ تبقى العديد من الحاجات الصحية غير مؤمنة نتيجة لوجود ثغرات في المعرفة الطبية حول الفيزيولوجيا المرضية للربو والرعاية الصحية للمرضى.

يعتبر الربو أحد الأمراض الالتهابية المزمنة الشائعة، يصيب الأشخاص من كل الأعمار وهو تحدي خطير للصحة العامة ويملك تأثيرات كبيرة على أداء الأشخاص سواء في المدرسة أو البيت أو مكان العمل.

من جهة أخرى، تلعب الآلية المناعية دوراً مهماً في امراضية الربو، بحيث يحدث انزياحاً نحو الخلايا التائية المساعدة من النمط 2، الأمر الذي يفسر حالة الالتهاب وفرط التفاعلية القصصية المشاهدة عند مرضى الربو ولقد سجل دور لفيتامين د في هذه الآلية المناعية باعتباره معدلاً مناعياً يقوم بعمله من خلال مستقبل الفيتامين د الموجود في العديد من الأنماط الخلوية ومن بينها الخلايا التائية المساعدة نمط 1 و نمط 2 وغيرها من الخلايا المناعية.

درس في هذا البحث وجود ترافق بين بعض التعدادات الشكلية في جين مستقبل الفيتامين د وقابلية الإصابة بمرض الربو في سوريا.

## الدراسة النظرية

## 1- الربو

الربو هو تحدٍ خطير للصحة العامة بتكاليفه المباشرة وغير المباشرة وبمعدل انتشار متزايد عالمياً . يملك الربو تأثيراً كبيراً على أداء الأشخاص سواء في المدرسة أو مكان العمل أو بشكل عام على إنتاجية productivity الأشخاص. يحدث أو ينجم حوالي 10% من الربو عن مكان العمل [1]. إن التقدم بالسن أيضاً هو عامل مهم في حدوث الربو عند المسنين، حيث لا يؤدي فقط إلى تقييد في الحياة اليومية، لكن يمكن أيضاً ينهي حياة الأشخاص في بعض الحالات، خصوصاً إذا كان الربو غير مُعالج.

### 1-1- من الناحية الفيزيولوجية المرضية

الربو هو حالة التهابية في الرئتين، يُوَدِّي إلى تقييد في المجرى الهوائي وبترافق مع أعراض من ضيق التنفس، الانزعاج، القلق والذعر وتوقف التنفس القائل في بعض الحالات [1]. إن الامراضية في الربو معقدة جداً وغير واضحة حتى الآن وبناءً على المعطيات السريرية والمعطيات في المختبر يوجد عدة أنماط ظاهرية مختلفة للربو، سواءً كانت هذه الأنماط تمثل مميزات سريرية أو وخامات severities مختلفة لمرض منفصل أو أمراض منفصلة في مرض الربو تبقى غير واضحة. تكون معظم حالات الربو متواسطة بالضد IgE مع حساسية مفرطة للمستضدات المستنشقة أو ما يعرف بالربو الأرجي Allergic asthma. بينما الربو ذو الطبيعة غير الأرجية يشار إليه بالربو داخلي المنشأ Intrinsic asthma [2].

ينشأ الربو غالباً نتيجة التهاب inflammation مستديم في الطرق التنفسية، ويشكل مستقل عن المستأرج allergen ويملك ملامح مناعية ذاتية autoimmunity. يترافق الالتهاب المزمن طويل الأمد مع تبديل في بنية الطرق التنفسية remodeling وتقييد متزايد في التدفق الهوائي كنتيجة للتندب scarring في المجرى الهوائي.

## 2-1- الربو من الناحية السريرية

تتفاوت أعراض و علامات الربو من مريض لآخر، غالباً ما يترافق مع عوارض من ضيق التنفس، الأزيز، السعال وتيبس الصدر. يعادل ذلك في اختبارات وظائف الرئة من الناحية السريرية انخفاض في حجم الزفير القسري في الثانية الواحدة FEV1 (Forced Expiratory Volume of the first second) ومعدل ذروة التدفق الزفيري (PEF (Peak Expiratory Flow [3].

فرط التفاعلية القصيبية hyperresponsiveness إلى مهيّجات تنفسية غير نوعية مثل الدخان، الهواء البارد، الروائح وغيرها. حيث تعتبر هذه خاصية مميزة يمكن أن يتم اختبارها بواسطة اختبار الإثارة القصيبية bronchoprovocation test بالهستامين أو الميتاكولين [2].

يترافق الربو الأرجي مع ازدياد المستويات الكلية الجائلة من IgE النوعية. يمكن أن يشاهد ارتفاع عدد الحامضات Eosinophils في الدم وكذلك في المخاط القصبي وسائل غسل القَصَبات و الأسناخ bronchoalveolar lavage fluid. تزداد أعراض الربو و/أو نوبات الربو عند استنشاق المهيجات، ولكن يمكن لها أن تستديم بغياب وجود المهيجات. يعاني العديد من المرضى من تفاقم انسداد المجرى التنفسي والأعراض بعد أداء التمارين. يعاني البعض من هجمات ربو حادة بعد تناول مضادات الالتهاب غير الستيروئيدية (NSAIDs) Non-steroidal anti-inflammatory drugs مثل الأسبرين [4].

## 3-1- الربو علاجياً

لا يوجد علاج متوفر للربو، يخضع معظم المرضى إلى معالجة انشاقية inhalation therapy. بالمقابل، يبقى الربو غير مضبوطاً عند العديد من المرضى الذين يعانون من ربو حاد أو المرضى غير الملتزمين بعلاجهم، النوبات القصيرة للربو تستجيب عادة وبشكل جيد إلى استنشاق  $\beta_2$  agonists [4].

الربو المستديم Persistent asthma يستجيب عادةً إلى الكورتيكوستيروئيدات المستنشقة corticosteroids. يمكن إضافة ناهضات اللوكوترئين Leukotriene-antagonists والثيوفيلين theophylline، و ضد المستضد IgE (anti-IgE-antibodies) و مُضاد الفعل الكوليني anticholinergic في الحالات الحادة والمعقدة [4].

#### 4-1- أسباب الربو

ترجع أسباب الإصابة بداء الربو إلى مجموعة من العوامل البيئية والجينية المعقدة وغير المفهومة بشكل تام وتؤثر هذه العوامل على حدة المرض والاستجابة للعلاج [5,6].

##### 1-4-1 العوامل البيئية

تترافق العديد من العوامل البيئية بتطور وتفاقم مرض الربو، وتتضمن: المهيجات والمستأرجات الهوائية aeroallergens، دخان التبغ، المواد الكيميائية ومواد احتراق الوقود في المركبات [7].

لكن تبقى المعطيات المتوفرة غير واضحة حول جدوى التخفيف من التعرض للمهيجات على تحسين اختبارات وظيفة الرئة وتخفيض الالتهاب في المجرى الهوائي والتفاعلية في القصبات [8].

يمكن للملوثات pollutants في الهواء الطلق أن تثير نوبة الربو مثل غبار الطلع، بويغات العفن mold spores والهواء الملوث. في العقود الماضية ترافقت المستويات العالية من المواد الكيميائية في الهواء بزيادة قصيرة الأمد في معدل انتشار الربو ومعدل الوفيات [8,9].

يمكن للملوثات الهوائية الخطرة الأخرى، وكذلك الملوثات الصناعية من المركبات العضوية المتطايرة والأيزوسيانات isocyanates أن تقدر زناد الربو [8].

تؤكد معظم الدراسات أن العوامل المشاركة الأخرى، مثل الفيروسات يمكن أن تزيد اختطار تفاقم الربو عبر التفاعل مع المهيجات [10].

عموماً، يجب الوقاية من المهيجات البيئية والمثيرات كأحد الأهداف الرئيسية لتدبير الربو. بالإضافة إلى ذلك ينبغي أن يكون الأطباء على دراية تامة حول الملوثات الهوائية الشائعة التي قد تؤثر على مرضى الربو.

يمكن لشروط الطقس السيئة وتغيرات المناخ أن تقدر زناد الربو عند بعض الأشخاص. أيضاً يمكن للبرد الشديد، الحر الشديد، ارتفاع الضغط الجوي أن يثير نوبة الربو [8].

أخيراً، يمكن للمعيشة في بعض المناطق حيث حرائق الغابات شائعة أثناء أشهر الصيف أو عندما تتقلب درجات الحرارة خلال أشهر الشتاء أن تثير نوبة الربو كنتيجة لنقص جودة الهواء [8].

#### 2-4-1- العوامل البيئية وبدء هجمة الربو

يعتبر التحسيس Sensitization للمهيجات في الهواء الخارجي عامل اختطار في تطور الربو الأرجي. يعد تلوث الهواء متورطاً كأحد العوامل المسؤولة عن الزيادة المتسارعة في وقوع incidence الربو، الأدلة على ذلك كثيرة لكن تبقى الصعوبة في الفصل بين الربو الأرجي والربو غير الأرجي. تشير الدراسات أن الأطفال الذين يعيشون قرب مركز المدينة يملكون معدلات أعلى للأزيز والربو المشخص [11].

يملك الأشخاص الأرجيون خطورة أكبر لتأثيرات المواد الكيميائية، يبدو هذا التأثير من خلال التواسط المشترك للمهيجات والعوامل الجينية.

#### 3-4-1- العوامل الجينية

##### انتقال الربو بالوراثة

تمثل القصة العائلية للمرض عامل اختطار للإصابة بمرض الربو، حيث يتضمن تأثير العديد من الجينات. على سبيل المثال الأطفال لأمهات مصابات بالربو يملكون نسبة أرجحية odds ratio (OR) حوالي 3 للإصابة بالربو. في حين يؤثر الآباء بشكل أقل: OR حوالي 2.5 [12,13].

المعطيات المتوفرة بالنسبة للبالغين حول بدء الربو هي أقل توفراً، ولكن من المؤكد أن العوامل الجينية تلعب دوراً واضحاً في تطور الربو<sup>[13]</sup>.

في السنوات الماضية حققت الأبحاث حول الربو تقدماً ملحوظاً، حيث تم فك لغز العديد من الجينات، تأثيرات جين-جين، تأثيرات بيئة-جين. إن التحدي القادم هو أن يتم أن جمع هذه المعطيات لكي تصبح الصورة أوضح<sup>[13]</sup>.

#### 1-4-4- الجينات المترافقة مع مرض الربو

في البداية توجهت الدراسات حول البحث عن جين واحد لتفسير الربو، حيث تم استخدام مقاربات الجين المرشح candidate-gene approaches ودراسات الارتباط linkage studies والتتسيل cloning للعديد من الجينات المرتبطة بالربو. بنهاية عام 2008 كان قد تم اكتشاف 30 جيناً مرتبطاً بالإصابة بمرض الربو<sup>[14]</sup>.

الربو هو مرض معقد يملك العديد من الأنماط الظاهرية السريرية المختلفة ويحدد بالعديد من الآليات البيولوجية المختلفة والتي تتورط بها العديد من الجينات. على سبيل المثال يشفر جين STAT6 لعامل انتساخ transcription factor مسؤول عن تمايز الخلايا التائية Th تم توصيف ارتباطه بالمستويات المصلية الكلية للضد IgE<sup>[15]</sup>.

يمكن تصنيف الجينات المرتبطة مع الربو من الناحية الوظيفية إلى عدة أنواع (الجدول 1):

الجدول (1): الجينات المرتبطة مع الربو من الناحية الوظيفية [15]

الجينات المرتبطة مع الربو من الناحية الوظيفية	
FcεR1 IL-4 STAT6	الاستجابة المتواسطة بالخلايا Th2
IL-18 TNFα	الالتهاب
CD14 HLA class II genes	التحسيس البيئي، مستقبلات المناعة الطبيعية للمكروبات
ADAM33	تغيير البنية في الطرق الهوائية
CHRNA3/5 NOS1	التضييق القصبي
CC16	الخلل الوظيفي في الحواجز الظهارية

### 1. Disintegrin and Metalloprotease33 (ADAM33).

وهو أحد أفراد عائلة بروتينات "A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM)" والذي يتوضع الجين المعبر عنه على المنطقة 20p13، تم تحديده على أنه جين مؤهب للربو. تمت دراسة هذا الجين بشكل واسع وهو مؤلف من 14119 زوج أساس، 22 اكسون و 21 انترون [81]. وقد أكدت الدراسات التي جمعت بين الحالات والشواهد والتاريخ العائلي وجود رابط بين ADAM33 ومرض الربو [82]. فضلاً عن ارتباطها بفرط استجابة القصبات الهوائية والتدهور المتسارع في وظائف الرئة، يشير ذلك وبقوة إلى تورطه في المكونات البنيوية للرئة. يضم ADAM33 ما يزيد عن 55 تعدد شكلي، بعضها يؤدي دوراً هاماً في الربو والآثار المتعلقة به.

ترتبط التعدادات الشكلية في ADAM33 بهبوط مترق في حجم الزفير القسري خلال الثانية الأولى من قياس التنفس وهي ليست عوامل اختطار للإصابة بالربو فحسب، وإنما أيضاً للإصابة بالداء الرئوي الانسدادي المزمن (COPD) [83,84].

**2. interleukin- 4(IL-4)**: يتوضع على الصبغي الخامس في الموقع q31 حوالي 32675 زوج أساس، 10 اكسونات و 9 انترونات. إن (IL-4) هو سيتوكين يُفرز من قبل الخلايا التائية المساعدة من النمط الثاني (Th2 cells) والتي تحفز إنتاج الغلوبولين المناعي E (IgE) وتعرض الهجمات المتواسطة بالحامضات ضد المؤرجات. وقد أثبت Chiang et al أن التعداد الشكلي لمعزاز (IL-4) يرتبط بالربو وهو معدل للمرض من ناحية فرط التفاعلية في المجاري الهوائية. تم تحديد 16 تعدد شكلي في الانترلوكين 4 [85-86].

**3.  $\beta$ -chain of the high-affinity receptor for IgE (Fc $\epsilon$ RI $\beta$ )**: يتوضع الجين المعبر عنه على 11q13 بطول 8.74 kb تعتبر مسؤولة عن ردود الفعل الفورية كما نجدها أيضاً على سطح الخلايا البدينة، الأسسات، الحامضات [87]. يؤدي ارتباط المستأرج بالغلوبولين المناعي IgE المرتبط بالمستقبل إلى تحبب الخلية وتخليق وتحرر السيتوكينات والخلايا الالتهابية المفعلة [88].

**4. PDH finger protein 11 (PHF11)**: يتوضع على الصبغي 13q14 ويحوي 10 اكسونات، 9 انترونات و 32973 زوج أساس. يملك PHF11 حوالي 17 تعدد شكلي بعضها مرتبط بالربو [89,90].

**5. CD14.5**: يتوضع جين المستقبل CD14 على الصبغي 5q31.1، يقوم هذا المستقبل عديد السكريد الشحمي بتعديل استجابات كل من Th1-Th2 خلال مرحلة الطفولة المبكرة. وقد تبين وجود ارتباط بين التعداد الشكلي الوظيفي C-159T والربو [91,92].

## 6. عامل النخر الورمي $\alpha$ و $\beta$ (TNF- $\alpha$ and- $\beta$ )

يتوضع جين هذين العاملين داخل منطقة معقد التوافق النسيجي MHC على الموقع 6q21، وهي سيتوكينات التهابية هامة في امراضية للربو. تم ربط تعدداته الشكلية مع كل من الربو الأرجي وغير الأرجي وارتفاع مستويات IgE الكلية المصلية [93.94].

## 7. Transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1)

العامل على الموقع 6q11-q2. يعد هذا البروتين هاماً في الآلية الالتهابية للربو [59].

## 8. Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6)

هذا العامل على الموقع 12q13. وهو أحد أفراد عائلة عوامل الانتساخ (STAT) والتي تلعب دوراً رئيسياً في الاستجابات البيولوجية المتوسطة بالانترلوكين 4 (IL-4) وقد تبين ارتباطه بالربو [96. 97].

## 9. Mast cell chymase (CMA1)

يتوضع جين هذا البروتين على الموقع 14q11.2 ويشفر لبروتياز السيرين المعبر عنه في الخلايا البدينة وهو هام لتعديل الالتهاب في الطرق الهوائية. تم ملاحظة ارتباطه مع الربو ومع مستويات IgE الكلية المرتفعة [99].

## 10. N-acetyltransferase 2 (NAT2)

مسؤول عن الأستلة-N ويؤثر في الحساسية الأرجية. تم ملاحظة ارتباطه بالربو، بمستويات IgE الكلية المرتفعة وبكثرة الحامضات لدى سكان الهند [98].

## 11. (IL-10)

يتوضع جين هذا الانترلوكين على الموقع 1q31-q32. وهو سيتوكين التهابي يتم إفرازه أولاً من الوحيدات والبلاعم ويلعب دوراً رئيسياً في الربو [100].

## 12. (IL-21)

يتوضع جينه على الصبغي 4q26-q27 ويشفر لسيتوكين متعدد الوظائف والذي يتم إفرازه عبر الخلايا التائية المفعلة CD4+ ويؤثر في نمو وبقاء العديد من الخلايا المناعية. وهو ذو دور هام في الربو أيضاً لكونه ينظم إنتاج الغلوبولين المناعي IgE [101].

13. **Chemkine receptor 2 (CCR2)**: يتوضع جين هذا المستقبل على الموقع 3p21.31 ويشفر لأفراد عائلة كبيرة من المستقبلات المرتبطة بالبروتين G ( G protein-coupled receptors) ويلعب دوراً هاماً في امراضية الربو [102].

#### 5-4-1- التآثرات جين-جين

في مرض الربو لا يعتبر جيناً واحداً مسؤولاً عن المرض، على العكس تماماً تتأثر الأشكال المختلفة variants من الجينات فيما بينها معززةً أو مخففة تأثير بعضها البعض على تطور مرض الربو [15]. على سبيل المثال، في دراسة تأثير التعدد الشكلي للانترلوكين IL-4، IL-13، IL-4RA و STAT 6 في مجموعة سكانية ألمانية، من أجل المشاركين في هذه الدراسة كل من هذه التعددات الشكلية له تأثير معتدل على قابلية الإصابة بمرض الربو، بينما تأثيرها معاً يضاعف قابلية الإصابة بالربو 16.8 ضعف [12]. هذا المثال يصور تأثير التآثر بين الجينات المتورطة في أمراضية الربو من مظهر واحد، مثل تنظيم الاستجابات المتواسطة بالخلايا Th2. وبالتالي يوجد العديد من العمليات البيولوجية المتورطة في تطور الربو مثل الاستجابات الالتهابية أو الحواجز الظهارية والأشكال المختلفة من الجينات المسؤولة عن هذه العمليات ستتأثر بين بعضها البعض مؤدية إلى تطور الربو أو مشكلة وقاية منه [12, 16].

#### 6-4-1- التآثرات جين-بيئة

من أجل بعض الجينات التي تملك تأثيراً وقائياً أو ذات اختطار على تطور الربو، فإن النتائج غير متوافقة في الدراسات المختلفة. تشير بعض الدراسات إلى تأثير الاختلافات الجينية والذي بدوره يعتمد على التعرض البيئي والعكس بالعكس. مثال على ذلك تأثيرات التعددات الشكلية في جينات مستقبل CD14 أو في TLR2 والتي تعتمد على الحمل الميكروبي microbial load في البيئة، لذا عند تقييم تأثير الجين على تطور الربو يجب الأخذ بعين الاعتبار تأثير التعرض البيئي [12,16].

## 1-5- تدير الربو

الربو هو مرض التهابي مزمن للطرق التنفسية، يتميز بنوبات من الأعراض مثل عسر البلع، الأزيز، تيبس الصدر و/أو السعال. إن الهدف الأساسي للتوصيات العالمية لتدبير الربو هو تحقيق ضبط للمرض من ناحية الأعراض، وظائف الرئة، والوقاية من تفاقم الربو وتجنب التأثيرات الجانبية للأدوية المعالجة [17,18].

يمكن تصنيف أدوية الربو إلى قسمين:

الأدوية الضابطة Controllers: والتي تؤخذ بشكل منتظم.

الأدوية المخففة Relievers: والتي تؤمن تقييداً سريعاً لأعراض الربو.

الأدوية الضابطة هي الكورتيكوستيروئيدات الانشاقية التي تنهي الالتهاب الربوي في الطرق التنفسية، الموسعات القصبية طويلة المفعول ( $\beta_2$  agonists) والتي تضاف عندما يكون الربو غير مضبوط كفاية. تضم بقية الأدوية الضابطة مضادات اللوكوتريينات، الثيوفيلين، ضد المستضد IgE وحيد النسيلة عند بعض المرضى المصابين بربو وخيم أرجي.

تضم الأدوية المخففة ناهضات  $\beta_2$  سريعة التأثير  $\beta_2$  fast acting agonists توصف في كل خطوة من الربو الوخيم تؤمن هذه الأدوية توسيعاً قصبياً سريعاً خلال فترة قصيرة [17,19].

## 1-6- تشخيص الربو

مع أن الربو مرض معروف جداً، إلا أنه لا يوجد له تعريف متفق عليه عالمياً، ويحدد على أنه "اضطراب التهابي مزمن في الطرق التنفسية تلعب في إحداثه العديد من الخلايا والعناصر الخلوية الأخرى". يرافق هذا الالتهاب المزمن فرط تفاعلية مفرطة للطرق التنفسية والذي يؤدي إلى نوبات متكررة من الأزيز، عسر التنفس، ضيق الصدر والسعال خاصة في فترات الليل والصباح الباكر. عادة ما يرافق هذه النوبات انسداد لتدفق الهواء في الرئة بدرجات متفاوتة والذي كثيراً ما يتراجع تلقائياً أو بالعلاج.

لا يوجد اختبار محدد لتشخيص الربو، وعادة ما يوضع التشخيص بناءً على الأعراض والاستجابة للعلاج مع مرور الوقت ويستخدم مقياس التنفس من أجل تأكيد وجود الربو<sup>[20]</sup>.

### مقياس التنفس

يستخدم هذا المقياس من أجل التشخيص والعلاج ويعتبر الاختبار الأفضل لمرض الربو<sup>[21]</sup>. إذا تحسن حجم الزفير القسري في الثانية الواحدة (FEV1) أكثر من 12% بعد إعطاء الموسعات القصبية مثل السالبوتامول، يكون ذلك مؤكداً للتشخيص. ومع ذلك فقد تكون نتيجة هذا الاختبار طبيعية لمن سبق لهم أن أصيبوا بربو خفيف غير نشط في الوقت الحالي. كما يمكن أن يساعد في التمييز بين مرض الربو والداء الرئوي الانسدادي المزمن (COPD). ينصح بقياس التنفس مرة كل عام أو عامين لمتابعة مدى التحكم بمرض الربو<sup>[21,22]</sup>.

### 7-1- امراضية الربو

إن المعلومات المتوفرة عن امراضية الربو آتية من تحليل الخزعات البشرية human biopsies، سائل غسيل القصبات، القشع sputum، خلايا الدم المحيطية والاستجابة السريرية للأدوية<sup>[23]</sup>. الالتهاب الرئوي للطرق التنفسية من خلال ارتشاح الخلايا و تحرير الوسائط الالتهابية وإعادة البناء remodeling في الطرق التنفسية كلها تمثل امراضية الربو. يبدي الجدار في الطرق التنفسية أذية خلوية والتي تحرض إفراز عوامل النمو والتي بدورها تحرض إعادة البناء خلال الالتهاب المزمن. عملية إعادة البناء تتضمن تقريباً معظم عناصر الجدار الرئوي وتظهر على امتداد الشجرة القصيبية bronchial tree. تتميز هذه العملية بضخامة hypertrophy العضلات الملساء، فرط تنسج الخلايا hyperplasia، ثخانة وتولد الأوعية angiogenesis في الغشاء القاعدي تحت الظهاري. تزيد عملية إعادة البناء في الطرق التنفسية من ثخانة الجدار في الطرق التنفسية مؤديةً إلى انسداد عكوس في المجرى التنفسي و فرط التفاعلية القصيبية وبالتالي تترافق مع وخامة المرض<sup>[24,25]</sup>.

## 8-1- آلية الربو

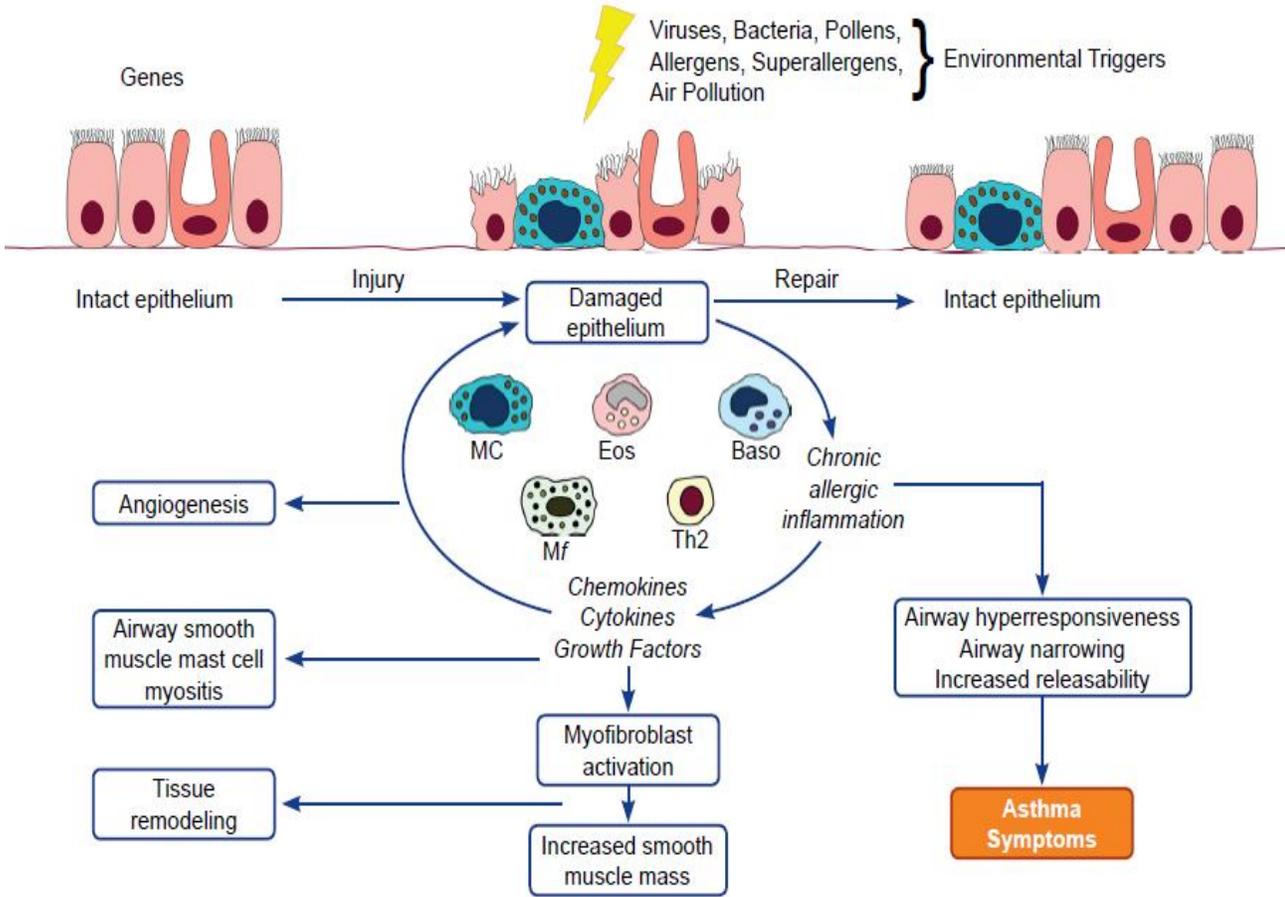
الربو هو مرض التهابي مزمن للطرق التنفسية، تتورط العديد من الآليات الفيزيولوجية المرضية في الربو مؤديةً إلى نوبات ناكسة من التضيق القصبي وتغير في بنية القصبات. عند معظم المرضى السبب الرئيسي للالتهاب هو التحسيس sensitization للمستأرجات المحمولة بالهواء مثل غبار الطلع، ذرات الغبار وغيرها [26]. عند الأشخاص ذوي التأهب الوراثي فإن هذه المستأرجات يتم التقاطها من قبل الخلايا المستأرجة المتغصنة حيث تُعالج وتُقدّم للخلايا للمفاوية وهذا يقدر زناد الاستجابة المناعية المعروفة بالنمط 2 (T helper type 2) مع إنتاج السيتوكينات النوعية مثل IL-4، IL-5، IL-13 من قبل الخلايا للمفاوية التائية [27, 28]. تحفز سيتوكينات الخلايا للمفاوية التائية تشكيل الأضداد النوعية من نمط IgE والتي بشكل لاحق تثبت على سطح الخلايا البدينة والأسسات. تخضع الخلايا البدينة والتي تتواجد بكثرة في السطوح التنفسية والأسسات التي يتم تجنيدها في المخاطية القصبية من الدم إلى تفعيل سريع وكبير بعد أن ترتبط المستأرجات المستنشقة مع سطح IgE [28, 29, 30]. يؤدي زوال التحبب degranulation من الخلايا البدينة والأسسات إلى تحرر وسائط التهابية نشطة جداً مثل الهيستامين، البروستاغلاندينات، اللوكوترينينات و العامل المفعّل للصفائح platelet-activating factor [29, 30]. بعد دقائق من استنشاق المستأرج فإن هذه الوسائط تسبب التضيق القصبي وتولد الوذمة في الجدران التنفسية و تعزز إنتاج المخاط في الطرق التنفسية. بالإضافة إلى هذه الاستجابات السريعة، تحرض السيتوكينات المنتجة من قبل الخلايا للمفاوية التائية نمط 2 والخلايا البدينة تجنيد الحامضات من الدم نحو الطرق التنفسية. يعتبر ارتشاح الحامضات في الطرق التنفسية سمة مميزة للربو الأرجي ويبقى هذا الارتشاح مستديماً على الرغم من زوال أعراض الربو [30].

يمكن للعداوى الفيروسية أن تساهم بتطور الربو من خلال تفعيل الخلايا المناعية الفطرية innate immunity مثل البلاعم والخلايا القاتلة الطبيعية (NK) [31].

تم تمييز نميطات subtypes نوعية من الخلايا اللمفاوية التائية والتي تسمى Th2 و Th17 في طور المزمّن من الربو. تعمل الخلايا Th17 ضد العوامل المُعِية infectious agents ولكنها أيضاً تتفعل عند المرضى المصابين بالربو وتنتج سيتوكينات نوعية والتي بدورها تقدح الزناد لتجنيد العدلات للمخاطية القصبية في الأشكال الوخيمة من الربو<sup>[24]</sup>.

بالإضافة إلى ذلك، فإن الظهارة في الطرق التنفسية ليست ضرورية فقط كحاجز فيزيائي وإنما يمكن لها أن تحرر السيتوكينات المحرّضة بالخلايا Th2 مثل Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) والسيتوكينات الالتهابية pro-inflammatory cytokines مثل  $TNF \alpha$ <sup>[30,31]</sup>.

أيضاً تعتبر خلايا العضلات الملساء للطرق التنفسية لاعباً مهماً في الربو من خلال التعبير عن العديد من جزيئات الالتصاق adhesion molecules ومستقبلات السيتوكينات وتحرير السيتوكينات في الوسط المحيط (الشكل 1).



الشكل (1): الآليات المرضية في الربو. عند ذوي التأهب الوراثي، يمكن للعوامل البيئية مثل المستأرجات، العدوى أو المهيجات أن تحرض الأذية الظهارية التي تؤدي إلى خلل في الاستجابة المناعية. العديد من الخلايا مثل الخلايا التائية (Th2 cells)، الخلايا البدينة (MC)، الحامضات (Eos)، الأسسات (Baso) والبالعات (Mf) كلها يتم تفعيلها عند المرضى المصابين بالربو والوسائط التي يتم إفرازها تعتبر مسؤولة عن استدامة الالتهاب، التضيق القصبي و تعديل بنية الطرق التنفسية

[26]

## 9-1- آلية الالتهاب في الطرق التنفسية

ينجم الالتهاب في الربو عن التفاعل بين العديد من الأنماط الخلوية والوسائط:

### - الخلايا اللمفاوية Lymphocytes

في الربو يوجد إنزباح نحو Th2-cytokine profile. يفسر وجود Th2-cytokines الإنتاج العالي من IgE، وجود الحامضات وتطور فرط تفاعلية الطرق التنفسية، إنخفاض الخلايا المنظمة regulatory T cell (reg Tcell) وكذلك زيادة الخلايا القاتلة NK التي تحرر كميات كبيرة من سيتوكينات Th1 و Th2.

### - الخلايا البدنية Mast cells

يؤدي تفعيل الخلايا البدنية إلى تحرر كميات كبيرة من الوسائط الخلوية (الهستامين، اللوكوتريئينات و البروستاغلاندينات)<sup>[32]</sup>.

### - الحامضات Eosinophils

يوجد أعداد كبيرة من الحامضات في الطرق التنفسية عند معظم الأشخاص المصابين بالربو ولكن ليس كلهم، تحتوي هذه الخلايا على أنزيمات التهابية، تولد اللوكوتريئينات و تعبر عن العديد من السيتوكينات الالتهابية<sup>[33]</sup>.

### - العدلات Neutrophils

يزداد عددها في الطرق التنفسية والقشع عند الأشخاص المصابين بربو وخيم. دورها الفيزيولوجي المرضي غير واضح، تلعب العدلات دور الخلايا المقدمة للمستضد<sup>[33]</sup>.

## - البلاعم Macrophages

هي الخلايا الأكثر عدداً في الطرق التنفسية ويمكن أن تُفعل بواسطة المستأرجات من خلال مستقبل IgE لتحرير الوسائط الالتهابية والسيتوكينات التي تضخم الاستجابة الالتهابية [30].

### 10-1- الأنماط الظاهرية والداخلية للربو Phenotypes & Endotypes of Asthma

يعرف الربو بمحدودية عكوسة للطرق التنفسية (أو فرط التفاعلية القصصية bronchial hyperresponsiveness) ويترافق مع طيف واسع من الأعراض السريرية. على نحو متزايد تم تمييز العديد من السبل الامراضية المستبطنة والمؤدية للتداخل بين التغيرات الفيزيولوجية والتغيرات السريرية للربو [34].

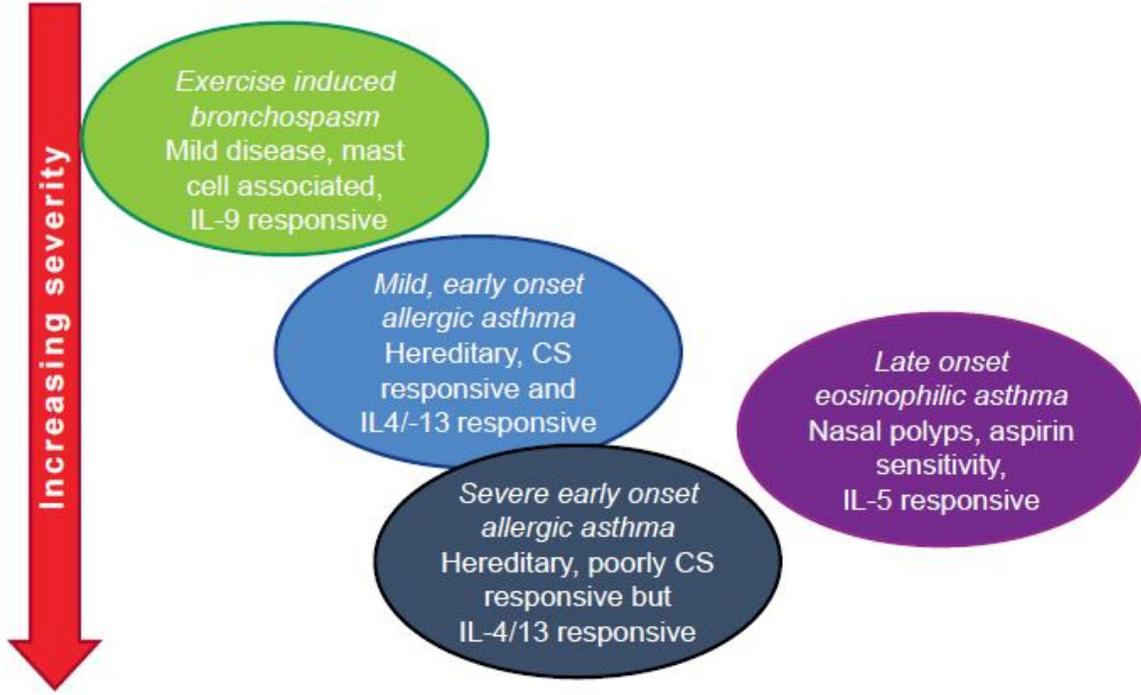
يعرف النمط الظاهري phenotype على أنه المميزات characteristics لدى المرضى والتي تنتج من التفاعل بين العوامل الجينية والبيئية (الشكل 2). تتضمن الأمثلة على ذلك: الربو الأرجي مبكر البدء early onset allergic asthma والربو المتعلق بالسمنة obesity-related asthma [35,36]. في حين يعرف النمط الداخلي endotype على أنه الآلية الإراضية المستبطنة وبشكل كامل، والتي تثبيطها سيؤدي إلى تحسن سريع في النتائج السريرية [35,36].

يصبح النمط الظاهري قريب من النمط الداخلي عند ملاحظة أنه فقط جزء من الربو السريري يترافق مع عملية التهابية مناعية مترافقة مع الخلايا التائية المساعدة نمط Th2-like immunoinflammatory process. يوجد هذا النمط الظاهري الجزيئي Th2-like molecular phenotypes عند فقط 50% من مرضى الربو من الخفيف إلى الوخيم [37,38].

يجمع هذا النمط (Th2-like molecular phenotype) بعض ولكن ليس كل مرضى الربو ذوي الأرجية وأيضاً بعض المرضى الذين يعانون من ربو محرض بالتمرين exercise-induced asthma. بشكل مهم، يتضمن مجموعة المرضى الذين يعانون من الربو البادئ عند البالغين adult onset asthma [37,38].

يستجيب المرضى الذين يعانون من Th2-like molecular phenotypes إلى المعالجة بالكورتيكوستيروئيدات corticosteroid ، في حين تتضمن الواسمات البيولوجية Biomarkers وجود الحامضات في الدم ووجود periostin ويمكن أن يستخدم اختبار اكسيد النتريك في الزفير exhaled nitric oxide لتأكيد وجود هذا النمط. في الواقع يمكن لاستخدام الواسمات الحيوية أن يحسن من قابلية تحري الاستجابة للمعالجة. على أية حال تتفاوت الاستجابة بين المرضى حتى ضمن النمط الظاهري Th2-like molecular phenotypes فبعض المرضى يستجيب بشكل جيد للمعالجة الموجهة بالانترلوكين IL-4/-13 والبعض الآخر يستجيب بشكل جيد للمعالجة الموجهة بالانترلوكين IL-5 [35,36].

يشمل النمط الظاهري الآخر من الربو المرضى الذين لا يبدون أي دليل لوجود الالتهاب المحرض بالخلايا Th2 هذا النمط المسمى (non-Th2) يترافق مع الربو الذي لا يصاحبه وجود الواسمات البيولوجية التي توجد عند النمط Th2-like asthma وهو نمط غير محدد بشكل واضح ويضم مزيج الربو المترافق مع السمنة، الربو المترافق مع العدلات، الربو المترافق مع قلة المحبيبات paucigranulocytic asthma والربو المترافق مع التدخين، وهذه الأنماط تستجيب بشكل ضعيف للكورتيكوستيروئيدات. بشكل عام شدة الربو هي أقل عند هؤلاء المرضى وتقتصر التجارب السريرية أن الربو من النمط Th2-like asthma هو أكثر ميلا للتفاقم [35,36,37].



الشكل (2) الأنماط الظاهرية للربو [34]

الربو المحرض بالتمرين والمترافق مع استجابة IL-9 هو الأقل وخامة بين أنماط الربو، في حين يملك الربو المتوسط ومبكر البدء المترافق مع استجابة IL-4/13 وخامة معتدلة يليه الربو متأخر البدء المترافق مع استجابة IL-5 وأخيراً الربو متأخر البدء الوخيم الأرجي المترافق مع استجابة IL-4/13.

### 11-1- وبائيات الربو Epidemiology

تشير الدراسات الوبائية التي تمت على الربو في مختلف الدول إلى انتشار الأرجية التنفسية بحدود 15-30% [39]. وتأثيرات الربو بمعدل 3.5-20% من السكان في كل دولة [39]. تم توثيق ازدياد في انتشار الربو خلال 25 سنة الماضية وهذا الازدياد معزوه إلى التغيرات البيئية أو في نمط الحياة ولأن التغيرات الجينية تحتاج عدة أجيال لتظهر تأثيراتها. عالمياً، تزداد حالات الربو بمعدل 50% كل عقد، وفقاً لمنظمة الصحة العالمية في عام 2020 سيصبح الربو مع الداء الرئوي الانسدادي المزمن

chronic obstructive pulmonary disease (COPD) السبب الثالث المؤدي للموت<sup>[40]</sup>. تقريباً، 300 مليون شخص في العالم يعانون من الربو (2012) وهناك ربما 100 مليون شخص سيضافون في عام 2025<sup>[41]</sup>.

بشكل مخالف لمعظم الأمراض، انتشار الربو أعلى في الدول المتقدمة مثل الولايات المتحدة، المملكة المتحدة، استراليا، نيوزيلندا وشمال غرب أوربا<sup>[39]</sup>.

يتطور الربو عند حوالي نصف الأشخاص المصابين بالربو قبل سن العاشرة، ومعظمهم تطور الربو عندهم قبل سن الثلاثين. عند الأطفال المصابين بالربو نسبة الذكور المصابين بالربو تعادل الضعف مما هي عند الإناث، ولكن بعد البلوغ الربو أكثر شيوعاً عند الإناث. انتشار الربو هو أكثر شيوعاً في المناطق الحضرية منه في المناطق الريفية. يفاقم الفقر وسوء التغذية الربو عند الأطفال، مؤدياً إلى وظيفة رئوية منقوصة<sup>[41.42]</sup>.

## 2- الفيتامين د

يعتبر الفيتامين د أحد أقدم الفيتامينات، يتم اصطناعه ضوئياً عند كل أشكال الكائنات الحية بدءاً من العوالق النباتية phytoplankton (التي وجدت على سطح الأرض منذ 750 مليون سنة) وانتهاءً بالثدييات. إن دوره في استقلاب الكالسيوم وبناء العظم يبين أهميته للكائنات الفقارية، بينما من غير الواضح لماذا يتم اصطناعه عند الكائنات اللافقارية والنباتات، وذلك يعطي فكرة واضحة عن وظائف أخرى لفيتامين د تتجاوز أهميته في الاستتباب الفسفاتي الكلسي<sup>[43]</sup>.

يتطلب اصطناع الفيتامين د في الجلد هدر كسلة متتابعة في الكبد والكلية، لتحويله إلى الشكل الفعال حيوياً (1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) والذي بدوره يرتبط بالمستقبل النوعي لفيتامين د Vitamin D receptor (VDR)، ينتمي هذا المستقبل إلى عائلة المستقبلات النووية Nuclear Receptor Superfamily. يعتبر (1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) ومستقبله VDR ضروريان

من أجل امتصاص الكالسيوم، البناء الهيكلي و تمعدن المعظم ولكنه أيضاً ضروري من أجل تنظيم نمو الخلية و تثبيط نمو الخلية السرطانية [44].

يعد الفيتامين د من الفيتامينات الذوابة في الدهون وهو ذو وظائف هرمونية بسبب طبيعته الستيرويدية. كما ويلعب دوراً في الاستتباب اليفسافي الكلسي.

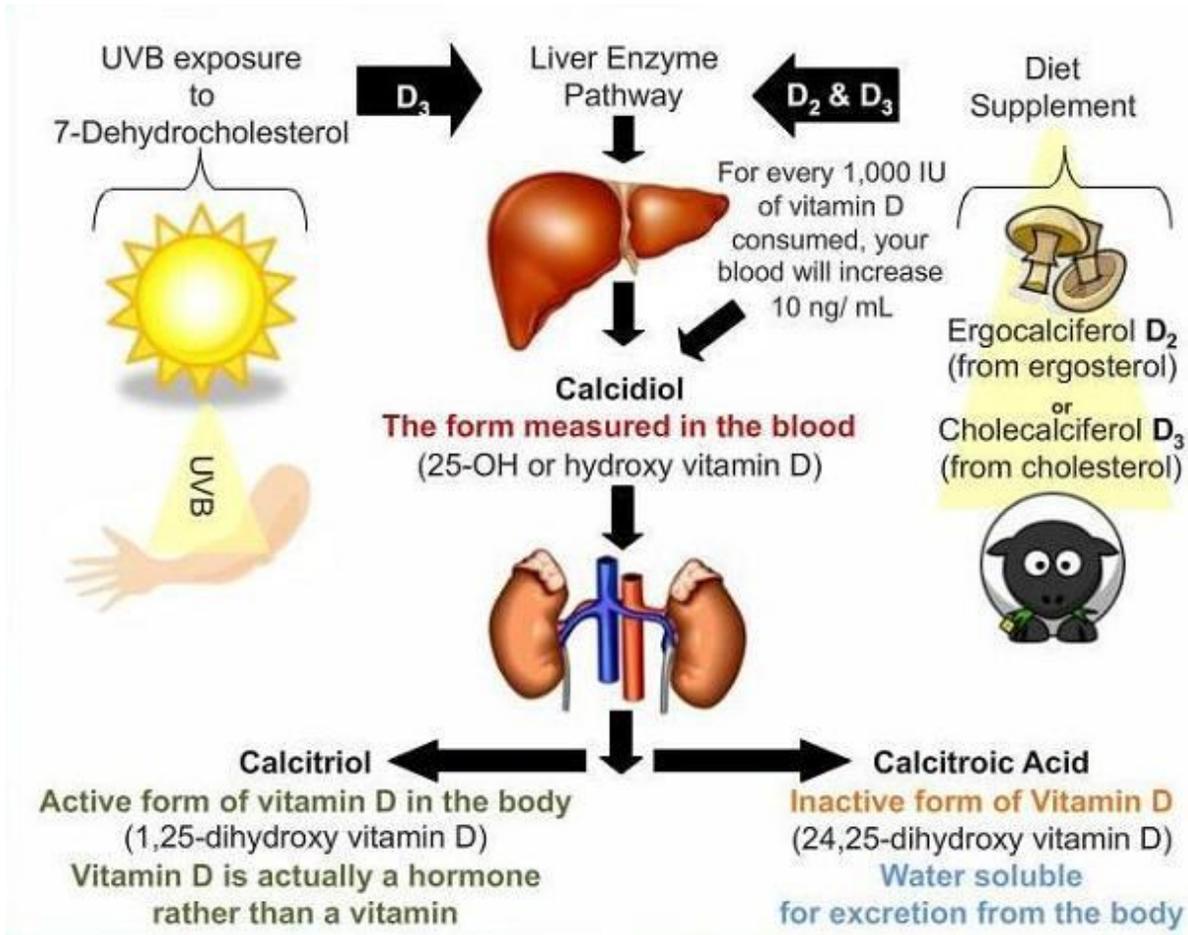
بشكل عام يجري اصطناع مستويات كافية من الفيتامين د في الجلد عند البالغين ولهذا لا يمكن اعتباره فيتاميناً بالتعريف الصارم، وإن المدخول الغذائي يساهم بحدود 10% فقط من الحاجة اليومية. لكن خلال الحمل والإرضاع وكذلك الرضع والأطفال الصغار وخصوصاً في الدول الصناعية حيث يكون التعرض إلى ضوء الشمس محدوداً، وعند الأطفال داكني البشرة يكون اصطناع الفيتامين د في الجلد غير كاف للمتطلبات الفيزيولوجية، في هذه الحالة يكون الوارد الغذائي من الفيتامين د ضرورياً (أكثر من 200-400 IU/اليوم). لذلك يجري دعم الأغذية بالفيتامين د في العديد من الدول [45].

بمجرد أن يدخل الفيتامين د مجرى الدم، سواء كان مصطنعاً في الجلد أو عن طريق الغذاء، فإنه يرتبط مع البروتين الرابط للفيتامين د (Vitamin D binding protein (VDB) وينقل إلى الكبد ثم الكلية ليخضع لعمليات استقلاب إضافية ويعطي الشكل الفعال بيولوجياً  $1\alpha,25-(OH)_2 D_3$  أو الكالسيترول  $D_3$  والذي يلعب دوره عن طريق مستقبل الفيتامين د VDR الذي ينتمي إلى عائلة المستقبلات النووية ويلعب دور عامل انتساخ أيضاً [46]. يعمل  $[1\alpha,25-(OH)_2 D_3]$  كمرسال كيميائي ستيرويدي في العديد من الأنسجة وهو ما يعرف بنظام فيتامين د الصماوي Vitamin D endocrine system [47]. من جهة أخرى تم ربط عوز الفيتامين د مع العديد من الأمراض الشائعة مثل الداء السكري، الأمراض القلبية الوعائية، تخلخل العظام والسرطان [43.48].

## 1-2- اصطناع الفيتامين د

يعتمد اصطناع الفيتامين د عند الحيوان على خطوة أولية معتمدة على ضوء الشمس وهي انفتاح الحلقة العطرية ليتحول طليعة الفيتامين د إلى الفيتامين د (الشكل 3). حيث يخضع 7-ديهيدروكولسيترول (وهو مركب وسيط في اصطناع الكولسيترول يتراكم في الجلد) إلى تفاعل غير أنزيمي عند التعرض إلى ضوء الشمس منتجاً طليعة الفيتامين د. يخضع المركب الأخير إلى تفاعل مصاوغه حراري thermal isomerization في غضون عدة ساعات مشكلاً كوليالكاليفرول والذي يتم امتصاصه إلى مجرى الدم [49,50].

يحتاج الفيتامين د إلى عمليتي هدركلسة متتابعتين في الكبد (على الكربون 25) والكلية (على الكربون 1) ليصبح فعالاً بيولوجياً [51]. تتم الهدركلسة الأولى في الكبد بواسطة هيدروكسيلاز كبدية هي Calcidiol 25-hydroxylase لينتج الكالسيدول أو 25-هيدروكسي كولي كاليفرول وهو الشكل الأكثر تواجداً في الدم عند الثدييات، يتحرر إلى الدوران ليرتبط مع الغلوبولين الرابط للفيتامين د. يتحول 25 H D3 في الكلية إلى الشكل الفعال بيولوجياً للفيتامين د [1,25-(OH)<sub>2</sub> D3] بفعل هيدروكسيلاز كلوية Calcidiol-1-hydroxylase وهو الشكل الأكثر فعالية بيولوجية عند الثدييات أو إلى الشكل المعطل 24-25 ديهيدروكسي فيتامين د بفعل أنزيم Calcidiol-24-hydroxylase. يمكن أن تتم هدركلسة الفيتامين د إلى الشكل الفعال في خلايا أخرى غير الكلية مثل خلايا الجهاز المناعي وخلايا β البنكرياسية [52,53,54].

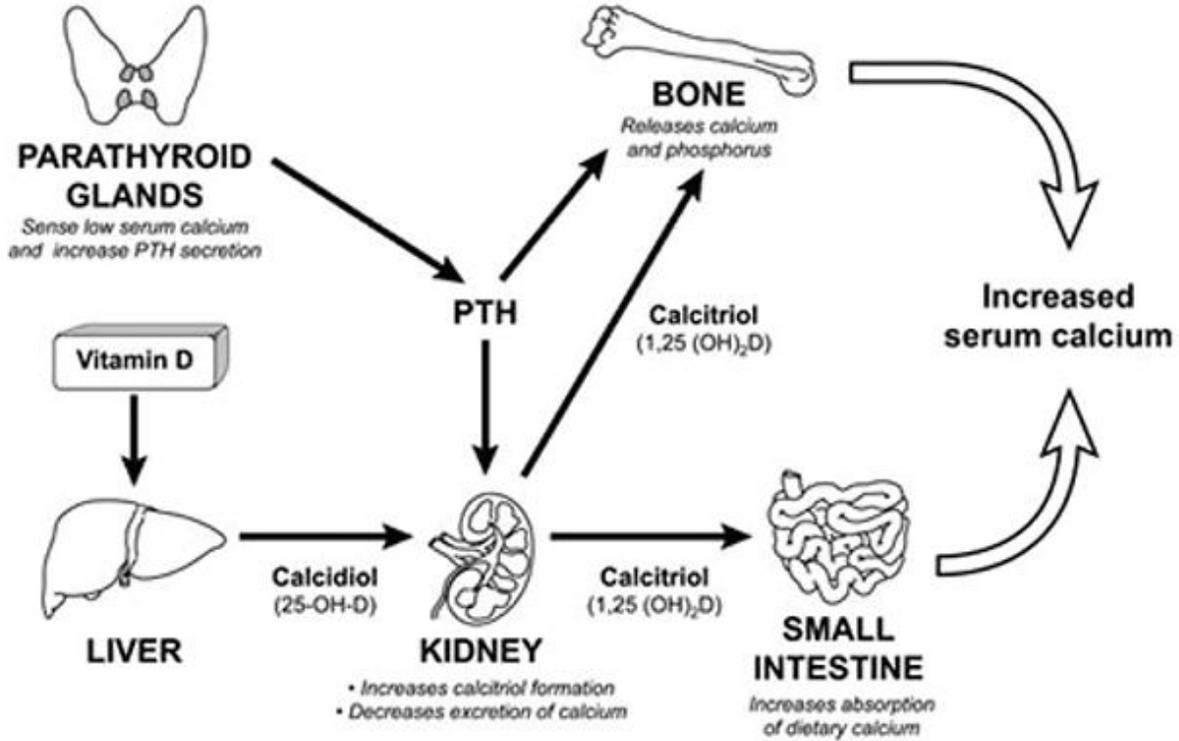


الشكل (3): اصطناع الفيتامين د [52]

## 2-2- تنظيم مستويات الفيتامين د البلازمية

يخضع  $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  لتنظيم محكم بآلية تلقيم راجع صماوي كلاسيكي يضبط تدركه واصطناعه، بحيث تبقى المستويات المصلية من  $1\alpha,25\text{- (OH)}_2\text{ D}_3$  ثابتة تقريباً (الشكل 4) [55]. مثلاً تتحفز فعالية  $1\alpha$  hydroxylase ( $1\alpha$  OHase) الكلوية بفعل التراكيز المنخفضة من الكالسيوم والفسفات وتحت تأثير هرمون الدريقات Parathyroid hormone PTH. كما يتم تنظيم مستويات  $1\alpha$  OHase هبوطاً بالتراكيز العالية من  $1\alpha,25\text{- (OH)}_2\text{ D}_3$ . يتم تعطيل مستقبلات الفيتامين د بفعل الأنزيم 24 OHase والذي ينتج مستقبلات تحتوي على مجموعة هيدروكسيل في الموقع 24 كما تقوض أكثر من ذلك ليتم طرحها في النهاية في البول إما بشكل acid calcitroic

أو مشتقات 23-carboxyl كما يتم تنظيم عملية التقويض هذه بدقة بحيث أن  $1\alpha,25-(OH)_2 D_3$  يحفز التعبير عن 24 OHase لمنع حدوث زيادة في اصطناع الهرمون [52].



الشكل (4): تنظيم مستويات الفيتامين د البلازمية [55]

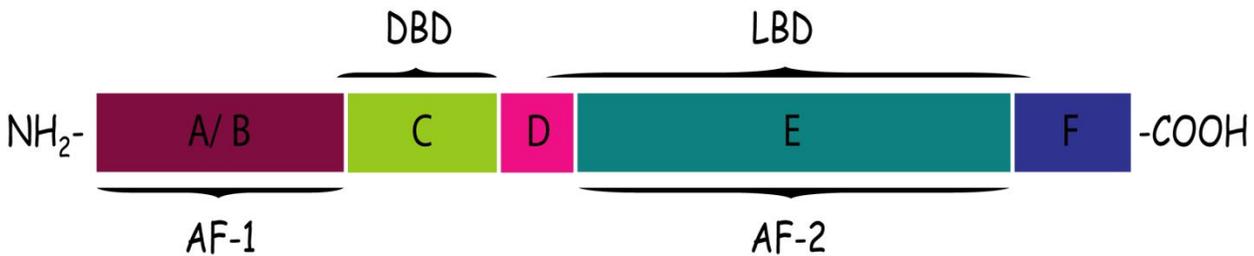
### 3- مستقبل الفيتامين د (VDR) Vitamin D Receptor

ينتمي مستقبل الفيتامين د إلى عائلة المستقبلات النووية Nuclear Receptor Superfamily وهو عبارة عن عامل انتساخ معتمد على اللجين ligand<sup>[55]</sup> ، يتواسط مستقبل الفيتامين د التأثيرات البيولوجية للكالسيترول (الاستتباب الفسفاتي الكلسي والحفاظ على المستوى العظمي)، تتوزع مستقبلات الفيتامين د ليس فقط في الأمعاء والعظم وإنما في العديد من الأنسجة مثل الدماغ، القلب، المعدة، البنكرياس والخلايا للمفاوية T و B<sup>[60,61,62]</sup>.

#### 3-1- بنية مستقبل الفيتامين د

إن مستقبل الفيتامين د (VDR) هو بروتين من 427 حمضاً أمينياً، وهو ذو كتلة جزيئية حوالي 48 كيلو دالتون. يقسم VDR بنيوياً إلى عدة ميادين domains<sup>[63]</sup> (الشكل 5).

يعتبر الميدان A/B أو ما يسمى AF-1 مسؤولاً عن تفعيل الانتساخ. الميدان C وهو الميدان الرابط للدنا (DBD). الميدان D وهو عبارة عن مفصلة hinge تؤمن مرونة ما بين DBD و الميدان الرابط للجين (LBD) أو الميدان E. تحتوي النهاية الأمينية للميدان E على AF-2 وهو ميدان آخر مهم من أجل تفعيل الانتساخ، الميدان F غير محدد.



DBD: DNA binding domain

LBD: Ligand binding domain

AF-1: Ligand independent transactivation domain

AF-2: Ligand dependent transactivation domain

الشكل (5): بنية مستقبل الفيتامين د [63]

### 2-3- الميدان A/B

يتفاوت الميدان A/B كثيراً في أفراد عائلة المستقبلات النووية من حيث الحجم ونوعية الحموض الأمينية، وبشكل غير اعتيادي يكون ميدان النهاية الأمينية A/B الخاص بمستقبل الفيتامين د قصيراً، يعتبر هذا الميدان مسؤولاً عن تفعيل الانتساخ لمستقبل الفيتامين د بشكل مستقل عن اللجين [63,64].

### 3-3- الميدان الرابط للدنا (DBD) DNA binding domain

ينظم مستقبل الفيتامين د الانتساخ من خلال ارتباط VDR مع تسلسلات جينية نوعية على الدنا تعرف بالعناصر المستجيبة للهرمون Hormone Response Elements (HREs). يتواسط الميدان الرابط للدنا DBD ارتباط المستقبل بهذه التسلسلات [52]. إن الميدان الرابط للدنا أو المنطقة C من VDR هي مماثلة لتلك الموجودة بمستقبلات نووية أخرى وهي تتصف بوجود نموذجين رابطتين للزنك يقومان بتوجيه ربط المستقبل مع الدنا النوعي [52].

إن تتالي اللب core في الميدان الرابط للدنا مصون بشدة highly conserved في عائلة المستقبلات النووية، يتألف هذا التتالي من منطقتي إصبع زنك zinc-finger motifs تحتوي كلاً منها على جزيئتي سيستئين مصونتان وهما اللتان تؤمنان ربط ذرة الزنك. تعتبر ثمالات السيستئين وذرات الزنك ضروريتان من أجل الحفاظ على البنية ثلاثية الأبعاد التي تتألف من حلزونين (الحلزون I وII). يعتبر الحلزون I ضروري من أجل ارتباط المستقبل مع العنصر المستجيب للهرمون أما الحلزون II فهو ضروري من أجل عملية تماثر المستقبل receptor dimerization [63,65].

### 4-3- الميدان D

يؤمن الميدان D مرونة بين الميدان الرابط للدنا والميدان الرابط للجين، كما يحتوي هذا الميدان على ser-208 التي تساهم في تثبيت هيئة المستقبل بعد ارتباطه بالجين<sup>[60]</sup>.

### 3-5- الميدان الرابط للجين LBD Ligand Binding Domain

إن الميدان الرابط للجين LBD او الميدان C المطرفي C-terminal LBD هو قطاع كروي متعدد الوظائف globular multifunctional domain وهو ضروري من أجل ارتباط الهرمون كما يتوسط التأثيرات النوعية بين المستقبل والهرمون الخاص به cognate hormone. يحتوي LBD على وظيفة تفعيل 2 معتمدة على اللجين activation function-2 (AF-2) dependent ligand وهي هامة من أجل الانتساخ المفعّل بالجين<sup>[64]</sup>. تشير البنى ثلاثية الأبعاد والتحليل الكيمائية البيولوجية أن LBD قادر على تشكيل ثلاث بنى مختلفة حسب حالة المستقبل الرابط للجين وهذه البنى هي: صميم المستقبل apo receptor (أي المستقبل بدون ارتباط اللجين)، بنية ناهض كامل holo agonist و بنية مناهض كامل holo antagonist (تبعاً لحالة اللجين ناهض أو مناهض)<sup>[65,66, 67]</sup>.

### 3-6- آلية عمل مستقبل الفيتامين د

إنّ مستقبل الفيتامين د البشري (VDR) هو المستقبل النووي الرئيسي الذي يربط الشكل الفعال بيولوجياً للفيتامين د  $[1\alpha,25-(OH)_2 D3]$  ويؤمّن تأثيراته البيولوجية التي تساهم في استتباب تمعدن العظم، إزالة السمية من المركبات خارجية المنشأ exogenous وداخلية المنشأ endogenous، الوقاية من السرطان وتجدد بنية الشعر<sup>[68]</sup>. يعدل مستقبل الفيتامين د المرتبط بالجين من تعبير الجينات من خلال التماثر المتغاير heterodimerization مع مستقبل الريتينويد Retinoid X Receptor RXR وتجنيد المفعلات التشاركية coactivators أو التمايم الكظيمة corepressors<sup>[69]</sup>.

في عملية تنظيم انتساخ الجينات، يرتبط المعقد VDR و RXR بالعناصر المستجيبة للفيتامين د VDREs (Vitamin D responsive elements) ويترافق مع عدد من العوامل المنظمة للانتساخ. تتجذب العديد من المنظمات التشاركية coregulators إلى الميدان AF-2/helix 12 من مستقبل الفيتامين د VDR مثل المفعلات التشاركية للمستقبلات الستيروئيدية steroid receptor coativators مع ناقلة الأستيل للهيستون (HAT) histone acetyl transferase والبروتين المتفاعل مع مستقبل الفيتامين د (DRIP) vitamin D-receptor interacting protein والبروتين المتفاعل مع مستقبلات هرمونات الدرق Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein (TRIP1) الذي يسهل تحضير عملية ubiquitination للمستقبلات النووية من أجل التدرج [70].

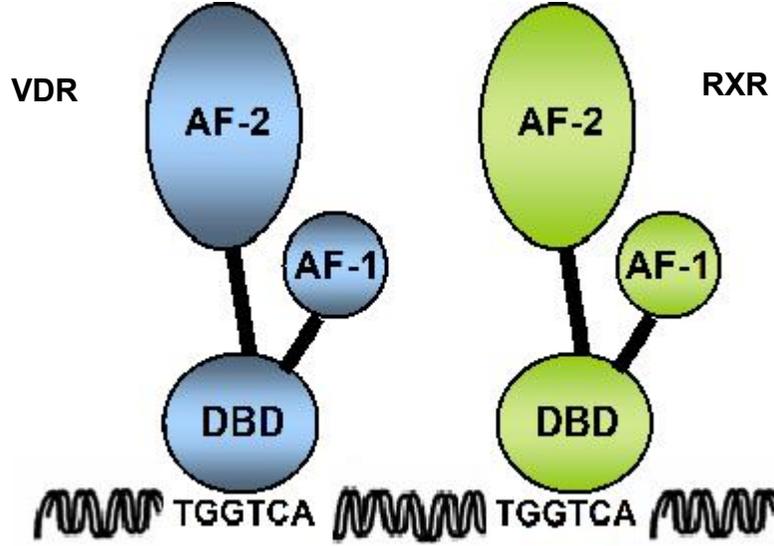
يلعب VDR دور عامل انتساخ يتوسط التعبير عن العديد من الجينات، بغياب اللجين فإن VDR يكون مرتبطاً مع البروتينات المثبطة التشاركية ويقوم هذا المعقد بتنشيط انتساخ الجينات من خلال تنشيط التأثيرات بين الدنا والهيستونات وتكثيف بنية الكروماتين، يرتبط الفيتامين د مع مستقبه VDR بألفة عالية مؤدياً إلى تبدل في هيئة conformation الميدان الرابط للجين، ويصبح أكثر قابلية لربط المفعلات التشاركية بعد انفكاك المثبطات التشاركية [71].

يحرص ارتباط اللجين مع مستقبه VDR ارتباط RXR مؤدياً إلى تشكيل مثنوي متغير heterodimer على (VDRE) Vitamin D response element للجينات التي يتوسط مستقبل الفيتامين د تنظيم انتساخها بشكل مباشر [64].

يعتبر RXR شريكاً إجبارياً لمستقبل الفيتامين د من أجل تنظيم الانتساخ وكما يعتبر المثنوي المتغير RXR-VDR عامل انتساخ فعال وظيفياً للجينات الهدف.

تتألف العناصر المستجيبة للفيتامين د VDREs من tandem hexameric motifs تتوضع بالقرب أو في منطقة المعزاز للجينات الهدف [72]. تتصف VDREs بوجود اثنين من أنصاف الموقع half-sites يتألف كل منهما من تتالي سداسي ترادفي وينفصلان عن بعضهما بثلاثة أسس نكليوتيدية

DR3 . يؤمن هذ الترتيب سطح التآثر الأكثر فعالية للمثنوي المتغاير RXR-VDR . يرتبط نصف الموقع الأول مع RXR في حين يرتبط نصف الموقع الثاني مع VDR (الشكل6) [72].



الشكل (6): ارتباط المعقد RXR-VDR مع العناصر المستجيبة لفيتامين د [72]

تتضمن عملية تنظيم الانتساخ للجينات الهدف المراحل التالية:

1. ينتشر Vit D من السائل خارج الخلوي نحو الغشاء البلازمي مباشرة إلى النواة.
2. في هذه الحالة يكون VDR مرتبطاً مع مستقبله القرين وبشكل اعتيادي.
3. في حين أن المستقبل المرتبط بالدنا يفشل في تفعيل الانتساخ لأنه يشكل معقلاً مع التميم الكظيم corepressor.
4. يلعب هذا المعقد تميم كظيم - مستقبل دور كاظم للانتساخ.
5. ارتباط اللجين مع مستقبله يؤدي إلى انفكاك التميم الكظيم.

6. يصبح المستقبل المرتبط باللجين قادراً على الارتباط بواحد أو أكثر من المفعلات التشاركية coactivators وبألفة عالية مؤدياً إلى تفعيل انتساخ الجين.

#### 4- جين مستقبل الفيتامين د

يتوضع جين مستقبل الفيتامين د البشري (والذي يُرمز لمستقبل الفيتامين د) على الصبغي 12، تم تحديد ذلك باستخدام تقنية Southern blot لخلايا هامستر - بشرية هجينة. تم تحديد الموقع بشكل أدق على الموقع 12q13-14 باستخدام هجائن خلايا جسدية من خلال تقنية in situ hybridization وتحاليل الارتباط Linkage analysis [73].

يمتد جين hVDR على طول 70 kb من الدنا البشري وهو ذو بنية معقدة تشمل 14 اكسوناً يتخللها تتاليات أنترونية يتراوح حجمها ما بين 0.2 إلى 13 kb. إضافة إلى منطقة معزاز promoter توجه الانتساخ لثلاث نسخ على الأقل من VDR mRNA [73,74].

تحتوي المنطقة غير المشفرة على النهاية 5' على اكسونات 1a-f إضافة إلى ثمانية اكسونات إضافية (اكسونات 2-9) والتي تشفر بروتين VDR.

يرمز جين مستقبل الفيتامين د لبروتين من 427 حمضاً أمينياً. التغير من T إلى C في رامزة البدء يؤدي إلى تشكل موقع FokI وانتاج ترجمة في رامزة بدء جديدة منتجا بروتين من 424 حمضاً أمينياً. يرمز الاكسون 2 تتاليات عروة الزنك الأولى في الميدان الرابط للدنا. يرمز الاكسون 3 تتاليات عروة الزنك الثانية. غالبية الميدان الرابط للدنا يتم ترميزه بواسطة الاكسون 8 و 9 (الشكل 7) [73,74].



الشكل (7): جين VDR البشري، تمثل الاكسونات الأشكال المظلمة بينما تمثل الانترونات الأشكال الفارغة [74]

#### 1-4-1-1-4 التعددات الشكلية Polymorphisms

##### 1-1-4-1-1-4 تعريف التعدد الشكلي

التعدد الشكلي هو عبارة عن تبدل جيني في تتاليات الدنا، يحدث عادة في مجموعة سكانية معينة ويظهر بنسبة 1% على الأقل من السكان. يمكن أن تمتلك هذه التغيرات في تتالي الدنا والتي تعرف بالتعددات الشكلية تأثيرات بيولوجية حقيقية. وفرة التعددات الشكلية في الجينوم البشري وتواترها العالي عند المجموعات البشرية يمكن أن يشكل أهدافا لشرح الاختلاف في اختطار الأمراض الشائعة [73,74].

يمكن أن تحدث التعددات الشكلية في المناطق غير المرمزة من الدنا وبالتالي لا تؤدي إلى تغيير في المنتج البروتيني. كما يمكن أن تحدث في المناطق المرمزة من الدنا مؤدية إلى تبدلات في تتالي البروتين ومع ذلك يمكن حدوثها في المناطق المرمزة من دون أن يطرأ تغيير على تتالي البروتين في هذه الحالة تسمى التعددات الشكلية المرادفة synonymous polymorphisms. يمكن للتعددات الشكلية أن تخلق أو تلغي مواقعاً لأنزيمات الاقتطاع، وبالتالي يمكن تحري هذه التعددات الشكلية من خلال تحري تعدد أشكال الشداف مقيدة الطول (RFLPs) restriction fragment length polymorphism [75 و76].

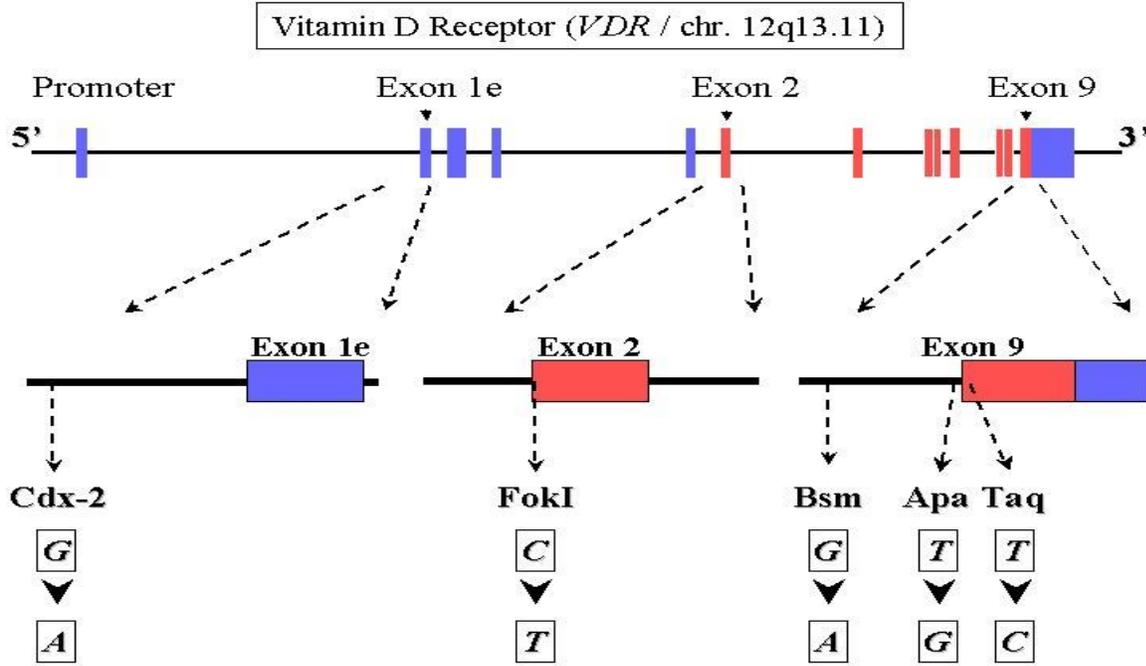
#### 2-1-4- linkage disequilibrium اختلال التوازن الارتباطي

يشرح اختلال التوازن الارتباطي (LD) Linkage disequilibrium العلاقة أو الوجود المتزامن (co-occurrence) لألائل التعددات الشكلية مع بعضها البعض. من الناحية العملية، يُنبأ وجود أحد التعددات الشكلية بوجود تعدد شكلي آخر مجاور، لأنه إمكانية حدوث تأشيب بين التعددين الشكلين قليلة عبر الزمن ومن جيل لآخر [73,74]. يترافق وجود مستويات عالية من اختلال التوازن الارتباطي في منطقة معينة مع عدد محدود من الأنماط الفردانية haplotypes في هذه المنطقة [72].

تعتبر الأنماط الفردانية قوالب blocks لألائل التعددات الشكلية المتجاورة، أظهرت دراسة التعددات الشكلية في الجينوم البشري أن مثل هذه الأنماط الفردانية تتواجد في الجينوم. يمكن لحجم القالب أن يتراوح بين 10 إلى 20 kb [78]. من الناحية العملية، تعتبر دراسة الأنماط الفردانية واختلال التوازن الارتباطي لجين معين مهمة من أجل تحاليل الارتباط لفهم كيف يؤثر تنوع التعدد الشكلي polymorphic variation في هذا الجين في اختطار مرض معين. عندما يترافق أليل معين مع الإصابة بمرض ما فإنه من الممكن إيجاد علاقة واضحة بين الأليل وهذا المرض أو يتم الربط بين هذا المرض وألائل أخرى تقع ضمن النمط الفردي. بمجرد معرفة أي من الأنماط الفردانية تحمل الأليل المترافق مع المرض فإنه يمكن من خلال تحاليل البيولوجيا الخلوية وتحاليل البيولوجيا الجزيئية الوظيفية معرفة أي من التنوعات الأليلية للنمط الفردي تسبب هذا التأثير [72,77,78].

#### 3-1-4- التعددات الشكلية لجين مستقبل الفيتامين د

جمعت المعلومات المتوفرة عن التعددات الشكلية في جين VDR من خلال تحليل مناطق محدودة من الجين باستخدام تقنيات مثل التقصي بواسطة إنزيمات الاقتطاع مثل *BsmI*، *ApaI*، *EcoRV*، *TaqI* و *Tru9I* (الشكل 8) [72].



الشكل (8): بنية جين مستقبل الفيتامين د ومواقع التعددات الشكلية المعروفة [72]

تتمثل الحالة الخاصة باكتشاف *FokI* RFLP حيث تمت ملاحظة وجود موقعين مختلفين لبدء الترجمة (ATG) وبمقارنة التتاليات لوحظ وجود تعدد شكلي T إلى C أي (ATG إلى ACG). وبالتالي يمكن أن يتشكل بروتينين مختلفين: النسخة الأطول من بروتين *VDR* أو ما يسمى T-allele أو allele "f" وبروتين أقصر بثلاثة حموض أمينية أو ما يسمى C-allele أو allele "F". هذه الحالة الوحيدة التي تشكل تعدد شكلي على مستوى بروتين *VDR* [72,76].

تنقصى الإنزيمات *BsmI* و *ApaI* عن وجود تعددات شكلية في منطقة الانترون، أما الإنزيم *TaqI* فإنه ينقصى عن وجود تعدد شكلي في منطقة الاكسون وهذا التعدد شكلي عبارة عن تبدل صامت في الأساس (من T إلى C) على الراموز 352 (من ATT إلى ATC) وكلتا الرامزتين تعطي نفس الحمض الأميني إيزولوسين isoleucine في المنتج البروتيني [79]. تتوضع هذه التعددات الشكلية

الأخيرة بالقرب من بعضها البعض على النهاية `3 لجين VDR وهي ذات ارتباط قوي مع poly A- tract على الاكسون 9 .

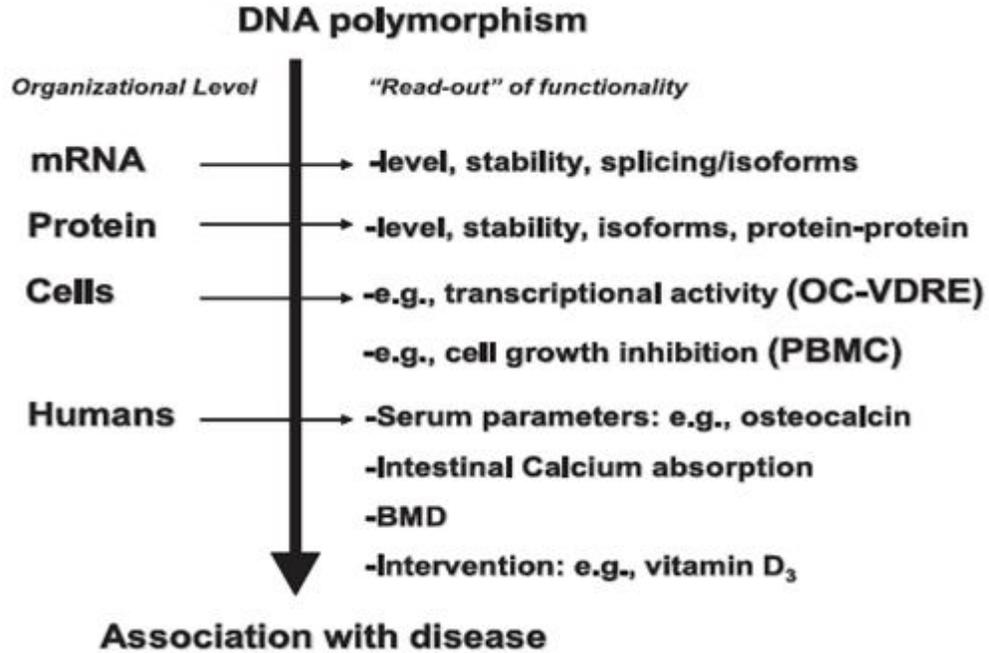
تم تحديد العديد من التبدلات الشكلية الأخرى باستخدام تقانات السلسلة sequencing حيث وجد تبدل من C إلى T بالقرب من الاكسون 2 بالإضافة إلى وجود إدخال/حذف G بعد الاكسون 7 . كما تم تحديد التعدد الشكلي *Cdx2* الذي يسبب تبديلاً من G إلى A في منطقة المعزاز لجين VDR. يقع هذا التبدل ضمن المنطقة الرابطة لعامل انتساخ معوي نوعي يسمى *CDX2* وإن وجود هذا التبدل يسبب وجود موقع ربط معيب لهذا العامل وبالتالي تناقص مستويات VDR المعوية وأيضاً يتناقص امتصاص الكالسيوم في الأمعاء. [70,74,75]

تم توثيق وجود 13 تعدداً شكلياً على النهاية غير المترجمة `3 بمعدل 1 كل 300 bp. كما تم توثيق اختلافات في طول poly A-tract حيث يتراوح عدد ثمالات A بين 12 إلى 18 ثمالة أدينوزين بين الأليلات [72].

#### 4-1-4- وظائف التعددات الشكلية في جين VDR

إن معظم التعددات الشكلية غير وظيفية ولن التفسير الأكثر احتمالاً لوجود ترافق ملاحظ هو افتراض وجود تنالي وظيفي حقيقي في مكان ما على الجين يرتبط مع التعدد الشكلي الملاحظ [72].

تمت العديد من الدراسات على جين VDR لتحديد وظائف التعددات الشكلية باستخدام متثابتات بيولوجية مختلفة ودراسة تعددات شكلية خفية anonymous polymorphisms مثل *BsmI* RFLP، الأنماط الفردانية *Bsm-Apa-Taq* و *polyA VNTR*، هذه الدراسات تمت في الزجاج *in vitro* وفي الكائن الحي *in vivo*، يوضح الشكل (9) المستويات التي يمكن للتعددات الشكلية في جين VDR أن تؤثر بها، على سبيل المثال يمكن أن تؤثر التعددات الشكلية على عدة مستويات: مستوى mRNA، مستوى البروتين أو مستوى الخلية [72].



الشكل (9): المستويات المختلفة لتأثير التعددات الشكلية لجين VDR على الوظائف البيولوجية وكيفية ربطها مع الأمراض [72]

OC-VDRE= osteocalcin vitamin D responsive element.  
PBMC= peripheral blood mononuclear cel

#### 5-1-4- العلاقة بين التعددات الشكلية *TaqI*، *BsmI*، *Apal* لجين VDR ومرض الربو

تعتبر التعددات الشكلية *TaqI*، *Apal*، *BsmI* لجين VDR الموجودة في منطقة الانترون 8/الاكسون 9 على النهاية 3' لجين VDR على التوالي من أكثر التعددات الشكلية دراسةً، يوجد علاقة LD واضحة بين هذه التعددات الشكلية والمنطقة المنظمة على النهاية 3' لجين VDR، تحتوي هذه المنطقة على UTR التي سبق وتم تحديد العديد من التعددات الشكلية التابعة لها، يمكن من خلال وجود LD قوي تفسير الترافق الملاحظ مع التعددات الشكلية *TaqI*، *BsmI*، *Apal* ومرض الربو [58]. بشكل عام تعتبر المنطقة UTR 3' مسؤولة عن تنظيم التعبير عن الجينات من خلال تنظيم ثباتية mRNA [120]. يتم التعبير الواسع الانتشار لجين VDR في العديد من الخلايا المناعية مثل

الخلايا المتغصنة [105]، الخلايا البدينة [106] وخلايا T و B المفعلة [105,107] وهذا يجعله معدلاً مناعياً أساسياً immunomodulator central، وبالتالي يمكن له أن يعدل كلتا الاستجابة المناعية الفطرية والمكتسبة [58].

تقترح البيانات التجريبية أن تفعيل VDR يؤدي إلى استجابات مناعية مختلفة من خلال تنظيم توازن سيتوكينات Th1/Th2 وخفض إنتاج سيتوكينات Th2 (IL-5، IL-10) [117]، ونثبيط إنتاج البلاعم للانترلوكين 12 وكذلك تثبيط إنتاج اللمفاويات في الدم المحيطي للانترفيرون  $\gamma$ ، علاوة على ذلك تم إثبات التعبير عن VDR في الخلايا المتغصنة والبالعات المفعلة من خلال تقييد الاستجابة الالتهابية وتخفيف وخامة الأنماط الظاهرية الأرجية [56,57]. إضافة إلى دوره في التنظيم المناعي تم إثبات تأثيرات جين مستقبل الفيتامين د على بنية ووظيفة الرئة وكذلك تأثيره على الظهارة التنفسية وخلايا العضلات الملساء للقصبات وهذا يدعم الدور المهم لمستقبل الفيتامين د في تنظيم المناعة [118]. لذا فإن VDR هو جين مرشح لدراسة ترافقه مع مرض الربو والذي يتميز بفعالية مفرطة للخلايا Th2 .

لوحظ أن الأشكال المختلفة Variants لجين VDR تترافق مع الأمراض المتوسطة بالمناعة والتي تتصف بخلل في تطور helper T-cell [107]. تشير الدراسات السابقة إلى أن التعدادات الشكلية في منطقة الأنترون 8 والاكسون 9 في جين VDR تملك تأثيراً على التعبير عنه [108]. أثبت ذلك من خلال استخدام recombinant VDR luciferase reporter gene حيث لوحظ ترافق بين هذه التعدادات الشكلية وثباتية VDR mRNA [109]. وبالتالي فإن هذه التعدادات الشكلية تؤثر على الجملة المناعية من خلال تنظيم التعبير عن مستويات VDR [110].

درست العديد من الدراسات الترافق بين التنوع الجيني لجين مستقبل الفيتامين د ومرض الربو في العديد من المجتمعات التي تنتمي إلى مجموعات عرقية مختلفة [112,119]. معظم التعدادات الشكلية هي تلك المتوضعة في الانترون الأخير (BsmI، ApaI) والاكسون الأخير (TaqI) من الجين، يمكن لهذه التغيرات الجينية أن تؤثر على ثباتية VDR mRNA وفعالية الترجمة وانتساخ الجينات

الهدف [120]. أثبتت دراستان في مجموعتين سكانيتين من أمريكا الشمالية ودراستين في مجموعتين  
سكانية صينية وتونسية وجود ترافق يعتد به بين واحد أو أكثر من التعددات الشكلية ومرض الربو  
[107, 112, 121]. في حين لم تجد دراسات أخرى تمت على مجموعة سكانية أمريكية [122] من أصول  
أفريقية وأخرى تمت على مجموعة سكانية ألمانية أي ترافق مع مرض الربو [113]. درست معظم هذه  
الدراسات التعددات الشكلية في جين مستقبل الفيتامين د كعوامل مستقلة من أجل قابلية الإصابة  
بمرض الربو. بشكل مهم أظهرت دراسة حديثة درست تأثير التعدد الشكلي *Taq1* والتعدد الشكلي  
*Bsm1* أن هذا التأثير يمكن أن يكون مُعدلاً من خلال تأثير العوامل البيئية مثل التراكيز المصلية  
للفيتامين د 25(OH)D [123]، أظهرت دراسات أخرى وجود ترافق بين التعددات الشكلية وأمراض  
المناعية الذاتية وأنماط مختلفة من السرطان [124].

أظهر Raby وزملاؤه (2004) أن هذه التعددات الشكلية تتوافق مع الربو وبشكل معقد [111].  
أثبت Poon وزملاؤه (2004) أن الأليل T في *Taq1* والأليل a في *Apal* تتوافق مع الربو في  
مجموعة سكانية أمريكية [107]. أظهر محمد كاظمي عربابادي (2010) وجود ترافق بين التعدد  
الشكلي *Taq1* وليس *Apal* مع مرض الربو في مجموعة سكانية إيرانية [110]. أظهر Saadi  
وزملاؤه (2009) أن الأليل *Apal-(A)* فقط يتوافق مع الربو في مجموعة سكانية صينية [112].

وبالتالي من الممكن للتعددات الشكلية *Apal*، *Bsm1* أن تكون مهمة في مرض الربو من خلال  
تأثيرها على التعبير عن VDR. من جهة ثانية أظهر Vollmert (2004) وزملاؤه أنه لا يوجد ترافق  
بين التعدد الشكلي *Fok1* ومرض الربو في مجموعة سكانية ألمانية [113] وأخيراً أظهر  
Papadopoulou وزملاؤه (2015) أن التعدد الشكلي *Taq1* فقط يتوافق مع مرض الربو في مجموعة  
سكانية قبرصية [116].

## الدراسة العملية

## 1-مسوغات الدراسة

تبين في دراسات حديثة أن لبعض التعددات الشكلية في جين مستقبل الفيتامين د علاقة ارتباط مع مرض الربو وحيث أنه لا توجد دراسة مماثلة في سورية فقد دفعنا ذلك لإجراء دراسة على عدد من مرضى الربو والبحث عن تعدد شكلي في جين مستقبل الفيتامين د يملك علاقة ارتباط مع مرض الربو.

## 2-تصميم الدراسة

صممت الدراسة على أنها: Case Control Study .

## 3- هدف الدراسة

هدفت الدراسة إلى تحديد ارتباط ثلاثة تعددات شكلية في جين مستقبل الفيتامين د مع مرض الربو عند مرضى سوريين من خلال:

- تحديد النمط الجيني والتواترات الأليلية للتعدد الشكلي *Apal* لجين مستقبل الفيتامين د باستخدام أنزيم *Apal* عند كل من مرضى الربو وعند الأصحاء.
- تحديد النمط الجيني والتواترات الأليلية للتعدد الشكلي *BsmI* لجين مستقبل الفيتامين د باستخدام أنزيم *BsmI* عند كل من مرضى الربو وعند الأصحاء.
- تحديد النمط الجيني والتواترات الأليلية للتعدد الشكلي *TaqI* لجين مستقبل الفيتامين د باستخدام أنزيم *TaqI* عند كل من مرضى الربو وعند الأصحاء.
- دراسة وجود ارتباط هذه التعددات الشكلية الثلاثة مع مرض الربو.

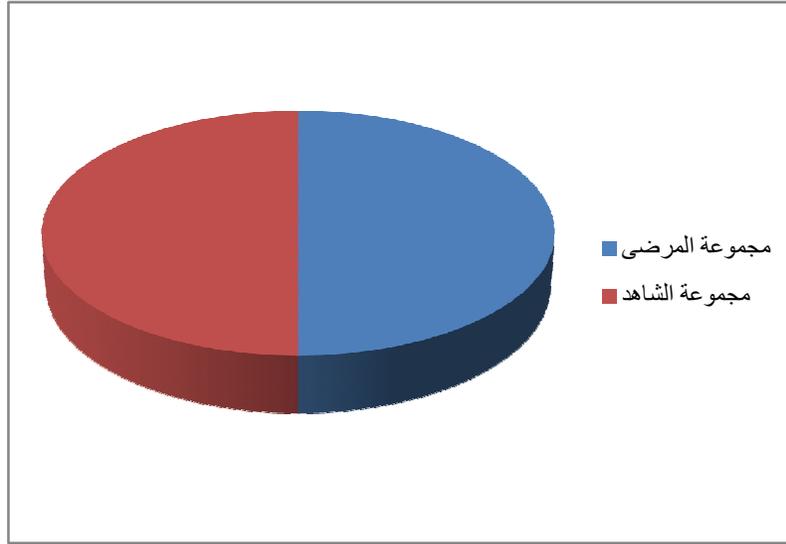
## 4- مجموعات الدراسة

شملت الدراسة 100 متطوع تم تقسيمهم إلى مجموعتين (الشكل 10).

مجموعة المرضى وتضم 50 مريض مصاب بالربو (16 من الذكور و34 من الإناث) لا توجد أي علاقة فيما بينهم تراوحت أعمارهم بين 25-79 سنة تم اختيارهم بناءً على سجلات المرضى حيث

شُخص الربو عندهم من خلال تحديد قياس وظائف الرئة باستخدام قياس النَّفُّس spirometry وتم جمع العينات في الفترة الممتدة بين شهر تشرين الأول 2011 حتى حزيران 2012 في المراكز التالية:

- مستشفى الأسد الجامعي.
- مستشفى الموساة.



الشكل (10): توزيع مجموعات الدراسة

المجموعة الشاهدة وتضم 50 شخصاً شاركوا بالدراسة (14 من الذكور و36 من الإناث) لا توجد أي علاقة فيما تراوحت أعمارهم بين 18-77 تم انتقائهم من نفس المنطقة وبحيث تكون معايير العمر والجنس والحالة الاقتصادية الاجتماعية متقاربة مع المرضى.

#### معايير الاستبعاد

- استبعدت العينات التي ظهر بينها صلة قري في كل من المجموعة الشاهدة ومجموعة المرضى.
- تم استبعاد النساء الحوامل، المدخنين، المصابين بالسكري، مرضى الضغط، التهاب المفاصل والأمراض الأخرى في كل من المجموعة الشاهدة ومجموعة المرضى.

## 5- الاعتيان

بُزل 3 مل من الدم الكامل على أنابيب EDTA من كل متطوع، ثم وزعت إلى 3 أنابيب إيبيندروف غُلفت بالبارافيلم وحفظت بالدرجة -20 من أجل معاملة لاحقة.

## استمارة المريض

اعتمدت الاستمارة التالية لكل من مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للمشاركين بالبحث:

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة	كلية الصيدلة	
استمارة مريض خاصة ببحث الماجستير	جامعة دمشق	
إشراف: أ. د.شادن حداد	الصيدلاني هيثم الدرة	
<b>استقصاء التعداد الشكلي لجين مستقبل الفيتامين د عند مرضى الربو</b>		
رقم المريض.....	المركز الصحي.....	رقم الإضرارة.....
اسم المريض.....	اسم الأب.....	اسم الأم.....
الجنس.....	مكان وتاريخ الولادة.....	
العنوان الدائم....	العنوان الحالي.....	
القصة المرضية.....	تاريخ التشخيص.....	تاريخ الإعتيان.....
	السوابق المرضية والأمراض المرافقة.....	
القصة العائلية.....	الأدوية التي يتم تعاطيها.....	
القصة التأتبية.....	التعدد الشكلي عند المريض.....	
الحالة الاجتماعية.....	ملاحظات.....	

## الموافقة المستنيرة

تم جمع العينات من المرضى بعد الحصول على توقيهم على استمارة الموافقة المستنيرة لكل منهم:

استمارة الموافقة المستنيرة	
عنوان الدراسة	استقصاء التعدد الشكلي لجين مستقبل الفيتامين د عند مرضى الربو .
الباحث	هيثم الدرة - كلية الصيدلة - جامعة دمشق
وصف البحث	دراسة جينية تتم على مستقبل الفيتامين د
هدف البحث	تحري وجود علاقة ارتباط بين مرض الربو وجين مستقبل الفيتامين د من خلال مقارنة مجموعة المرضى ومجموعة الأصحاء
ما سوف يتم إجراؤه بالتفصيل	سيتم سحب عينة دم ومن ثم إجراء التحري
المخاطر أو الآثار الجانبية	نحن لا نتوقع حدوث أية مشاكل أو إزعاجات أو آثار جانبية نتيجة مشاركتك في البحث، و لكن من الممكن أن يحدث ازرقاق بسيط في اليد يزول بعد فترة أقصاها يومين.
فوائد البحث	مشاركتك بهذا البحث ستساهم في معرفة التغيرات الجينية المرافقة لمرض الربو مما قد يعطي صورة أوضح للمرض، للعوامل المؤهبة له مما يمكن من تدبيره وإمكانية إيجاد علاج له في المستقبل.
المشاركة طوعية	إن مشاركتك في هذا البحث هي مشاركة طوعية بالكامل و تستطيع أن تختار التوقف عنها في أية وقت ولأي سبب، ولا يترتب عليها أي تكاليف. إن توقفك عن المشاركة بالبحث أو رفضك للإجابة عن أية أسئلة خاصة لن تؤثر على علاقتك بالباحث أو أية جهة مرتبطة بالبحث
أسئلة عن البحث؟	إذا كان لديك أي استفسار أو سؤال عن البحث بشكل عام، أو عن دورك في البحث بشكل خاص، فلا تتردد في طرحه بشكل مباشر أو لاحقا من خلال الايميل (haithamlab@gmail.com)
يملأ من قبل المشارك بالبحث	اسم المشارك: أقر بأنني قرأت/ قرئت علي هذه المعلومات الواردة أعلاه وشرحت لي بلغة مفهومة و فهمتها، وقد أتيح لي أن أسأل جميع الأسئلة المتعلقة بالبحث، وعليه أتطوع بكامل إرادتي للمشاركة في هذا البحث وأوافق على أخذ عينة الدم. توقيع المشارك:
يملأ من قبل الباحث	أقر بأنني شرحت للمشارك/ لأهله هذه المعلومات الواردة أعلاه بلغة مفهومة، و قد رحبت بتلقي أية أسئلة تتعلق بموضوع البحث، وقدمت إجابات شافية عن جميع الأسئلة المطروحة بهذا الخصوص. توقيع الباحث:
دمشق في ...../...../.....	

## 6- المواد والطرق

أجريت مراحل هذا البحث جميعها في مختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

### 6-1-1-المواد المستخدمة

- إيتانول مطلق (96-100%).
- أنابيب إيبندروف 1.5 مل عقيمة.
- رؤوس ممصات بالقياسين 1000 ul و 100 ul مفلترة وعقيمة.
- رجاجة أنابيب vortexer من شركة Denville® , USA.
- حمام مائي من شركة Stuart, UK.
- قفازات خالية من اللاتكس.
- كلوريد الأمونيوم NH<sub>4</sub>Cl من شركة Merck, Germany.
- فسفات البوتاسيوم KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> من شركة Merck, Germany.
- فسفات ثنائية الصوديوم Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> من شركة Merck, Germany.
- NaCl ، KCl من شركة Indiamart, India.

### 6-1-2- تحضير محاليل استخلاص الدنا

- 1- تم تحضير البروتياز ومحاليل الغسل المرافقة للعنيدة حسب تعليمات الشركة المصنعة.
- 2- تم تحضير دائرة ACE (Ammonium chloride EDTA) كمايلي:
  - وزن 1.6 غ من كلوريد الأمونيوم NH<sub>4</sub>Cl.
  - وزن 0.06 غ من فسفات البوتاسيوم KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
  - وزن 0.2 غ من EDTA.
  - أضيف حوالي 180 مل من الماء ثنائي التقطير.
  - ضبطت درجة الحموضة PH = 6.8-7.2.
  - تم تكميل الحجم إلى 200 مل بالماء ثنائي التقطير.

- رُشِحَ المحلول بواسطة مرشحة جرثومية على عبوة عقيمة.
- وضع على العبوة لصاقة عليها اسم المحلول، درجة PH، درجة حرارة الحفظ.
- حفظت العبوة في البراد بدرجة  $4\text{ C}^{\circ}$ .
- 3- تم تحضير دارئة (Phosphate Buffered Saline (PBS Buffer) كمايلي:
- وزن 8 غ من NaCl.
- وزن 0.2 غ KCl.
- وزن 1.44 غ من  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
- وزن 1.44 غ من  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- تم ضبط PH إلى 7.4.
- كمل الحجم إلى 1 لتر باستخدام الماء المقطر.
- رُشِحَ المحلول بواسطة مرشحة جرثومية على عبوة عقيمة.
- وضع على العبوة لصاقة عليها اسم المحلول، درجة PH، درجة حرارة الحفظ.
- حفظت العبوة في البراد بدرجة  $4\text{ C}^{\circ}$ .

### 3-1-6- مراحل استخلاص الدنا

تم استخلاص الدنا من عينات الدم المسحوبة على EDTA والمحافظة بدرجة  $20\text{ C}^{\circ}$  بعد حل العينة بوضعها في الحمام المائي بدرجة حرارة  $37\text{ C}^{\circ}$  لمدة 5 دقائق، وذلك باستخدام عتيدة عزل الدنا من الدم الكامل QIA amp Blood minikit من شركة QIAGEN, Inc., Germany وكانت مراحل الاستخلاص بناءً على تعليمات الشركة المصنعة على الشكل التالي:

1. نأخذ عينة الدم 1 مل من المجمدة وتوضع في حمام جاف بدرجة  $37\text{ C}^{\circ}$  مدة 5 دقائق حيث يتم انحلال الكريات الحمراء.
2. نثقل العينة مدة 1 دقيقة: 1200 دورة / دقيقة (BOECO M-24, Germany).
3. نرمي الطافي و نجفف الأنبوب على ورق نشاف مخبري ثم نضيف 1 مل من مركب ACE الحال للكريات الحمراء حتى يتم التخلص من الكريات التي لم تتحل في المرحلة السابقة، نثقل الأنبوب مدة 1 دقيقة.

4. نرمي الطافي و نجفف الأنبوب على ورق نشاف.
5. نعيد المرحلة 3-4 من أجل الحصول على رسابة نظيفة.
6. نضيف 1 مل من مركب PBS للتخلص من آثار ACE.
7. ننقل الأنبوب مدة 1 دقيقة (1200 دورة / دقيقة) ثم نرمي الطافي و نجفف الأنبوب على ورق نشاف.
8. نضيف 180 ul من PBS و 20 ul من بروتيناز K بتركيز 20 mg/ml و 200 ul من مركب AL تخلط بواسطة vortexing (SPINX).
9. تحضن العينة في حمام جاف بدرجة 56 C° مدة 2 ساعة حتى تمام الانحلال، ترج بواسطة vortexing كل نصف ساعة.
1. ننقل الأنبوب مدة 5 ثواني (1200 دورة / دقيقة).
2. نضيف 200 ul ايتانول مطلق ثم نخلط بواسطة vortexing ثم ننقل مدة 5 ثواني (1200 دورة / دقيقة).
3. ننقل العينة ~ 620 ul إلى عمود السيلكا ثم ننقل مدة 1 دقيقة (1200 دورة / دقيقة).
4. ننقل عمود السيلكا إلى عمود جمع آخر ونرمي العمود الأول.
5. نضيف 500 ul من محلول AW1 ثم ننقل مدة 1 دقيقة (1200 دورة / دقيقة).
6. نعيد الخطوة 13 ثم نضيف 500 ul من محلول AW2 وننقل مدة 3 دقيقة (1200 دورة / دقيقة).
7. ننقل عمود السيلكا إلى ابندورف مقصوص الغطاء وننقل مدة دقيقة.
8. ننقل عمود السيلكا إلى ابندورف مقصوص الغطاء ثم نضيف 100 ul ماء مقطر (PCR water) ثم نحضن 5 دقيقة.
9. ننقل مدة 1 دقيقة (1200 دورة / دقيقة) ثم ننقل محتوى الأنبوب (100 ul) إلى أنبوب ابندورف عليه لصاقة تدل على اسم العينة، تاريخ العزل والحصاد رقم ①.
10. نضيف إلى عمود السيلكا 100 ul ماء مقطر (PCR water) ثم نحضن 5 د.
11. ننقل مدة 1 دقيقة (1200 دورة / دقيقة) ثم ننقل محتوى الأنبوب (100 ul) إلى أنبوب ابندورف عليه لصاقة تدل على اسم العينة، تاريخ العزل والحصاد رقم ②.
12. نرمي عمود السيلكا.

نذكر أنه تم تعديل طريقة الاستخلاص باستخدام 1 مل من الدم بدلاً من 200 مكل وفق البروتوكول المتبع في الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

## قياس تركيز ونقاوة الدنا

- تم حساب تركيز الدنا في العينة من خلال قياس الامتصاصية على جهاز مقياس الطيف الضوئي spectrophotometer حيث أستخدم الماء ثائي التقطير لتمديد العينة وكمحلول ناصع، تم قياس التماس على طول موجة 260 نانومتر وحسب التركيز على الشكل التالي:
- تركيز الدنا في العينة = امتصاصية العينة  $\times 50 \times$  عامل التمديد
- كما تم قياس التماس على طول موجة 280 نانومتر، ثم حسبت النقاوة كما يلي:
- النقاوة = التماس على 260 / التماس على 280

## 2-6- تفاعل البوليميراز التسلسلي (PCR) Polymerase Chain Reaction

أنجز التفاعل بواسطة جهاز MasterCycler من شركة (Eppendorf, Germany) وعتيدة PCR Master Mix (2X) من شركة (Fermentase, Lithuania) وهي مزيج تحتوي جميع مكونات تفاعل البوليميراز التسلسلي باستثناء المشارع و مرصاف الدنا DNA template وتسمح بإجراء 200 تفاعل.

تحتوي هذه العتيدة على المكونات التالية:

- 0.05 وحدة/مكل من أنزيم Taq DNA polymerase .
- دائرة التفاعل.
- 4 ميلي مول من كلوريد الأمونيوم  $MgCl_2$  .
- 0.4 ميلي مول من كل من النكليوتيدات منقوصة الأكسجين (dATP، dGTP، dCTP، dTTP).

استخدمت مشارع HPLC-purified بناءً على دراسة Gürsoy S. et al., 2008 :

For : (5`-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3`)

Rev : (5`-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3`)

من شركة VBC النمساوية (VBC-biotech, Vienna, Austria) .

تم التحقق من المشاريع من خلال إجراء alignment على برنامج Blast المتوفر على موقع NCBI بحيث يرتبط زوج المشاريع على الشكل التالي:

```

58321 TCCTGGACCTGTGGCAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGAC
GTGAC CAAAGGTATG
58381 CCTAGACTCC ACCTCCTGGG GAGTCTTTTT//.....//
/60481 CCCTTGAGACCTCAGCCATGAGGAGTTGCTGTTTGTTC GACAAAG
AAACC CAAGTGGGGG

```

### مراحل العمل

- وضعت أنابيب PCR على الثلج وأضيفت المكونات حسب تعليمات العتيدة.

25 مكل	PCR Master Mix: (1.25 وحدة من Taq DNA polymerase، 2 ميلي مول من $MgCl_2$ ، 200 ميكرومول من dNTPs)
20 بيكومول	Forward Primer
20 بيكومول	Reverse Primer
50 نانوغرام	Template DNA
حتى 50 مكل	Water, nuclease free
50 مكل	Total volume

- رجت العينات بلطف وثقلت

- أستخدم البرنامج الحراري التالي:

➤ 94.5 °C لمدة 3 دقائق، 35 دورة من النظام التالي بناءً على دراسة Gürsoy

:S. et al.,2008

المرحلة	درجة الحرارة	الزمن
تمسيخ الدنا Denaturation	94.5C°	دقيقة
الالتحام مع المشرع Annealing	61 C°	دقيقة
الاستطالة Elongation	72C°	دقيقة

➤ والإطالة النهائية بدرجة حرارة 72 C° لمدة 7 دقائق.

### تظهير نواتج تفاعل PCR

تم تظهير النواتج بالترجيل على هلامة الأغاروز 1.5%.

### المواد المستخدمة:

- مسحوق الأغاروز (Agarose ME).
- دائرة جريان TBE (Tris Borate EDTA) من شركة Carl Roth, Germany.
- محلول بروميد الايبثيديوم Ethidium Bromide: 10 ملغ/مل (Molecular grade) من شركة Promiga, USA.
- سلم قياس الدنا 100 bp plus DNA Ladder من شركة Fermentas, Lithuania بتركيز 0.5 مكغ/مكل والمرفق مع 1 مل من صباغ التحميل 6×DNA Loading Dye. يتألف هذا السلم من 14 شذفة بالأطوال التالية: 3000، 2000، 1500، 1200، 1000، 900، 800، 700، 600، 500، 400، 300، 200، 100 .pb

## الأجهزة المستخدمة

رحلان كهربائي أفقي من شركة Jencons, Britain.

حجرة تظهير بالأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator.

## تحضير المحاليل:

### - دائرة الجريان

استخدمت دائرة  $0.5 \times TBE$  والتي حضرت لتمديد الدائرة  $10 \times TBE$  بالماء المقطر.

### - سلم القياس

حُضِر باستخدام 1 مكل من سلم القياس وإضافة 2 مكل من صباغ التحميل و5 مكل من الماء منزوع الشوارد وذلك بناءً على تعليمات الشركة المصنعة.

### - تحضير هلامة الأغاروز

حُضِرَت هلامة الأغاروز بتركيز 1.5% بإضافة 1.5 غ أغاروز إلى 100 مل من  $0.5 \times TBE$  من خلال تسخين المزيج على حمام مائي مع التحريك حتى دوام الانحلال ثم التبريد إلى درجة الحرارة  $65^\circ C$ ، غُسل المشط المخصص للرحلان ووضع بشكل ملائم قبل صب الهلام، صُب الهلام ببطء وتم التأكد من عدم وجود فقاعات في الهلامة، وعند تشكل أية فقاعات تم دفعها للجوانب باستخدام رأس ممص عقيم. تركت الهلامة حتى تتصلب فترة 30 دقيقة على الأقل. ثم تمت إزالة المشط بلطف بشكل عمودي وصُبت دائرة  $0.5 \times TBE$  فوق الهلام المتصلب لتغمره حتى تمام الخط المحدد، وتم استخدام تركيز الدائرة نفسه المستخدم في تحضير الهلامة.

## - تحميل العينات

تم حقن سلم القياس في البئر الأول، ثم حقنت العينات بترتيب محدد في الآبار، تم استخدام 10 مكل من ناتج تفاعل PCR وإضافة 2 مكل من صباغ التحميل إلى العينة، مُزجت جيداً بواسطة رأس ممص عقيم وحقنت في البئر المناسب.

عند انتهاء الحقن أُغلق جهاز الرحلان، ووصل إلى مصدر التيار الكهربائي الثابت. تم الترحيل باستخدام تيار كهربائي بفرق كمون 100 فولت لمدة 45 دقيقة. بعد انتهاء عملية الترحيل توضع الهلامة في سائل التلوين (ماء مقطر مضاف إليه مادة بروميد الايثيديوم) لمدة 30 دقيقة مع التحريك الهادئ، ثم تعرض الهلامة للأشعة فوق البنفسجية بواسطة UV-Transilluminator عند طول موجة 312 nm وتصور الهلامة لدراسة النتائج.

### 3-6- الهضم مع إنزيمات الاقتطاع

تم التقصي عن ثلاثة تعددات شكلية في جين VDR باستخدام ثلاثة إنزيمات اقتطاع مختلفة وهذه الأنزيمات هي *Apal*، *BsmI* و *TaqI* لشركة Fermentase.

### الهضم مع إنزيم الاقتطاع *BsmI*

تم حفظ الإنزيم *BsmI* بدرجة حرارة  $20^{\circ}\text{C}$  ودرجة الحرارة المثلى لعمله هي  $37^{\circ}\text{C}$  وأثناء العمل يُحفظ الإنزيم على الثلج.

تم الهضم بناءً على تعليمات الشركة المصنعة كما يلي:

1- في أنبوب ايبندروف أضيف على الترتيب:

10 مكل	مزيج ناتج تفاعل PCR
18 مكل	ماء خالي النوكلياز
2 مكل	10X Buffer R
1 مكل	Mva1269I

- 2- تم المزج برفق بواسطة ممص و تُفَل لعدة ثوان لجمع السائل من الحواف.  
3- حُضن في درجة حرارة  $37\text{ C}^\circ$  لمدة خمس ساعات.

### الهضم مع إنزيم الاقتطاع *Apal*

تم حفظ الإنزيم *Apal* بدرجة حرارة  $20\text{ C}^\circ$  ودرجة الحرارة المثلى لعمله هي  $37\text{ C}^\circ$  وأثناء العمل يُحفظ الإنزيم على الثلج.

تم الهضم بناءً على تعليمات الشركة المصنعة كما يلي:

- 1- في أنبوب ايبندروف أضيق على الترتيب:

مزيج ناتج تفاعل PCR	10 مكل
ماء خالي النوكلياز	18 مكل
10X Buffer B	2 مكل
<i>Apal</i>	1 مكل

- 2- تم المزج برفق بواسطة ممص و تُفَل لعدة ثوان لجمع السائل من الحواف.  
3- حُضن في درجة حرارة  $37\text{ C}^\circ$  لمدة خمس ساعات.

### الهضم مع إنزيم الاقتطاع *TaqI*

تم حفظ الإنزيم *TaqI* بدرجة حرارة  $20\text{ C}^\circ$  ودرجة الحرارة المثلى لعمله هي  $65\text{ C}^\circ$  وأثناء العمل يُحفظ الإنزيم على الثلج.

تم الهضم بناءً على تعليمات الشركة المصنعة كما يلي:

- 1- في أنبوب ايبندروف أضيق على الترتيب:

مزيج ناتج تفاعل PCR	10 مكل
ماء خالي النوكلياز	18 مكل
10X Buffer <i>TaqI</i>	2 مكل
<i>TaqI</i>	1 مكل

- 2- تم المزج برفق بواسطة ممص وثنفل لعدة ثوان لجمع السائل من الحواف.
- 3- حُضن في درجة حرارة 65 C° لمدة خمس ساعات.

نذكر أنه تمت تجربة عدة فترات حضن وتراكيز مختلفة من الإنزيم حيث تشير الشركة المصنعة إلى فترة حضن من 1-16 ساعة وكمية 1-2 مكل من الإنزيم، فكانت فترة 5 ساعات وكمية 1 مكل من الإنزيم كافية لإنجاز الهضم بشكل كامل.

#### 4-6- تحري نواتج الهضم

تم تظهير نواتج الهضم بالترحيل على هلامة الأغاروز % 1.5 (Agarose ME) وفق الطريقة السابقة حيث تم استخدام 10 مكل من ناتج الهضم و 3 مكل من صباغ التحميل ثم الترحيل كما ذكرنا سابقاً .

## الدراسة الإحصائية

أُستُخدمت حزمة البرنامج الإحصائي (SPSS 20 Chicago, IL, U.S.A.) من أجل التحليل الإحصائي.

استخدم اختبار كاي مربع  $\chi^2$  لتحليل المعطيات بين المجموعات لمعرفة ما إذا كانت الفروقات الملاحظة بين المجموعات يعتد بها إحصائياً (في حال كانت قيمة P value أصغر من 0.05) أو أن هذه الفروقات ناتجة عن المصادفة (في حال كانت قيمة P value أكبر من 0.05).

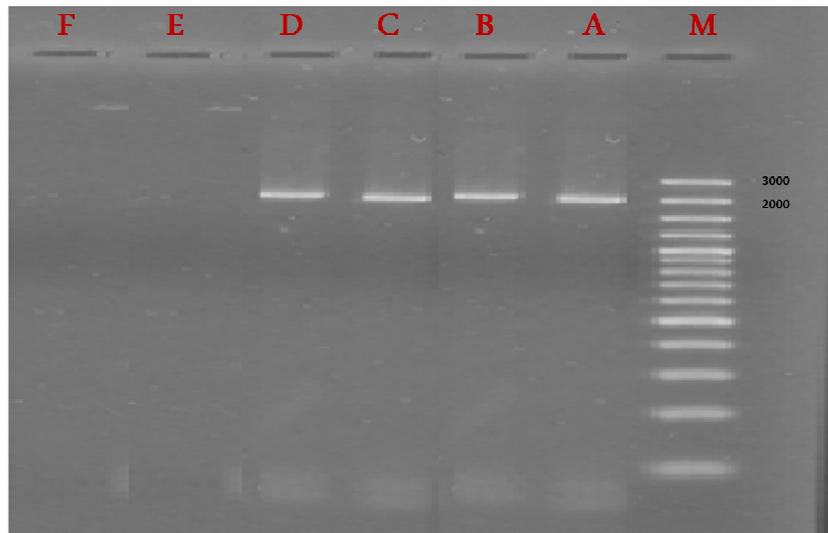
تمت مقارنة النمط الجيني والتواترات الأليلية لكل من *TaqI*، *BsmI*، *ApaI* في جين VDR بين المجموعات.

## النتائج

## نتائج العمل

### 1-1- ناتج تفاعل تضخيم جين VDR

عند تطبيق تفاعل PCR حسب الشروط المذكورة في دراسة Gürsoy S et al.,2008 ينتج عن التفاعل شذفة من الدنا بطول 2000 bp (الشكل 11).



الشكل(11): ناتج تفاعل PCR للعينة باستخدام زوجين من المشارع:

For : (5`-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3`)

Rev : (5`-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3`)

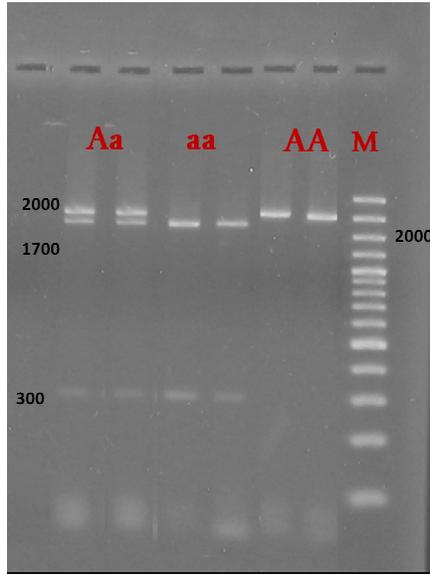
الأغاروز 1.5% الملونة ببروميد الإيثيديوم. يمثل البئر M سلم قياس الدنا يبدأ من 3000

bp، تمثل الآبار A و B عينات مرضية، تمثل الآبار C و D عينات شاهدة تمثل الآبار E

و F الشاهد السلبي

## 2-1- ناتج تفاعل الهضم بإنزيم *Apal*

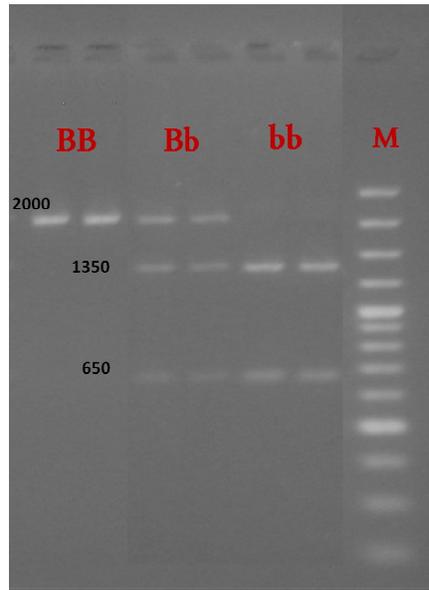
عند تطبيق إنزيم *Apal* على ناتج تفاعل التضخيم فإنه سينتج ثلاثة احتمالات، في الحالة الأولى وهي حالة تماثل الزيجوت homozygotic مع وجود موقع القطع سيظهر عصابتين بطول 1700 bp و 300 bp (النمط الجيني aa)، وفي الحالة الثانية وهي حالة تماثل الزيجوت مع غياب موقع القطع سيظهر عصابة وحيدة بطول 2000 bp (النمط الجيني AA)، وفي الحالة الثالثة وهي حالة متغاير الزيجوت heterozygotic سيظهر ثلاث عصابات بطول 2000 bp، 1700 bp و 300 bp (النمط الجيني Aa) (الشكل 12).



الشكل (12): التعدد الشكلي *Apal* في جين VDR، M: سلم جزيئي من 100 bp plus؛ AA: ناتج التضخيم بدون هضم؛ Aa: ناتج الهضم متغاير الزيجوت heterozygotic؛ aa: ناتج الهضم متماثل الزيجوت homozygotic.

### 3-1- ناتج تفاعل الهضم بإنزيم *BsmI*

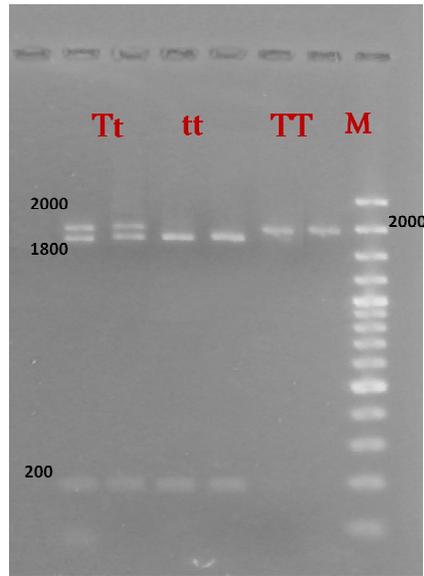
عند تطبيق إنزيم *BsmI* على ناتج تفاعل التضخيم فإنه سينتج ثلاثة احتمالات، في الحالة الأولى وهي حالة تماثل الزيجوت homozygotic مع وجود موقع القطع سيظهر عصابتين بطول 1350 bp و 650 bp (النمط الجيني bb)، وفي الحالة الثانية وهي حالة تماثل الزيجوت مع غياب موقع القطع سيظهر عصابة وحيدة بطول 2000 bp (النمط الجيني BB)، وفي الحالة الثالثة وهي حالة متغاير الزيجوت heterozygotic سيظهر ثلاث عصابات بطول 2000 bp، 1650 bp و 350 bp (النمط الجيني Bb) (الشكل 13).



الشكل (13): التعدد الشكلي *BsmI* في جين VDR، M: سلم جزيئي من 100 bp plus؛ BB: ناتج التضخيم بدون هضم؛ Bb: ناتج الهضم متغاير الزيجوت heterozygotic؛ bb: ناتج الهضم متماثل الزيجوت homozygotic.

#### 4-1- ناتج تفاعل الهضم بإنزيم *TaqI*

عند تطبيق إنزيم *TaqI* على ناتج تفاعل التضخيم فإنه سينتج ثلاثة احتمالات، في الحالة الأولى وهي حالة تماثل الزيجوت homozygotic مع وجود موقع القطع سيظهر عصابتين بطول 1800 bp و 200 bp (النمط الجيني tt)، وفي الحالة الثانية وهي حالة تماثل الزيجوت مع غياب موقع القطع سيظهر عصابة وحيدة بطول 2000 bp (النمط الجيني TT)، وفي الحالة الثالثة وهي حالة متغاير الزيجوت heterozygotic سيظهر ثلاث عصابات بطول 2000 bp، 1800 bp و 200 bp (النمط الجيني Tt) (الشكل 14).



الشكل (14): التعدد الشكلي *TaqI* في جين VDR، M: سلم جزيئي من 100 bp plus؛ TT: ناتج التضخيم بدون هضم؛ Tt: ناتج الهضم متغاير الزيجوت heterozygotic؛ tt: ناتج الهضم متماثل الزيجوت homozygotic.

**5-1- النمط الجيني وتواترات الأليل للتعدد الشكلي *Apal* في جين *VDR* لعينات المرضى والشاهد:**

يبين الجدول (2) توزيع الأنماط الجينية عند كل من مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة والنسب المئوية الموافقة لكل مجموعة، كما تم حساب توزيع الأليلات عند المجموعتين والنسب المئوية لكل أليل.

الجدول (2): توزيع الأنماط الجينية وتواترات الأليل للتعدد الشكلي *Apal* في جين *VDR* لعينات المرضى والشاهد.

Condition	Patients n = 50 (%)	Controls n = 50 (%)	P value	OR (95% CI)
<b>Genotypes</b>				
<b>A/A n (%)</b>	29 (58%)	20 (40%)	0.146	
<b>A/a n (%)</b>	14 (28%)	23 (46%)		
<b>a/a n (%)</b>	7 (14%)	7 (14%)		
<b>Alleles</b>				1.5 (0.8- 2.7)
<b>A n (%)</b>	72 (72%)	63 (63%)	0.174	
<b>a n (%)</b>	28 (28%)	37 (37%)		

## - تطبيق معادلة Hardy-Weinberg على النتائج

في دراسات الهندسة الوراثية السكانية Population Genetics يجب أن يتحقق توازن Hardy-Weinberg والذي يتألف من المعادلتين التاليتين:

$$\text{Allele frequency: } p + q = 1$$

$$\text{Genotype frequency: } p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

من أجل تعدد شكلي على جين معين فإنه يوجد أليلان (الأليل A و الأليل a في حالة التعدد الشكلي *Apal* على جين (VDR) يشير p لتواتر الأليل الأول و q لتواتر الأليل الثاني.

يشير  $p^2$  لتواتر النمط الجيني AA ويشير  $q^2$  لتواتر النمط الجيني aa ويشير  $2pq$  لتواتر النمط الجيني Aa.

ولقد انطبقت هذه المعادلة على تواترات الأليلات وتواتر الأنماط الجينية لكل من المجموعة الشاهدة ومجموعة المرضى :

**مجموعة المرضى:**

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$0.58 + 0.28 + 0.14 = 1$$

**المجموعة الشاهدة:**

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

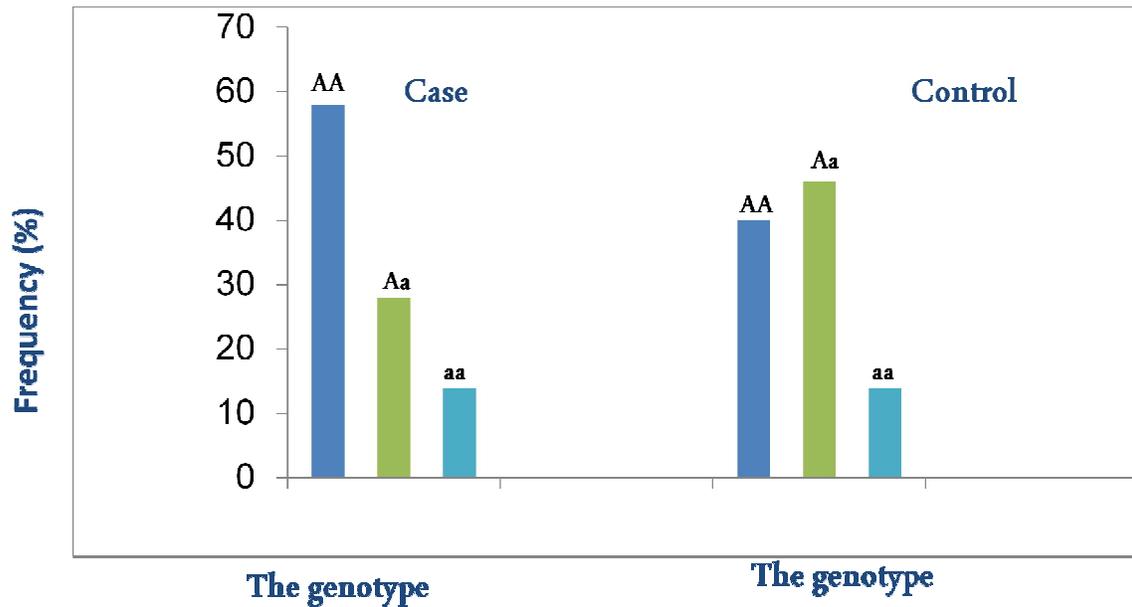
$$0.40 + 0.46 + 0.14 = 1$$

### 1-5-1- دراسة توزيع الأنماط الجينية عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي

#### *Apal* في جين VDR

كان 14 مريضاً (28%) من مرضى الربو متغايري الزيجوت، 29 مريضاً (58%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل A و 7 مرضى (14%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل a.

في حين كان 23 فرداً (46%) من الشواهد متغايري الزيجوت، 20 فرداً (40%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل A و 7 أفراد (14%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل a الشكل (15).



الشكل (15): مقارنة توزيع الأنماط الجينية للتعدد الشكلي *Apal* لجين VDR بين مجموعة المرضى ومجموعة الشاهد

عند تطبيق اختبار كاي مربع بين المجموعتين المدروستين لم يوجد فارق إحصائي يعتد به بين المجموعة الشاهدة ومجموعة المرضى حيث كانت قيمة P value تساوي 0.146.

### 2-5-1- دراسة توزيع الألائل عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي *Apal* في

#### جين VDR

كان 72 (72%) أليلاً من النمط A و 28 (28%) أليلاً من النمط a عند مجموعة المرضى مقابل 63 (63%) أليلاً من النمط A و 37 (37%) أليلاً من النمط a عند مجموعة الشاهدة.

عند تطبيق اختبار كاي مربع بين المجموعتين المدروستين لم يوجد فارق إحصائي يعتد به بين المجموعة الشاهدة ومجموعة المرضى حيث كانت  $p$  value تساوي 0.174.

### 6-1- النمط الجيني وتواترات الأليل للتعدد الشكلي *BsmI* في جين VDR لعينات المرضى

#### والشاهد:

يبين الجدول (3) توزيع الأنماط الجينية عند كل من مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة والنسب المئوية الموافقة لكل مجموعة، كما تم حساب توزيع الأليلات عند المجموعتين والنسب المئوية لكل أليل.

الجدول (3) توزيع الأنماط الجينية وتواترات الأليل للتعدد الشكلي *BsmI* في جين VDR لعينات المرضى والشاهد

Condition	Patients n = 50(%)	Controls n = 50 (%)	<i>P</i> value	OR (95% CI)
<b>Genotypes</b>				
<b>B/B n (%)</b>	18 (36%)	9 (18%)	0.01	
<b>B/b n (%)</b>	24 (48%)	20 (40%)		
<b>b/b n (%)</b>	8 (16%)	21 (42%)		
<b>Alleles</b>				3.9 (2.2- 6.9)
<b>B n (%)</b>	60 (60%)	38 (38%)	0.002	
<b>b n (%)</b>	40 (40%)	62 (62%)		

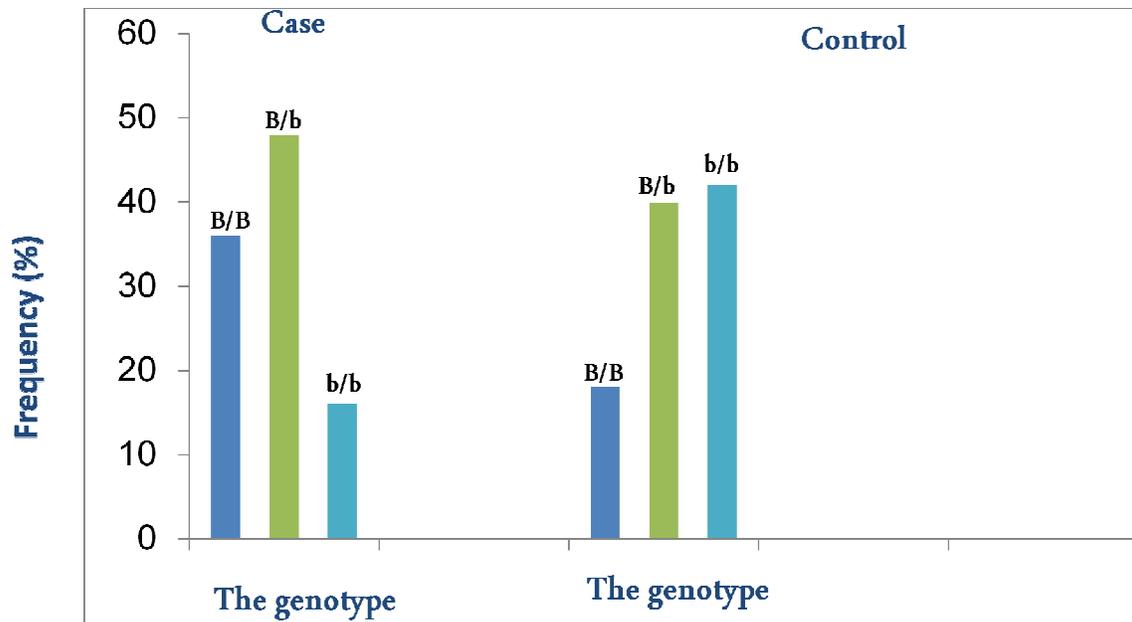
### 1-6-1- دراسة توزيع الأنماط الجينية عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي

#### *BsmI* في جين VDR

كان 24 مريضاً (48%) من مرضى الربو متغايري الزيجوت، 18 مريضاً (36%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل B و 8 مرضى (16%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل b.

في حين كان 20 فرداً (40%) من الشواهد متغايري الزيجوت، 9 فرداً (18%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل B و 21 فرلاً (42%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل b الشكل (16).

عند تطبيق اختبار كاي مربع بين المجموعتين المدروستين تبين وجود فارق إحصائي يعتد به بين المجموعة الشاهدة ومجموعة المرضى حيث كانت قيمة P تساوي 0.001.



الشكل (16): مقارنة توزيع الأنماط الجينية للتعدد الشكلي *BsmI* لجين VDR بين مجموعة المرضى ومجموعة الشاهد

#### 1-6-2- دراسة توزع الألائل عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي *BsmI* في

##### جين VDR

كان 60 (60%) أليلاً من النمط B و 40 (40%) أليلاً من النمط b عند مجموعة المرضى مقابل 38 (38%) أليلاً من النمط B و 62 (62%) أليلاً من النمط b عند مجموعة الشاهدة.

عند تطبيق اختبار كاي مربع بين المجموعتين المدروستين تبين وجود فارق إحصائي يعتد به بين المجموعة الشاهدة ومجموعة المرضى حيث كانت P value تساوي 0.002.

#### 1-7- النمط الجيني وتواترات الأليل للتعدد الشكلي *TaqI* في جين VDR لعينات المرضى والشاهد:

يبين الجدول (4) توزع الأنماط الجينية عند كل من مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة والنسب المئوية الموافقة لكل مجموعة، كما تم حساب توزع الأليلات عند المجموعتين والنسب المئوية لكل أليل.

الجدول (4): توزيع الأنماط الجينية وتواترات الأليل من أجل *TaqI* في جين VDR بين عينات المرضى والشاهد

Condition	Patients n = 50 (%)	Controls n = 50 (%)	P value	OR (95% CI)	
<b>Genotype</b>					
T/T n (%)	10 (20%)	19 (38%)	0.02	2.44 (1.38 - 4.32)	
T/t n (%)	22 (44%)	27 (54%)			
t/t n (%)	18 (36%)	4 (8%)			
<b>Alleles</b>					
T n (%)	42 (42%)	65 (65%)	0.01		
t n (%)	58 (58%)	35 (35%)			

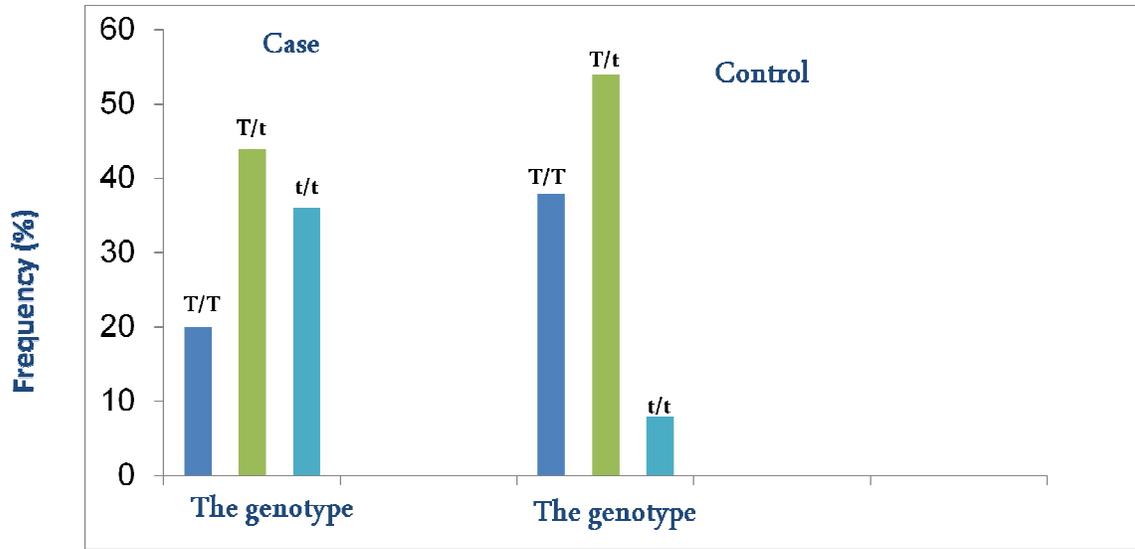
1-7-1- دراسة توزيع الأنماط الجينية عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي

***TaqI* في جين VDR**

كان 22 مريضاً (44%) من مرضى الربو متغايري الزيجوت، 10 مريضاً (20%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل T و 18 مريضاً (36%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل t.

في حين كان 27 فرداً (54%) من مرضى الربو متغايري الزيجوت، 19 فرداً (38%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل T و 4 أفراد (8%) متماثلي الزيجوت بالنسبة للأليل t الشكل (17).

عند تطبيق اختبار كاي مربع بين المجموعتين المدروستين تبين وجود فارق إحصائي يعتد به بين المجموعة الشاهدة ومجموعة المرضى حيث كانت P value تساوي 0.02.



الشكل (17): مقارنة توزيع الأنماط الجينية للتعدد الشكلي *TaqI* لجين *VDR* بين مجموعة المرضى ومجموعة الشاهد

#### 2-7-1- دراسة توزيع الألائل عند مجموعة المرضى والمجموعة الشاهدة للتعدد الشكلي *TaqI* في جين *VDR*

كان 42 (42%) أليلاً من النمط T و 58 (58%) أليلاً من النمط t عند مجموعة المرضى مقابل 65 (65%) أليلاً من النمط T و 35 (35%) أليلاً من النمط t عند مجموعة الشاهدة.

عند تطبيق اختبار كاي مربع بين المجموعتين المدروستين تبين وجود فارق إحصائي يعتد به بين المجموعة الشاهدة ومجموعة المرضى حيث كانت قيمة P Value تساوي 0.01.

## المناقشة

## المناقشة

يعد الربو مرضاً التهابياً مزمناً شائعاً للطرق التنفسية، يمكن للربو أن يبدأ بشكل مبكر في حياة الأفراد ويستمر خلال الحياة، أيضاً يمكن أن يظهر بشكل متأخر في أي عمر لأسباب لا تزال غير مفهومة. تواجه العديد من الدول زيادة سريعة في معدل وقوع الربو لذلك اتجهت الجهود نحو تحديد العوامل المساهمة في حدوث المرض للوقاية منه، وكذلك الأمر تحديد العوامل التي يمكن أن تساهم في تدبير المرض بشكل أفضل.

من جهة ثانية سجلت زيادة في معدل عوز الفيتامين د في منطقة الشرق الأوسط وشمال أفريقيا وعلى الرغم من المناخ المشمس في هذه المناطق فإن عوز الفيتامين د سُجل بنسبة مرتفعة عند الفئات العمرية جميعها وعلى الأخص عند النساء في سن الإنجاب وعند الأمهات المرضعات وإن الأسباب الأساسية لهذه النسبة العالية جرى تفسيرها بالتعرض المحدود لأشعة الشمس والذي يعزى للمناخ الحار نسبياً بالإضافة إلى تصبغ الجلد والمعتقدات الدينية والاجتماعية والمتناول الغذائي المنخفض من الفيتامين د وغيرها. كما سُجلت أعلى نسبة للإصابة بالرخذ في العالم في منطقة الشرق الأوسط حتى عند الأطفال الذين هم أصلاً من أصل شرق أوسطي ويعيشون في مناطق منخفضة الإصابة بالرخذ مثل أوروبا وأستراليا، وكذلك عند الأطفال الذين يتمتعون بتراكيز مصلية طبيعية أو مرتفعة من 25(OH)D3 وهذا يقترح ضعفاً في الاستجابة للفيتامين د عند هذه المجموعات العرقية وهذا لا يمكن تفسيره إلا في ضوء الاختلافات الجينية [103,104].

تعطي هذه البيانات مجتمعة فكرة عن خصوصية جينية وبيئية لسكان الشرق الأوسط في الاستجابة لفيتامين د وإمكانية تطبيقه عند أفراد ذوي استعداد جيني معين للحد من تأثيرات عوز الفيتامين د أو ضعف الاستجابة لفيتامين د. هناك العديد من الأبحاث التي ربطت بين التعددات الشكلية على جين مستقبل الفيتامين د أو ضعف الاستجابة للفيتامين د وبين الإصابة أو الوقاية من الربو وذلك على اعتبار أن الفيتامين د ومستقبله يلعبان دوراً متاعلياً هاماً في الجسم، وإن وجود التعددات الشكلية لجين مستقبل الفيتامين د يمكن أن تؤثر في استجابة الخلايا تجاه الفيتامين د.

تواتر أعلى للنمط الجيني BB، tt و AA عند مجموعة المرضى بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة

تبين في هذه الدراسة أن النمط الجيني متغاير الزيغوت Aa و Tt هو النمط السائد في المجموعة الشاهدة وهذا يتفق مع تواتر النمط الجيني عند الأصحاء الأوربيين وفي أمريكا وأسيا مثل الأردن وتركيا<sup>(115)</sup>. في حين كان النمط الجيني متماثل الزيغوت bb هو السائد عند المجموعة الشاهدة وهذا يتفق مع تواتر النمط الجيني عند الأصحاء في إيران ويختلف مع تواتر النمط الجيني في كل من لبنان وتركيا والأردن<sup>(114)</sup>، بينما النمط الجيني متغاير الزيغوت Bb هو السائد عند مجموعة المرضى.

يعتبر هذا البحث أول بحث يستقصي عن الترافق ما بين التعدد الشكلي لأنزيمات Apal، BsmI و TaqI لمستقبل الفيتامين د ومرض الربو في مجموعة سكانية سورية.

أظهرت نتائجنا وجود ترافق بين النمطين الجينيين للتعددين الشكليين BsmI و TaqI ومرض الربو ومن المحتمل أن هذين التعددين الشكليين يسببان التغيرات المذكورة في ثباتية VDR mRNA وبالتالي قد تكون مسؤولة عن خلل التنظيم المناعي المشاهد عند مرضى الربو. أظهر Raby وزملاؤه (2004) أن هذه التعددات الشكلية تترافق مع الربو ويشكل معقد<sup>(111)</sup>. أثبت Poon وزملاؤه (2004) أن الأليل T في TaqI والأليل a في Apal تترافق مع الربو في مجموعة سكانية أمريكية<sup>(107)</sup>.

أظهر محمد كاظمي عربابادي (2010) وجود ترافق بين التعدد الشكلي TaqI وليس Apal مع مرض الربو في مجموعة سكانية إيرانية فكانت نتائجه موافقة لنتائجنا<sup>(110)</sup>.

أظهر Saadi وزملاؤه (2009) أن الأليل Apal-(A) فقط يترافق مع الربو في مجموعة سكانية صينية<sup>(112)</sup>.

وبالتالي من الممكن للتعددات الشكلية Apal، BsmI أن تكون مهمة في مرض الربو من خلال تأثيرها على التعبير عن VDR. من جهة ثانية أظهر Vollmert (2004) وزملاؤه أنه لا يوجد ترافق بين التعدد الشكلي FokI ومرض الربو في مجموعة سكانية ألمانية<sup>(113)</sup> وأخيراً أظهر Papadopoulou وزملاؤه (2015) أن التعدد الشكلي TaqI فقط يترافق مع مرض الربو في مجموعة سكانية قبرصية<sup>[116]</sup> (الجدول 5).

الاختلاف بين نتائج ونتائج الدراسات الأخرى يعود إلى الاختلافات الجينية بين المجموعات السكانية المدروسة والعوامل البيئية.

الجدول (5): الدراسات التي تربط التعددات الشكلية في جين VDR مع مرض الربو

التوافق مع دراستنا	التوافق مع الربو	العام	البلد	الدراسة
x	<i>Apa-I</i> -(A)	2004	أمريكا	<b>Raby</b>
x	<i>Taq-I</i> -(t) , <i>Apa-I</i> -(a)	2004	كندا	<b>Poon</b>
-	-	2004	ألمانيا	<b>Vollmert</b>
x	<i>Apa-I</i> -(A)	2009	الصين	<b>Saadi</b>
ء	<i>Taq-I</i> -(t)	2010	إيران	<b>Arababadi</b>
ء	<i>Taq-I</i> -(t)	2015	قبرص	<b>Papadopoulou</b>
-	<i>Taq-I</i> -(t) , <i>BsmI</i> -(B)	2015	سورية	<b>Aldurra</b>

## الاستنتاجات

تبين في هذه الدراسة:

- 1- وجود علاقة بين التعدد الشكلي *BsmI* على جين مستقبل الفيتامين د وبين الإصابة بمرض الربو عند مجموعة من المرضى السوريين بحيث يترافق الأليل B مع حدوث مرض الربو بينما يكون للأليل b دوراً وقائياً للمرض.
- 2- وجود علاقة بين التعدد الشكلي *TaqI* على جين مستقبل الفيتامين د وبين الإصابة بمرض الربو عند مجموعة من المرضى السوريين بحيث يترافق الأليل t مع حدوث مرض الربو بينما يكون للأليل T دوراً وقائياً للمرض.
- 3- تبين في هذه الدراسة عدم وجود علاقة بين التعدد الشكلي *ApaI* على جين مستقبل الفيتامين د وبين الإصابة بمرض الربو عند مجموعة من المرضى السوريين.

## التوصيات والمقترحات

1- دراسة التعدادات الشكلية الأخرى الموجودة على جين مستقبل الفيتامين د وعلاقتها مع مرض

الربو.

2- إجراء دراسة حول الأنماط الفردانية haplotypes في جين مستقبل الفيتامين د وعلاقة هذه

الأنماط بمرض الربو.

## المخلص

يعد الربو أحد الأمراض المزمنة الشائعة للطرق التنفسية، وهو مرض معقد له أسباب جينية وبيئية متعددة. يحدث الربو نتيجة التفاعل بين العديد من الجينات، تملك بعض هذه الجينات تأثير محصناً وبعضها الآخر يساهم في إمراضية الربو. أظهرت الدراسات التي تمت على الجينوم البشري من أجل الربو وجود ارتباطات مهمة مع العديد من الصبغيات، من بين هذه الارتباطات المنطقة q13-23 في الصبغي 12 التي تحتوي على جين مستقبل الفيتامين D (Vitamin D receptor (VDR) gene).

**هدف الدراسة:** هدفت الدراسة إلى تحري الارتباط بين التعددات الشكلية *Apal*، *BsmI* و *TaqI* لجين مستقبل الفيتامين D والاستعداد الجيني للإصابة بمرض الربو لدى مجموعة من المرضى السوريين.

**المواد والطرق المستخدمة:** تمت الدراسة على 50 مريض ربو و50 من الشواهد باستخدام تفاعل البوليميراز التسلسلي وتحليل تعدد أشكال الشدق مقيدة الطول Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs).

**النتائج:** أظهرت نتائجنا وجود ترافق يعتد به بين التعددين الشكليين *BsmI* و *TaqI* و مرض الربو وذلك عند مقارنة مجموعة الشواهد مع مجموعة المرضى.

**الخلاصة:** تبين في هذا البحث أن وجود الأليل B و الأليل t لجين مستقبل الفيتامين D يؤهب للإصابة بمرض الربو.

**Background:** Asthma is one of the common chronic diseases of airways, It is a complex disease with both genetic and environmental risk factors. Asthma is caused by multiple interacting genes, some having a protective effect and others contributing to the disease pathogenesis. Genome scans for asthma have identified suggestive or significant linkages on different chromosomes, including chromosome 12, region q13-23, housing the vitamin D receptor (VDR) gene.

**Aim of study:** This study aimed to investigate an association between *Apal*, *BsmI* and *TaqI* polymorphisms and the genetic susceptibility to asthma in Syrian population.

**Materials and methods:** 50 asthmatic patients and 50 controls were enrolled in this study, PCR-RFLPs was performed to examine polymorphisms in the VDR gene.

**Results:** Our results showed a statistically significant association of the *BsmI* and *TaqI* polymorphisms and the asthma when comparing healthy controls to asthmatic patients.

**Conclusion:** our study showed the B allele of the *BsmI* and the t allele of the *TaqI* associated with asthma.

- 1-Christian J., What is asthma, Global atlas of asthma,(2013); 2A: 2-3.
- 2-Lommatzsch M. Airway hyperresponsiveness: new insights into the pathogenesis. *Semin Respir Crit Care Med*, (2012); 33:579-587.
- 3-Tepper R.S., Wise R.S., Covar R., Irvin C.G., Kercksmar C.M., Kraft M., Asthma outcomes: pulmonary physiology. *J Allergy Clin Immunol*, (2012);129:S65-87.
- 4-Murray C.S., Can inhaled corticosteroids influence the natural history of asthma?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, (2008); 8:77–8.
- 5-Martinez F.D., Genes, environments, development and asthma: a reappraisal. *Eur Respir J*, (2007); 29 (1): 179–84.
- 6- Miller R.L., Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, (2008) ; 177 (6): 567–573.
- 7-Kelly F.J., Fussell J.C., Air pollution and airway disease, Clinical and experimental allergy. *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, (2011); 41 (8): 1059–7.
- 8-Maesano I., Environmental risk factors for asthma, Global atlas of asthma, (2013); 12A: 36-38.
- 9-Peden D., Reed C.E., Environmental and occupational allergies. *J Allergy Clin Immunol* , (2010);125:S150-160.
- 10-Salvi S., Pollution and allergic airways disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, (2001);1:35-4.
- 11-- Carlsten C and Melén E. Air pollution, genetics, and allergy: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, (2012);12:455-460.
- 12- Lauener R., Genetics of asthma, Global atlas of asthma,(2013); 7A: 23-24.
- 13-Lim R.H., Kobzik L., Dahl M.. Risk for asthma in offspring of asthmatic mothers versus fathers: a meta-analysis. *PLoS One*, (2010); 5:e10134.
- 14-March M.E., Sleiman P.M., Hakonarson H. Genetic polymorphisms and associated susceptibility to asthma. *Int J Gen Med*, (2013); 6:253- 265.
- 15-Roduit C., Wohlgensinger J., Frei R., Bitter S., Bieli C., Loeliger S, et al. Prenatal animal contact and gene expression of innate immunity receptors at birth are associated with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, (2011);127:179-185.
- 16-Michel S., Busato F., Genuneit J., Pekkanen J., Dalphin J.C., Riedler J., et al. Farm exposure and time ends in early childhood may influence DNA methylation in genes related to asthma and allergy. *Allergy*,( 2013);68:355-364.
- 17-Marku B and Papi A. Asthma Management. Global atlas of asthma, (2013); 75A: 75-7.
- 18-Paul M., Global guidelines for asthma management., *Pol Arch Med Wewn.*( 2010) ; 120(12):511-7.

- 19-Rabe K.F., Adachi M., Lai C.K., Soriano J.B., Vermeire P.A., Weiss K.B., Weiss S.T. Worldwide severity and control of asthma in children and adults: the global asthma insights and reality surveys. *J Allergy Clin Immunol*, (2004); 114:40-47.
- 20-Emanske R.F., Busse W. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol*, (2010); S95–102
- 21-Fingleton J and Beasley R. Asthma Monitoring. *Global atlas of asthma*, (2013); 25A: 79-82.
- 22-Gibson P.G., Powell H., Coughlan J., Wilson A.J., Abramson M., Haywood P., et al. Self-management education and regular practitioner review for adults with asthma. *Cochrane Database Syst Rev*, (2003); (1): CD001117.
- 23-Akdis M. The pathogenesis of asthma. *Global atlas of asthma*, (2013); 9A: 28-30.
- 24-Agache I., Akdis C., Jutel M., Virchow J.C. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy* 2012;67:835-846.
- 25-Holgate S.T. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev*, ( 2011); 242:205-219.
- 26-Triggiani M., Jutel M and Knol F,E. The underlying mechanisms of asthma. *Global atlas of asthma*, (2013); 10A: 31-33.
- 27-Holgate S.T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*, (2012); 18:673-683.
- 28-Holgate S.T. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*, (2008); 38:872 897.
- 29-Galli S.J., Tsai M. IgE and mast cells in allergic diseases. *Nat Med*, (2012); 18:693-704.
- 30-Koziol-White C.J., Panettieri R.A. Airway smooth muscle and immunomodulation in acute exacerbations of air way disease. *Immunol Rev*, ( 2011); 242:178-185.
- 31-Marone G., Triggiani M., Genovese A., De Paulis A. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv Immunol*, (2005); 88:97- 160.
- 32-Robinson D.S. The role of the mast cell in asthma: induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle? *J Allergy Clin Immunol*, (2004);114(1):58–65.
- 33-Sampson A.P. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy*, (2000); (1):7–22.
- 34-Wenzel S. Phenotypes & endotypes : emerging concepts on asthma heterogeneity. *Global atlas of asthma*, (2013); 11A: 34-36.
- 35-Corren J., Lemanske R.F, Hanania N.A., Korenblat P.E., Parsey M.V., Arron J.R, et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med*, (2011); 365:1088-1098.

- 36-Haldar P., Brightling C.E., Hargadon B., Gupta S., Monteiro W., Sousa A., et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med*, (2009); 360:973-984.
- 37-Wenzel S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*, (2012); 18:716-725.
- 38-Woodruff P.G., Modrek B., Choy D.F., Jia G., Abbas A.R., Ellwanger A., et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, (2009);180:388-395.
- 39-Genuneit J., Jarvis D., Flohr C. The asthma epidemic global and time trends of asthma in adults. *Global atlas of asthma*,(2013); 3B: 10-13.
- 40-Kriebel D., Gore R., Punnett L. National income, self-reported wheezing and asthma diagnosis from the World Health Survey. *Eur Respir J*, (2010); 35:279-286.
- 41-Jarvis D., Newson R., Lotvall J., Hastan D., Tomassen P., Keil T., et al. Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: the GA2LEN survey in Europe. *Allergy*, (2012); 67:91-98.
- 42-Sunyer J., Anto J.M, Tobias A., Burney P. Generational increase of self-reported first attack of asthma in fifteen industrialized countries. *European Community Respiratory Health Study (ECRHS)*. *Eur Respir J*, (1999); 14:885-891.
- 43-Hochberg Z. and Templeton A.R., Evolutionary perspective in skin color, vitamin D and its receptor, *Hormones*, (2010); 9(4):307-311.
- 44-Taheri E., Saedisomeolia A., Djalali M., Qorbani M. and Civi M. The relationship between serum 25-hydroxy vitamin D concentration and obesity in type 2 diabetic patients and healthy subjects, *J diabetes metab. Disord*, (2012) ;11: 16-21.
- 45-Schwalfenberg G., Not enough vitamin D, *Can Fam Physician*, (2007); 53:841-854.
- 46-Ascherio A., Munger K.L. and Simon K.C., Vitamin D and multiple sclerosis, *Lancet Neurol*, (2010); 9:599-612.
- 47-Hillyer R.L., Sirinvasin P., Joglekar M., Sikes R.A., van Golen K.L. and Nohe A., Differential effects of vitamin D treatment on inflammatory and non-inflammatory breast cancer cell lines, *Clin Exp Metastasis*,(2012); 29: 971-979.
- 48-Vupputuri M.R., Goswami R., Gupta N., Ray D., Tandon N., Kumar N., Prevalence and functional significance of 25-hydroxyvitamin D deficiency and vitamin D receptor gene polymorphisms in Asian Indians, *Am J Clin Nutr*, (2006); 83(6):1411-1419.
- 49-Battersby A.J., Kampmann B., Burl S. Vitamin D in early childhood and the effect on immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev*

- Immunol. Volume, (2012); Article ID:430972, 10 pages doi: 10.1155/2012/430972.
- 50-Guessous I., Dudler V., Glatz N., Theler JM., Zoller O., Paccaud F., Burnier M., Bochud M., on behalf of the Swiss Survey on Salt Group Vitamin D levels and associated factors: a population-based study in Switzerland, *Swiss Med Wkly*, (2012); 142: w13719.
- 51-Boucher BJ., Is vitamin D status relevant to metabolic syndrome?, *dermato-endocrinol*, (2012); 4(2):212-224.
- 52-Sutton A.L. and MacDonald P.N., Vitamin D: more than a "bone- a-fide" hormone. *Mol Endocrinol*, (2003); 17(5):777-791.
- 53-White J.H., Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. *Rev, Endocr Metab Disord*, (2012); 13(1):21-29
- 54-Zehnder D., Bland R., Williams M.C., McNinch R.W., Howie A.J., Stewart P.M. and Hewison M., Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase, *J Clin Endocrinol Metab*, (2011); 86(2):888-894.
- 55-Jacobs E.T., Martínez M.E. and Jurutka P.W., Vitamin D: marker or mechanism of action?, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, (2011); Apr;20(4):585-590.
- 56-Cantorna M.T., Woodward W.D., Hayes C.E., DeLuca H.F. 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines tgf-beta 1 and IL-4. *J Immunol*. (1998);160:5314–5319
- 57-Vasiliou J.E., Lui S., Walker S.A., Chohan V., Xystrakis E., Bush A., et al. Vitamin D deficiency induces Th2 skewing and eosinophilia in neonatal allergic airways disease. *Allergy*. (2014);69:1380–1389.
- 58-Adams J.S., Hewison M.. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. (2008);4:80–90.
- 59-Seuter S., Heikkinen S. and Carlberg C., Chromatin acetylation at transcription start sites and vitamin D receptor binding regions relates to effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and histone deacetylase inhibitors on gene expression., *Nucleic Acids Res*, (2013); 7;41(1):110-124.
- 60-Campbell F.C., Xu H., El-Tanani M., Crowe P. and Bingham V. The yin and yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: operational networks and tissue-specific growth control, *Biochem Pharmacol*. (2010) 1;79(1):1-9
- 61-Raimondi S., Johansson H., Maisonneuve P. and Gandini S. Review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk, *Carcinogenesis*, (2009); 30(7):1170-1180.
- 62-Nagpal S., Na S. and Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands, *Endocr Rev*, (2005); 26(5):662-687.

- 63-Bouillon R., Carmeliet G., Verlinden L., van Etten E., Verstuyf A., Luderer H.F., Lieben L., Mathieu C. and Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*, (2008); 29(6):726-776.
- 64-Shah S., Islam M.N., Dakshanamurthy S., Rizvi I., Rao M., Herrell R., Zinser G., Valrance M., Aranda A., Moras D., Norman A., Welsh J. and Byers S.W. The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation, *Mol Cell*, (2006); 17;21(6):799-809.
- 65-Shaffer P.L. and Gewirth D.T. Structural basis of VDR-DNA interactions on direct repeat response elements, *EMBO J*, (2002); 1;21(9):2242-2252.
- 66-Yamamoto K., Masuno H., Choi M., Nakashima K., Taga T., Ooizumi H., Umesono K., Sicinska W., VanHooke J., DeLuca H.F. and Yamada S, Three-dimensional modeling of and ligand docking to vitamin D receptor ligand binding domain, *Proc Natl Acad Sci U S A*,(2000); 15;97(4):1467-1472.
- 67-Rochel N., Wurtz J.M., Mitschler A., Klaholz B., Moras D. The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand, *Mol Cell*, (2000); 5(1):173-179.
- 68-Berg J.P., Liane K.M., Bjørhovde S.B., Bijro T., Torjesen P.A. and Haug E. Vitamin D receptor binding and biological effects of cholecalciferol analogues in rat thyroid cells, *J Steroid Biochem Mol Biol*, (1994); 50(3-4):145-150.
- 69-Malinen M., Saramäki A., Ropponen A., Degenhardt T., Väisänen S. and Carlberg C. Distinct HDACs regulate the transcriptional response of human cyclin-dependent kinase inhibitor genes to Trichostatin A and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, *Nucleic Acids Res*, (2008); an;36(1):121-132.
- 70-Dusso A.S., Brown A.J and Slatopolsky E, Vitamin D, *Am J Physiol Renal Physiol*, (2005); 289(1):F8-28.
- 71-Hsieh J.C., Whitfield G.K., Jurutka P.W., Haussler C.A., Thatcher M.L., Thompson P..D, Dang H.T, Galligan M.A., Oza A.K. and Haussler MR. Two basic amino acids C-terminal of the proximal box specify functional binding of the vitamin D receptor to its rat osteocalcin deoxyribonucleic acid-responsive element, *Endocrinology*, (2003);144(11):5065-5080.
- 72-Haussler M.R., Whitfield G.K, Kaneko I., Haussler C.A., Hsieh D., Hsieh J.C. and Jurutka P.W. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int*, (2013); 92(2):77-98.

- 73-Uitterlinden A.G., Fang Y, Van Meurs J.B, Pols H.A. and Van Leeuwen J.P. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms, *Gene*, (2004); 338(2):143-56.
- 74-Adorini L., Vitamin D receptor polymorphisms in primary biliary cirrhosis: a functional connection?, *J Hepatol.*(2006); 371: 1-12.
- 75-Valdivielso J.M. and Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta*, (2006); 371(1-2):1-12.
- 76-Dilmec F., Uzer E., Akkafa F., Kose E. and Kuilenburg A.B. Detection of VDR gene Apal and Taql polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population, *JDiabetesComplications*, (2010); 24(3):186-91.
- 77-Reich D.E., Cargill M., Bolk S., Ireland J., Sabeti P.C, Richter D.J., Lavery T., Kouyoumjian R., Farhadian S.F., Ward R. and Lander E.S. Linkage disequilibrium in the human genome, *Nature*, (2001); 10;411(6834):199-204.
- 78-Smith G.D, and Ebrahim S. Mendelian randomization: prospects, potentials, and limitations, *Int J Epidemiol*, (2004); 33(1):30-42.
- 79-Ozdemir F.N., Sezer S., Atac B., Tural E., Verdi H., Sahin F. and Haberal M. Vitamin D receptor Bsm1 and Taql gene polymorphisms in a Turkish ESRD population: influences on parathyroid hormone response. *Transplant Proc*, (2005); 37(7):2922-2924.
- 80-Panierakis C., GoulielmosG., MamoulakisD., Petraki E., Papavasiliou E. and Galanakis E. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clin Immunol*, (2009);133(2):276-81.
- 81-Stephen T.H., Yang Y., Haitchi H.M., Powell R.M., Holloway J.W. and Yoshisue H. The genetics of asthma, ADAM33 as an example of a susceptibility gene. *Proc Am Thor Soc*, (2006); 3 : 440-443.
- 82-Cleo C.D., Postma D.S, Vonk J.M., Bruinenberg M., Schouten J.P. and Boezen H.M.. A disintegrin and metalloprotease 33 polymorphisms and lung function decline in the general population, *Am J Respir Crit Care Med*, (2005); 172 : 329-333.
- 83-Holgate S.T, Davies D.E., Murphy G., Powell R.M., Holloway J.W.. *ADAM 33*: just another asthma gene or a breakthrough in understanding the origins of bronchial hyperresponsiveness?, *Thorax*, (2003); 58 : 466-469.
- 84-Angela S., Nikolas M., Francine J., Julie A.C., Lesley A.L. and Stephen T.H. Polymorphisms in A Disintegrin and Metalloprotease 33 (*ADAM33*) predict impaired early-life lung function. *Am J Respir Crit Care Med*, (2005); 172 : 55-60.

- 85-DeGuzman B., Duck W., Myrick M., Proctor S., Sashti N. and Weber MB. Atopic Asthma and Interleukin-4. Emory, University School of Public Health, (2001); 172: 2-4.
- 86-Chiang C.H, Tang Y.C, Lin M.W. and Chung M.T. Association between the IL-4 promoter polymorphisms and asthma or severity of hyperresponsiveness in Taiwanese, *Respirology*, (2007); 12 : 42-8.
- 87-Sharma S., Nagarkatti R., Rao C.B., Niphadkar P.V., Vijayan V. and Sharma S.K. A\_16\_C haplotype in the *FceRIb* gene confers a higher risk for atopic asthma in the Indian population, *Clin Genet*, (2004); 66 : 417-425.
- 88-Sharma S. and Ghosh B. Promoter polymorphism in the MS4A2 gene and asthma in the Indian population, *Int Arch Allergy Immunol*, (2009); 149 : 208-218.
- 89-Weiss S.T. and Raby B.A. Asthma genetics, *Hum Mol Genet*, (2004); 13 : 83-89.
- 90-Zhang Y., Leaves N.I., Anderson G.G., Ponting C.P., Broxholme J. and Holt R. Positional cloning of a quantitative trait locus on chromosome 13q14 that influences immunoglobulin E levels and asthma, *Nat Genet*, (2003); 34 : 181-186.
- 91-Malerba G. and Pignatti P.F. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates, *J Appl Genet*, (2005); 46 : 93-104.
- 92-Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy, *Nature Rev Immunol*, (2008); 8 : 169-82.
- 93-Shin H.D., Park B.L., Kim L.H., Jung J.H., Wang H.J. and Kim Y.J. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE, *Hum Mol Genet*, (2004); 13 : 397-403.
- 94-Sharma S., Sharma A., Kumar S., Sharma S.K. and Ghosh B. Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-alpha levels, *Am J Respir Cell Mol Biol*, (2006); 35 : 488-495.
- 95-Nagpal K., Sharma S., Rao C.B, Nahid S., Niphadkar P.V. and Sharma SK. TGF beta1 haplotypes and asthma in Indian populations, *Allergy Clin Immunol*, (2005); 115 : 527-533.
- 96-Malerba G. and Pignatti P.F. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates, *J Appl Genet*, (2005); 46 : 93-104.

- 97-Nagarkatti R., Rao C.B., Vijayan V., Sharma S.K. and Ghosh B. Signal transducer and activator of transcription 6 haplotypes and asthma in the Indian population, *Am J Respir Cell Mol Biol*, (2004); 31 : 317-321.
- 98-Batra J. and Ghosh B. N-acetyltransferases as markers for asthma and allergic/atopic disorders, *Curr Drug Metab*, (2008); 9 : 546-553.
- 99-Sharma S., Rajan U.M, Kumar A., Soni A. and Ghosh B. A novel (TG)<sub>n</sub>(GA)<sub>m</sub> repeat polymorphism 254 bp downstream of the mast cell chymase (CMA1) gene is associated with atopic asthma and total serum IgE levels, *J Hum Genet*, (2005); 50 : 276-282.
- 100-Chatterjee R., Batra J., Kumar A., Mabalirajan U., Nahid S. and Niphadkar P.V. Interleukin-10 promoter polymorphisms and atopic asthma in north Indians, *Clin Exp Allergy*, (2005); 35 : 914-919.
- 101-Chatterjee R., Batra J. and Ghosh B. A common exonic variant of interleukin21 confers susceptibility to atopic asthma, *Int Arch Allergy Immunol*, (2009); 148 : 137-146.
- 102-Batra J. and Ghosh B. Genetic contribution of chemokine receptor 2 (CCR2) polymorphisms towards increased serum total IgE levels in Indian asthmatics, *Genomics*, (2009); 94 : 161-168.
- 103-Dawodu A., Vitamin D status of Arab mothers and infants. *J Arab Neonatal*, (2004); 1: 15-22.
- 104-Baroncelli G.I., Bereket A., El Kholy M., Audi L., Cesur Y., Ozkan B., Rashad M., Fernández-Cancio M., Weisman Y., Saggese G. and Hochberg Z. Rickets in the Middle East: role of environment and genetic predisposition. *J Clin Endocrinol Metab*, (2008); 93(5):1743-50.
- 105-Sigmundsdottir H., Pan J. and Debes G.F. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27, *Nat Immunol*, (2005); 8(3): 285-293.
- 106-Baeke F., Korf H. and Overbergh L. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25- dihydroxyvitamin D3 in the immune system, *J Steroid Biochem Mol Biol*, (2010); 121(1-2): 221-227.
- 107-Poon A.H., Laprise C., Lemire M., Montpetit A., Sinnett D. and Schurr E. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy, *Am J Respir Crit Care Med*, (2004); 170: 967-973
- 108-Ogunkolade B.W., Boucher B.J., Prah J.M., Bustin S.A., Burrin J.M. and Noonan K. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians, *Diabetes*, (2002); 51:2294-300.
- 109-Suneetha P.V., Sarin S.K., Goyal A., Kumar G.T., Shukla D.K. and Hissar S. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and

- TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver diseases, *J Hepatol*, ( 2006); 44:856-863.
- 110-Arababadi M.K., Abousaidi H.V. and Hassanshahi. Polymorphisms within Exon 9, But Not Intron 8, of the Vitamin D Receptor Gene Are Associated with Asthma, *Iran J Basic Med Sci*, (2011); 225-230.
- 111-Raby B.A., Lazarus R., Silverman E.K., Lake S. and Lange C. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma, *Am J Respir Crit Care Med*, (2004); 170:1057-1065.
- 112-Saadi A., Gao G., Li H., Wei C., Gong Y. and Liu Q. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the Chinese Han population: a case-control study, *BMC Med Genet*,( 2009);10:71.
- 113-Vollmert C., Illig T., Altmuller J., Klugbauer S., Loesgen S. and Dumitrescu L. Single nucleotide polymorphism screening and association analysis--exclusion of integrin beta 7 and vitamin D receptor (chromosome 12q) as candidate genes for asthma, *Clin Exp Allergy*, (2004); 34:1841-1850.
- 114-Haddad SH., Comparison of Genotypes and Allele Frequency of Vitamin-D Receptor (VDR) Gene Polymorphism BSM-I between Individuals from Syria and some Asian Countries, *SCLA*, (2014); 25-29.g
- 115-Haddad SH., Vitamin-D receptor (VDR) gene polymorphisms (Taq-I & Apa-I) in Syrian healthy population, *Meta Gene* , (2014) ; 646–650.
- 116-Papadopoulou A., Kouis P., Middleton N., Kolokotroni O., Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and vitamin D levels with asthma and atopy in Cypriot adolescents., *Res Med*, (2015) ; 646–650.
- 117-Provedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*. 1983;221:1181–3
- 118-Hansdottir S., Monick M.M., Hinde S.L., Lovan .N, Look D.C., Hunninghake G.W. Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. *J Immunol*. (2008);181:7090–7099.
- 119-Fang W.L., Gao L.B, Liang W.B, Xue H., Bai P., Lv M.L, et al. Association analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in Chinese population with asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. (2009);8:141–147.

- 120-Whitfield G.K., Remus L.S., Jurutka P.W., Zitzer H., Oza A.K., Dang H.T., et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol.* (2001);177:145–159.
- 121-Maalmi H., Sassi F.H., Berraies A., Ammar J., Hamzaoui K., Hamzaoui A. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to asthma in Tunisian children: a case control study. *Hum Immunol.* (2013);74:234–240.
- 122-Pillai D.K, Iqbal S.F., Benton A.S., Lerner J., Wiles A., Foerster .M, et al. Associations between genetic variants in vitamin D metabolism and asthma characteristics in young African Americans: a pilot study. *J Investig Med.*(2011);59:938–46.
- 123-Tizaoui K., Berraies A., Hamdi B., Kaabachi W., Hamzaoui K., Hamzaoui A. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with asthma risk: systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. *Lung.* (2014);192:955–965.
- 124-Li H., Stampfer M.J., Hollis J.B., Mucci L.A., Gaziano J.M., Hunter D., et al. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor polymorphisms, and prostate cancer. *PLoS Med.* (2007);4:e103.