



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة

دراسة مناعية وجزئية لمرضى البهاق Vitiligo في محافظة كربلاء

أطروحة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء وهي جزء من
متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة / علم الحيوان

ماجستير 2011

من

علياء عزيز جبير الموسوي

بإشراف

أ.د. علي حمود السعدي

أ.م.د. هيام عبد الرضا العواد

2016م

1438هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قَالَ رَبِّ اشْرَحْ لِي صَدْرِي (25)
وَيَسِّرْ لِي أَمْرِي (26) وَاحْلُلْ عُقْدَةً مِّنْ
لِّسَانِي (27) يَفْقَهُوا قَوْلِي (28)

صدق الله العلي العظيم

سورة طه

الآيات من (25-28)

الإهداء

الى هادي البرية..... **مجد وآله المنتجبين عليهم افضل الصلاة والتسليم**

الى من انتدبتها في كل محناتي وشهدتها معي في كل خطواتي ووسيلتي
في الدعاء عندالله..... **أم البنين عليها السلام**

الى اغلى واعز مكان في الوجود **وطني الجريح**

الى من أحمل اسمه بكل فخر ويا من أفتقده منذ الصغر ويا من يرتعش قلبي لذكراه ويا من أودعتني لله.....

أبي الغالي

الى رمز الحب وبلسم الشفاء إلى القلب الناصع بالبياض إلى من كان دعائها
سر نجاحي وحنانها ضماد جراحي ريحانة حياتي.....

أمي الحنون

إلى من أظهروا لي ما هو الأجل من الحياة إلى من كانوا ملاذي
وملجئي إلى من تذوقت معهم أجمل اللحظات.....

أخوتي وأخواتي حباً واعتزازاً

الى انيس دربي الطويل ورمز الحب والوفاء ومعه تغلبت على
الصعاب.....

زوجي العزيز

الى كل من ساعدني واعانني احترامي وتقديري

وأساتذتي زملائي اهديكم جهدي المتواضع

شكر وتقدير

الحمد والشكر والثناء لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف خلق الله
أجمعين سيدنا وحبينا محمد عليه أفضل الصلاة وأتم التسليم وعلى أهل بيته ومن تبعهم
بأحسان الى يوم الدين.....

أتقدم بمزيد من الشكر والعرفان لاناس يقدرّون معنى النجاح والابداع الى من كان
لها قدم سبق في ركب العلم والتّعليم استاذتي ومشرقتي الفاضلة (أ.م.د. هيام عبد الرضا
العواد) فهي أهل للشكر والتّقدير ولها مني كلّ الثّناء والتّقدير لمنحني الكثير من معرفتها و
لجهودها المضيئية طيلة مدة البحث وفي تعليمي أسلوب البحث العلمي القويم ، كما تتسابق
الكلمات وتتزاحم العبارات لتنظم عقد الشّكر والامتنان الى من بذل ولم ينتظر العطاء
استاذي وابي الفاضل (أ.د.علي حمود السعدي) فأليه أهدي عبارات الشّكر والتّقدير اذ لم
يأل جهدا في ارشادي وتوجيهي اثناء عملي في البحث. من أيّ أبواب الثّناء سندخل وبأيّ
أبيات القصيد اعير وفي كلّ لمسة من وجودكم وأكفكم للمكرّمات أسطر كنت كسحابة
معطاهه سقت الأرض فاخضرت الى الدكتورة الفاضلة (م.د. منى نجاح الطريحي) في
مختبر الحمض النووي في كلية العلوم /جامعة بابل لجهدها المضيئي معي ومساعدتي طيلة
فترة البحث .ولا يفوتني ان اشكر الاخوات الفاضلات (أ.م.د.علياء سعد وم.د.اسماء محمد)
في كلية العلوم على مد يد العون والمساعدة والوقوف الى جانبي وكذلك اشكر كافة منتسبي
مختبر الحمض النووي في كلية العلوم /جامعة بابل .

كما أتقدم بوافر شكري وامتناني الى السيد العميد المحترم ورئيس قسم علوم
الحياة وكل كادر ومنتسبي قسم علوم الحياة وعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة والى كل
من ساهم في انجاح وتقدم هذا العمل مع مزيدا من التّقدير والاحترام ولو أنّني أوتيت كلّ
بلاغة وأفنييت بحر النّطق في النّظم والنّثر لما كنت بعد القول إلا مقصّراً، ومعترفاً بالعجز
عن واجب الشّكر الى من بث في نفسي افاق الامل لاكمل دراسة الدكتوراه في ميدان
تخصصي استاذي واخي الفاضل م.م قيصر عبد السجاد الياسري ، واتقدم بوافر الامتنان
الى الدكتور علي رحيم الاسدي في مختبر التقطيع النسيجي وكل منتسبيه واخصائي الجلدية
الدكتور لؤي الربيعي ووحدة الاستشارية الجلدية في مستشفى الحسين التعليمي في محافظة
كربلاء .تلوح في سماننا دوماً نجوم برّاقة، لا يخفت بريقها عنّا لحظةً واحدةً، نترقّب
إضاءتها بقلوب ولهانة، ونسعد بلمعائها في سماننا كلّ ساعة، فاستحقت وبكلّ فخر أن يرفع
اسمها في علياننا زملائي في الدراسة (حيدر بخيت ،الاء سجاد، هبة علوان وزينة ثامر)
وكل زملائي واصدقائي وكل من قصد الله بدعاء لي وكل من مد يد المساعدة لي جزاه الله
خييراً عني .

الخلاصة

هدفت الدراسة الى تسليط الضوء على مرض البهاق، من خلال اجراء الأختبارات المناعية والوراثية، ومعرفة التغير في مستويات بعض المتغيرات المناعية، وبعض الهرمونات وبعض الجينات بطرق وراثية مختلفة لدى المصابين بمرض البهاق وكذلك معرفة العلاقة بين تلك المعايير ومدى تاثيرها بتلك الجينات قيد الدراسة ، وقد تضمنت الدراسة الحالية 50 شخصاً من مرضى البهاق ، فضلاً عن 50 شخصاً (أصحاء ظاهرياً) بوصفهم مجموعة سيطرة للدراسة وتم جمع تلك العينات من مستشفى الحسيني التعليمي في محافظة كربلاء (وحدة الاستشارة الجلدية) خلال الفترة الزمنية من 2015/5/1 ولغاية 2016/1/15. وقد تم فحص أمصال جميع المرضى لتقدير مستويات المعايير المناعية وهي كل من Enzyme linked Immunosorbent assays (ELISA) وكذلك بتقنية التآلق المناعي PCR-IL-2 ، TNF- α ، SOD-1 و Cortisol باستخدام تقنية الأليزا Enzyme linked Immunosorbent assays (ELISA) وكذلك بتقنية التآلق المناعي assay ، كما تم دراسة التغيرات الوراثي لجين *IL-2RA* بتقنية التباين في أطوال قطع التقييد-PCR RFLP وكذلك دراسة التغيرات الجيني لجين *TNF- α* بتقنيتي PCR-ARMS ومسح الشريط المفرد-PCR SSCP وقد بينت النتائج مايلي:

قسمت عينات المرضى تبعاً للعمر الى خمس فئات (29-30)(39-40)(49-50)(59-60) (19-10) (20 سنة وبناءً على هذا التقسيم بلغ العدد والنسبة لكل فئة 10 (20.0%) كما هو الحال مع مجموعة السيطرة، كما أظهرت نتائج البحث من خلال تقسيم مرضى البهاق على أساس الجنس فقد كانت النتائج كما يلي فقد بلغت عدد ونسبة الذكور لدى المرضى 42 (84%) اما الاناث فقد بلغت عددها والنسبة 8 (16%) كما تم تقسيم المرضى إلى مجموعة المدخنين بلغ عددهم 13 (26%) ومجموعة غير المدخنين 37 (74%) ، بينما بلغت نسب المرضى تبعاً لوجود التاريخ العائلي وعدم وجوده 20 (40.0%) و 30 (60.0%) على التوالي ، بينما كانت الحالة معكوسة تبعاً إلى صلة القرابة بين الوالدين للمرضى ، أما الحالة الاجتماعية فقد قسمت مجموعة المرضى إلى متزوج وغير متزوج بواقع 33 (66.0%) و 17 (17.0%) على التوالي بينما شهدت نسب المرضى تبعاً إلى موقع الإصابة كما يلي 30 (60.0%) المنتشر في كافة أنحاء الجسم ، المصاب في الأطراف 18 (36.0%) ، المصاب بالبطن والظهر 1 (2.0%) والمصاب بالوجه 1 (2.0%) وأخيراً بينت النتائج نسب المرضى على أساس مدة الإصابة بالمرض والتي قسمت على مجاميع من (1-80) شهر وقد بلغت لديها النسبة 16 (32.0%)، من (81-160) شهرو كانت نسبتها 11 (22.0%)، من (161-240) شهر وكانت نسبتها 6 (12.0%)، من (241-320) شهر بلغت نسبتها 6 (12.0%) ، من (321-400) ظهرت نسبتها 11 (22.0%) . الجانب المناعي من الدراسة فقد سجلت المعايير المناعية قيد الدراسة والمتأثرة بمرض البهاق ارتفاعاً معنوياً مع العمر بشكل عام عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) ظهرت ادناها لدى الفئة العمرية من (10-19) سنة اذ أظهرت متوسطات مضاد الاكسدة من نوع SOD-1 ارتفاعاً معنوياً

(0.00) عند مقارنة مع مجموعة السيطرة كما ارتفعت قيم المتوسطات لكل من TNF- α ، IL-2 لتبلغ لدى المستويين (0.32±8.47)، (15.25±440.86) (pg/ml) على التوالي اما لدى السيطرة (0.33 ±4.91)، (3.00±156.53) (pg/ml) على التوالي، بينما انخفضت مستويات السيروتونين والكورتيزول مع متوسطات الأصحاء وسجلت أعلى المعدلات لتلك المعايير بشكل معنوي (0.00) لدى الفئة العمرية من (50-59) سنة ليبلغان (0.35±1.47)(20.36±72.08) على التوالي مقارنة مع السيطرة ، اذ ارتفع معدل SOD-1 لدى المرضى ضمن هذه الفئة العمرية بشكل معنوي (0.00) ليبلغ متوسطه (62.15±810.99) كما ارتفع مستوى TNF- α و IL-2 والسيروتونين والكورتيزول ارتفاع معنوي (0.00) ليبلغ (0.59±19.58)، (34.48±744.82) (pg/ml)، (0.35±1.47) (ng/ml)، (20.36±72.08) (µg/dl) على التوالي مقارنة بمعدلات مجموعة السيطرة والتي بلغ لديها نفس تلك المعايير (0.87±9.77) ، (158.19±314.06) (pg/ml)، (0.07± 0.82) (ng/ml) ، (3.78± 17.38) (µg/dl) على التوالي. كما كان هناك تأثيراً لنوع الجنس على المعايير المناعية قيد الدراسة وهنا تناولت التحليل الأحصائية دراسة ذكور المرضى مع مقارنتها مع ذكور مجموعة السيطرة أذ ظهر أن كلاً من SOD-1 ، TNF- α ، السيروتونين والكورتيزول قد ارتفع بشكل معنوي (0.00) لدى المرضى مقارنة مع مجموعة الاصحاء عدا IL-2 الذي انخفض بشكل معنوي (0.73) عند ذكور مرضى الربو مقارنة مع السيطرة، كما أجرت الدراسة مقارنة بين أنثى مرضى الربو وبين أنثى مجموعة السيطرة اذ أظهرت نتائج المقارنة ارتفاع معنوي في كافة المعايير المناعية والسيروتونين والكورتيزول عند مستوى احتمالية (P≤0.05) لأنثى مرضى الربو عند المقارنة بين معدلات نفس المعايير لأنثى مجموعة السيطرة .

تناول البحث دراسة تأثير التدخين ودوره السلبي على مرض الربو، وقد قسمت عينات المرضى بين مدخنين وغير المدخنين اذ ارتفعت قيمة SOD-1 و TNF- α بشكل معنوي لدى المرضى المدخنين لتبلغ (71.06±725.06)، (3.09±12.75) (pg/ml) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة (51.58±225.57) ، (1.42±7.25) (pg/ml) بينما شهد معدل IL-2 انخفاضا معنوياً في مستوياته (70.64±611.58) (pg/ml) مقارنة مع مجموعة السيطرة ليبلغ لديها (379.18±199.15) (pg/ml) اما السيروتونين والكورتيزول فقد ارتفعت مسوياتهما معنوياً مقارنة بمجموعة الاصحاء. ابرزت نتائج البحث اهمية التأريخ العائلي وذلك من خلال ظهور فروق معنوية بين المرضى الذين يمتلكون تأريخ عائلي للمرض والذين لا يمتلكون تأريخ عائلي فقد بينت النتائج ارتفاع مستويات المعايير المناعية والهرمونات قيد الدراسة في أمصال الاشخاص المصابين بمرض الربو والذين لديهم أصابات بنفس المرض بين أفراد العائلة مقارنة بالمرضى الذين لا يمتلكون ظهور لهذا المرض . بينت النتائج انخفاض في مستويات المعايير المناعية والهرمونات لدى المرضى الذين يمتلكون صلة قرابة بين الوالدين مقارنة بالمرضى الذين لا يمتلكون صلة قرابة بين الوالدين وقد كان هذا الانخفاض معنوياً عند مستوى احتمالية (P≤0.05) ، كما تناولت تأثير الحالة الاجتماعية على مستويات المعايير المناعية والهرمونات في المصل اذ لوحظ ارتفاع متوسطات تلك المعايير لدى المتزوجين مقارنة بغير المتزوجين. أما مدة

الإصابة بالمرض بعد تقسيمها على فئات اعتماداً على الأشهر إذ لوحظ تباين مستويات SOD-1 على اختلاف تلك الفترة ، أما TNF- α فقد سجلت أعلى نسبة لدى المجموعة من (161-240) شهر إذ بلغ (3.17±17.07) (pg/ml) وأخيراً أنخفض لدى الفئة من (1-80) شهر ليبلغ (1.69±9.46) (pg/ml)، كما سجلت النتائج ارتفاعات في المتوسطات IL-2 لدى فئات الإصابة من (241-300) شهر (77.87±700.07) (pg/ml) في حين أنخفضت لدى بقية المجاميع أما السيروتونين فقد سجل ارتفاعاً معنوياً في المجموعة المتراوحة بين (1-80) شهر (67.36±672.58) (ng/ml) في حين تباينت المعدلات الأخرى على اختلاف المجاميع الأخرى كما هو الحال بالنسبة للكورتيزول . أظهرت نتائج البحث وجود ارتباط معنوي عند مستوى الدلالة الأحصائي ($P \leq 0.05$) بين المعايير المناعية قيد الدراسة بشكل عام ، بينما أظهرت نتائج الدراسة وجود ارتباطات بين المعايير المناعية تبعاً للعمر ومدة الإصابة بالمرض، إذ ظهر وجود ارتباط معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) و ($P \leq 0.05$) ثم تبدأ بفقدان الارتباط تدريجياً مع التقدم بالعمر والتقدم بالإصابة.

تم الحصول على نتائج التضخيم من تقنية *IL-2RA* gene RFLP-PCR وقد تبين أن الوزن الجزيئي لجين *IL-2RA* هو 180pb أما نتائج التغاير الجيني فقد ظهرت أن نمط B هو الأكثر تردد كما تبين أن النمط B هو الأكثر تردد مقارنة مع النمط A لكن كان تردده في المرضى أقل من مجموعة السيطرة بشكل معنوي . تم تضخيم قطع النيوكليوتيد لجين *ARMS-PCR (308)* ومن خلال استخدام تقنية SSCP-PCR وبعد الترحيل على وسط الأكريلاميد تم الحصول على النتائج إذ تبين أن نمط 3AA والذي يمثل الثلاث حزم هو الأكثر تردد في مرضى الربو بينما كان النمط 4BB الذي يمثل الأربع حزم هو الأقل تردد لدى المرضى. في ضوء ما بينته النتائج نستنتج وجود علاقة طردية للعمر على مستويات المعايير المناعية والهرمونات وكذلك وجود تأثير لكل من الجنس والتدخين وصلة القرابة بين الوالدين ومدة الإصابة بالمرض على تلك المعايير إضافة إلى وجود تغاير وراثي في جينات التي تشمل كل من *IL-2RA* وجين TNF- α لمرضى الربو .

قائمة المحتويات

ص	الموضوع	ت
	الفصل الأول	
1	المقدمة	
	الفصل الثاني	
4	استعراض المراجع	
4	تعريف مرض البهاق وتاريخ اكتشافه	.1.2
5	الجلد	.2.2
5	تركيب الجلد	.1.2.2
6	الخلايا الصبغية للجلد	.2.2.2
7	انواع البشرة العرقية	.3.2.2
7	تنظيم عملية التصبغ على المستوى الجيني	.4.2.2
9	أسباب البهاق وأماكن حدوث المرض	.3.2
12	الميزات المظهرية لمرض البهاق	.4.2
13	تصنيف مرض البهاق	.5.2
15	تشخيص مرض البهاق	.6.2
16	الانتشار	.7.2
16	مرض البهاق والمناعة الذاتية	.8.2
17	مرض البهاق والاستجابة المناعية الخلطية	.1.8.2
18	مرض البهاق والاستجابة المناعية الخلوية	.2.8.2
19	السيتوكينات وموت الخلايا المبرمج	.3.8.2

20	عامل التنخر الورمي نوع الفا TNF- α	اولا:
21	الحركي الخلوي الثاني IL-2	ثانيا:
22	مرض البهاق والاجهاد التأكسدي	.9.2
23	مضاد الاكسدة من نوع SOD-1	.1.9.2
25	هرمون الكورتيزول	.2.9.2
26	السيروتونين	.3.9.2
27	الوراثة ومرض البهاق	.10.2
29	الجينات الخاصة بعامل التنخر الورمي نوع الفا TNF- α	اولا :
30	الجينات الخاصة بالحركي الخلوي الثاني IL-2	ثانيا:
	الفصل الثالث	
31	المواد وطرائق العمل	
31	الأجهزة والأدوات المستخدمة	1.3
31	المواد المستخدمة	2.3
33	طرائق العمل	3.3
33	عينات الدراسة	1.3.3
33	جمع العينات و تخزينها	2.3.3
34	تصميم تجربة البحث	4.3
35	طرائق القياس المناعي	5.3
35	طريقة قياس تركيز الحركي الخلوي الثاني وعامل التنخر الورمي نوع الفا بتقنية الاليزا	.1.5.3
38	طريقة قياس تركيز مضاد الاكسدة SOD-1 وهرمون السيروتونين	.2.5.3
41	طريقة قياس تركيز هرمون الكورتيزول	.3.5.3
42	دراسة التغيرات الوراثية لجينات الحركي الخلوي الثاني وعامل التنخر الورمي	6.3

42	طريقة استخلاص DNA	1.6.3
43	الترحيل	2.6.3
45	طريقة عمل PCR	3.6.3
45	تحديد البودئ	اولا :
45	تخفيف البودئ	ثانيا:
46	تحديد درجة الحرارة المثالية وضروف التضخيم والوزن الجزيئي لجين IL-2RA بتقنية PCR وتحميل ناتج تفاعل البلمره المتسلسل والترحيل الكهربائي	ثالثا:
49	دراسة التغيرات الجيني لجين TNF- α باستخدام تقنية البلمرة الرجعية الطافرة لجين (308) TNF- α بتقنية ARMS-PCR	رابعا:
53	التحليل الإحصائي	
الفصل الرابع		
54	النتائج والمناقشة	
54	الدراسة الديموغرافية	1.4
54	دراسة المجاميع (السيطرة والمرضى) تبعا للمتغيرات	1.1.4
56	تردد مواقع الاصابة في الجسم تبعا للفئات العمرية لمرضى الربو	2.1.4
58	تردد مواقع الاصابة في الجسم تبعا لنوع الجنس لمرضى الربو	3.1.4
59	تردد مواقع الاصابة في الجسم تبعا للتدخين لمرضى الربو	4.1.4
60	تردد مواقع الاصابة في الجسم تبعا للتاريخ العائلي لمرضى الربو	5.1.4
62	تردد مواقع الاصابة في الجسم تبعا لصلة القرابة بين الوالدين لمرضى الربو	6.1.4
63	تردد مواقع الاصابة في الجسم تبعا للحالة الاجتماعية لمرضى الربو	7.1.4
64	تردد مواقع الاصابة في الجسم تبعا لمدة الاصابة بالمرض لمرضى الربو	8.1.4
66	الدراسة المناعية ومرض الربو	2.4
66	الفروقات في المتوسطات لمستويات المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى الربو بشكل عام	1.2.4
67	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى الربو تبعا للعمر	2.2.4

76	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للجنس	3.2.4
78	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للتدخين	4.2.4
81	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للتأريخ العائلي	5.2.4
83	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً لصلة القرابة بين الوالدين	6.2.4
85	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للحالة الاجتماعية	7.2.4
87	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً لمدة الإصابة بمرض البهاق	8.2.4
90	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق بشكل عام	9.2.4
96	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للعمر	10.2.4
104	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً لمدة الإصابة	11.2.4
110	الدراسة الجزيئية ومرض البهاق	3.4
110	استخلاص الـ DNA الكرموسومي من الدم	1.3.4
111	تحديد درجة الحرارة والظروف المثالية لجين IL-2RA بتقنية التدرج البلمرة المنتجة PCR-Gradient	2.3.4
111	نواتج بلمرة جين IL-2RA بتقنية PCR وتحديد الوزن الجزيئي للجين (PCR products)	3.3.4
112	الكشف عن التغيرات الوراثي لجين IL-2RA وتردده بتقنية تحديد التغيرات الوراثي لقطع النكليوتيد باستخدام الانزيم القاطع (IL-2RA genotype polymorphism with RFLP-PCR)	4.3.4
115	تحديد نواتج (PCR products) والوزن الجزيئي لجين TNF- α (308) بتقنية ARMS-PCR	5.3.4
116	الكشف عن التغيرات الوراثي لجين TNF- α وتردده بتقنية ARME-PCR	6.3.4
118	الكشف عن التغيرات الوراثي لجين TNF- α بتقنية تبدلات الشريط المفرد ذات التغيرات الوراثي	7.3.4
121	العلاقة الارتباطية بين المعايير المناعية وبين الجينات	4.4
121	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات تبعاً لجين IL-2RA	1.4.4
123	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات تبعاً لجين ARMS-TNF- α	2.4.4

125	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات تبعاً لجين SSCP-TNF- α	3.4.4
1	الاستنتاجات والتوصيات	
128	الاستنتاجات	
129	التوصيات	
130	المصادر	
130	المصادر العربية	
130	المصادر الأجنبية	
149	الملاحق	

ص	قائمة الجداول	ت
31	المواد المستخدمة	1.3
31	الأجهزة المستخدمة	2.3
45	تحديد البودئ	3.3
46	Master mix components مكونات مسترمكس	4.3
47	مكونات المستخدمة في التدرج لتقنية PCR والتضخيم	5.3
47	الظروف المستخدمة في تحديد درجة الحرارة المثالية لتضخيم جين (IL2RA) بتقنية pcr gradient	6.3
48	الظروف المستخدمة لتقنية PCR لجين (IL2RA)	7.3
49	MWOI Restriction enzyme المواد والتراكيز الخاصة بانزيم القطع	8.3
50	المواد والتراكيز التي استخدمت في تقنية PCR-RFLP	9.3

51	الظروف المستخدمة لتقنية ARMS-PCR الخاصة بجين (TNF- α 308)	10.3
51	المواد والتراكيز التي استخدمت في تقنية ARMS-PCR	11.3
53	ظروف الترحيل لتقنية SSCP-PCR	12.3
53	مكونات الترحيل لتقنية SSCP-PCR	13.3
55	دراسة المجاميع (السيطرة والمرضى) تبعا للمتغيرات	1.4
57	وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم وبين الفئات العمرية	2.4
58	وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم ونوع الجنس	3.4
60	وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم والتدخين	4.4
61	وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم والتأريخ العائلي	5.4
62	وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم ودرجة القرابة بين الوالدين للمرضى	6.4
64	وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم والحالة الاجتماعية	7.4
65	وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم ومدة الاصابة بالمرض	8.4
66	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق	9.4
67	متوسطات SOD-1 تبعا للفئات العمرية	10.4
68	متوسطات TNF- α تبعا للفئات العمرية	11.4
69	متوسطات IL-2 تبعا للفئات العمرية	12.4
70	متوسطات Serotonin تبعا للفئات العمرية	13.4
71	متوسطات Cortisol تبعا للفئات العمرية	14.4
76	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى ذكور مرضى البهاق والسيطرة	15.4

77	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى اناث مرضى البهاق والسيطرة	16.4
79	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى المدخنين لمرضى البهاق والسيطرة	17.4
80	الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى غير المدخنين لمرضى البهاق والسيطرة	18.4
82	مستويات المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعا للتأريخ العائلي	19.4
84	مستويات المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعا لصلة القرابة بين الوالدين	20.4
85	مستويات المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعا للحالة الاجتماعية	21.4
86	مستويات المعايير المناعية والهرمونات لدى مجموعة السيطرة تبعا للحالة الاجتماعية	22.4
88	مستويات المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعا لمدة الاصابة بالمرض	23.4
97	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق للفئة العمرية الاولى	25.4
98	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق للفئة العمرية الثانية	26.4
99	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق للفئة العمرية الثالثة	27.4
100	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق للفئة العمرية الرابعة	28.4
101	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق للفئة العمرية الخامسة	29.4
105	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق لفترة الاصابة بين (1-80) شهر	30.4
106	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق لمدة الاصابة بين (81-160) شهر	31.4
107	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق لمدة الاصابة بين (161-240) شهر	32.4
108	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق لمدة الاصابة بين (241-320) شهر	33.4
109	الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق لمدة الاصابة بين (321-400) شهر	34.4
113	التغاير الجيني لجين IL-RA باستخدام تقنية PCR- RFLP	35.4
116	الاوزان الجزيئية لجين TNF- α (308)	36.4

116	التغاير الجيني لجين TNF- α باستخدام تقنية PCR- ARMS	37.4
118	التغاير الجيني لجين TNF- α SSCP باستخدام تقنية PCR- SSCP	38.4
121	الفروقات بين المعايير تبعا لجين IL-2RA لمجموعة المرضى	39.4
122	الفروقات بين المعايير تبعا لجين IL-2RA لمجموعة السيطرة	40.4
123	الفروقات بين المعايير تبعا لجين ARMS-TNF- α لمجموعة المرضى	41.4
124	الفروقات بين المعايير تبعا لجين ARMS-TNF- α لمجموعة السيطرة	42.4
125	الفروقات بين المعايير تبعا لجين SSCP-TNF- α لمجموعة المرضى	43.1
126	الفروقات بين المعايير تبعا لجين SSCP-TNF- α لمجموعة السيطرة	44.4

ص	قائمة الإشكالات	ت
34	تصميم تجربة البحث	1
37	منحني تركيز IL-2	2
37	منحني تركيز TNF- α	3
40	منحني تركيز SOD-1	4
40	منحني تركيز السيروتونين	5
91	الارتباط بين TNF- α و SOD-1	6
92	الارتباط بين IL-2 و SOD-1	7
92	الارتباط بين SOD-1 وبين السيروتونين	8
93	الارتباط بين SOD-1 وبين الكورتيزول	9
93	الارتباط بين TNF- α و IL-2	10
94	الارتباط بين TNF- α و السيروتونين	11
94	الارتباط بين TNF- α و الكورتيزول	12
95	الارتباط بين IL-2 و السيروتونين	13
95	الارتباط بين IL-2 و الكورتيزول	14
96	الارتباط بين السيروتونين و الكورتيزول	15
110	استخلاص DNA من (1-10) عينة للمرضى	16
110	استخلاص DNA من (1-10) عينة لمجموعة السيطرة	17
111	IL-2RA gen with PCR- gradient	18

112	IL-2RA gene PCR- product للمرضى	19
113	IL-2RA pcr- rflp للمجموعة التجريبية	20
114	IL-2RA pcr- rflp لمجموعة السيطرة	21
117	TNF- α (308) gen with PCR-ARMS لمجموعة المرضى وعينة السيطرة	22
117	TNF- α (308) gen with PCR-SSCP للمجموعة التجريبية والضابطة	23
120	TNF- α (308) gen with PCR-SSCP لمجموعة المرضى الترحيل لمدة ساعتين على وسط الاكرليمايد عند مستوى فولتية 70	24
120	TNF- α (308) gen with PCR-SSCP لمجموعة والسيطرة الترحيل لمدة ساعتين على وسط الاكرليمايد عند مستوى فولتية 70	25

ص	قائمة الملاحق	ت
149	قائمة البيانات	1
150	(1-4) وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم وبين الفئات العمرية	2
150	شكل (2-4) وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم ونوع الجنس	3
151	شكل (3-4) وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم والتدخين	4
151	شكل (4-4) وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم والتاريخ العائلي	5
152	شكل (5-4) وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم ودرجة القرابة بين الوالدين للمرضى	6
152	شكل (6-4) وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم والحالة الاجتماعية	7
153	شكل (7-4) متوسط SOD-1 لمرضى الربو	8
153	شكل (8-4) متوسط TNF- α لمرضى الربو	9
154	شكل (9-4) متوسط IL-2 لمرضى الربو	19
154	شكل (10-4) متوسط السيروتونين لمرضى الربو	11
155	شكل (11-4) متوسط الكورتيزول لمرضى الربو	12

155	جدول (4-24) الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق بشكل عام	13
-----	--	----

قائمة المختصرات

List of Abbreviations

الرمز	المصطلح
ACTH	Adrenocorticotrophic hormone
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
AMP	Adenin Mono Phosphate
CAT	Catalase
CREB	cAMP-responsive-element-binding protein
CRH	Cortico releasing hormone
CSF	Colony-stimulating factor
CSF	Colony-stimulating factor
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FITC	Fluoresceinisoithiocyanate
GM	Granulocyte macrophage
HLA	Human leukocyte antigen
IA	Immunoasorbent assay
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL-2	Interleukin-2
MC1R	melanocortin -1 receptor
MiRNA	Micro-RNA molecules
MSH-α	melanocyte stimulating hormone- α
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP-PCR	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	reactive oxygen species
SNP	Single nucleotide poolymorphisims
SOD-1	Superoxide Dismotase-1
SSCP-PCR	Single Strand Conformation Polymorphism
SCF	Stem cell factor
TNF-α	Tumor necrosis factor- α
TRP-1	Tyrosinase-Protein 1
TRP-2	Tyrosinase-Protein 2

الفصل الأول

المقدمة

INTRODUCTION

المقدمة

Introduction

يعرف مرض البهاق على انه مرض مناعي ذاتي ناتج من غياب صبغة الميلانين في بعض مناطق الجسم نتيجة لغياب الخلايا الميلانية (Shen *et al.*, 2016) اذ يعد الجلد هو الغطاء الخارجي للجسم والذي يعمل على حمايته من المحيط الخارجي بكافة مؤثراته ويتألف الجلد من العديد من الخلايا ومنها الخلايا الصبغية (Melanocytes) فبالإضافة إلى الوظائف العديدة التي تقوم بها الخلايا الصبغية في الجسم فهي تعد الخلايا المسؤولة عن إنتاج صبغة الميلانين melanin وهي الصبغة المسؤولة عن أصفاء اللون الخاص للجلد (Lin and Fisher, 2007 ; Elgendy *et al.*, 2016). يعد مرض البهاق من الأمراض الهامة والشائعة في مجتمعاتنا، أذ يتصف بظهور بقع بيضاء مختلفة الأحجام والأشكال وفي أماكن مختلفة من الجسم ويمكن أن يظهر هذا المرض في كلا الجنسين وفي أي عمر، أذ ينتشر مرض البهاق لدى 1-2% من سكان العالم وإن الأسباب الحقيقية وراء حدوث مرض البهاق غير معروفة بشكل واضح فهي نتاج لمساهمة عدة عوامل مرضية لذلك وضعت عدة نظريات لتفسير أسباب تحطم الخلايا الميلانية وفقدان عملية التصبغ في الجلد والتي تنتهي بظهور مرض البهاق ومن هذه النظريات هي النظرية المناعية (Immunologic theory) ونظرية الأجهاد التأكسدي (Oxidative stress theory) والنظرية الوراثية (Genetic theory) (Bilal and Anwar, 2014) .

كشفت البحوث الذي قدمه Aslanian وآخرون 2010 عن وجود دور هام لعلاقة المناعة بالمرض وتجدر الإشارة إلى أن تقرحات البهاق في الجلد تتميز بأرتشاح الخلايا المناعية مثل الخلايا التائية والبلاعم، اذ تظهر الخلايا للمفاوية في المناطق المتقرحة في مرحلة مبكرة من الإصابة مما يشير إلى فعاليتها في تطور المرض وظهور البقع في الأماكن المتقرحة للبهاق . كما تم الكشف عن الاستجابة المناعية الخلوية وفعالية الأجسام المضادة ضد المستضدات للخلايا الصبغية في المصل لدى مرضى البهاق (Laddha *et al.*, 2013). أظهرت الدراسات المختبرية زيادة في إنتاج السيتوكينات الالتهابية الأولية (pro-inflammatory cytokines) من نوع IL-6 و IL-8 و TNF- α و IL-2 ، مما يبرز دورها في مهاجمة وتحطيم الخلايا الميلانية ، ومما يزيد من دعم تلك الدراسات هو وجود زيادة في مستويات IL-2 في مصل الدم وفي تقرحات الجلدية للمناطق المصابة بالمرض والذي بدوره يزيد من

ارتفاع مستويات الخلايا التائية (Le Poole and Luiten, 2008). وفقاً لفرضية الاجهاد التأكسدي التي تقترح على ان الاكسدة هي أحد مسببات حدوث المرض من خلال زيادة تراكم العامل المؤكسد بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في الخلايا الصبغية للبشرة للمرضى الذين يعانون من مرض البهاق ، فقد أظهرت بعض الدراسات مساهمة عوامل الاكسدة في الفسيولوجيا المرضية لمرض البهاق ، إذ لوحظ تبدلات في مضادة الأكسدة مع حدوث ارتفاع معنوي كبير في مستويات إنزيم (Superoxide SOD-1 dismutase) في الجلد والمصل لمرضى البهاق (Yildirim *et al.*, 2004).

وتشير الدراسات الحديثة إلى أن العوامل الوراثية قد تلعب دوراً رئيساً في التسبب في مرض البهاق (Birlea *et al.*, 2013; ; Elgendy *et al.*, 2016). إذ يرتبط بتضرر عدد من الجينات ذات العلاقة بالمرض، وهناك العديد من الجينات المرشحة المسببة للمرض ، بما في ذلك $TNF-\alpha$ و-IL 2RA التي تشارك في تنظيم المناعة وتترافق مع البهاق (Spritz, 2010). يؤدي عامل التنخر الورمي نوع الفا ($Tumor\ necrosis\ factor\ alpha\ TNF-\alpha$) إلى استجابة بعض المركبات الالتهابية الأولية (pro- inflammatory) ويلعب دوراً حاسماً في التسبب في العديد من الاضطرابات الجلدية بما في ذلك مرض البهاق (Taieb, 2012). تقع الجينات الخاصة بـ $TNF-\alpha$ ضمن منطقة معقد التوافق النسيجي الرئيسي الثالث والتي تسمى بـ (major histocompatibility complex III genes) للكروموسوم السادس ويظهر الارتباط وثيقاً بالجينات المرتبطة بمستضد الخلايا لخلايا الدم البيضاء البشرية من نوع $HLA-B$ gene (Human leukocytes antigen-B) وكذلك الصنف الثاني والذي تسمى ايضاً بجينات مستضدات خلايا الدم البيضاء للإنسان لكن من نوع (Human leukocytes antigen- DR) $HLA-DR$ gene (Westendorp *et al.*, 1997) درس الجين $TNF-\alpha$ gene عند الموقع (rs1800629) داخل منطقة المشغل للجين $TNF-\alpha$ promoter gene والذي يؤثر في التعبير الجيني والتشهير الخاص بعامل التنخر الورمي لإنتاج هذا النوع من البروتينات (Abraham and Kroeger, 1999). تحدث العديد من الأمراض المناعية الذاتية المختلفة في الأسرة نفسها ، مما يشير إلى أن المصابين قد يشتركون بمجموعة من المتغيرات الجينية الحساسة ، مما يعني أنها تعد المسببات الأكثر شيوعاً لتلك الأمراض (Corporaal *et al.*, 2002). إذ تشير الأبحاث والدراسات إلى وجود جينات معينة تسمى بالجينات المشتركة share genes تساهم في ظهور هذه الأمراض المناعية الذاتية (Dideberg *et al.*, 2007).

أشارت بعض الدراسات الى علاقة هرمون الكورتيزول بمرض البهاق ، فهو يعمل على كبح الاستجابة المناعية المرتفعة في الجسم للأشخاص المصابين بمرض البهاق، كما يعمل على كبح الأجسام المضادة الذاتية (Auto antibodies) إضافة إلى أنه يعمل على تحفيز الموت المبرمج (Apoptosis) للخلايا التائية النشطة ضد الخلايا الميلانية ، فقد لوحظ ارتفاع مستويات الكورتيزول في المصل إضافة إلى ارتفاعه في المناطق المصابة بالمرض (Klarquist *et al.*, 2010) . من ناحية أخرى أشارت الدراسات إلى وجود علاقة بين بناء صبغة الميلانين وبين هرمون السيروتونين ، إذ ينتج هرمون السيروتونين عبر مسارات أيضية متعددة وفي أعضاء مختلفة من الجسم، ويعد التربتوفان (Tryptophan) هو البادئة الأساسية لبناء هرمون السيروتونين (Oh *et al.*, 2016) . يقوم هرمون السيروتونين بعدة وظائف في الجلد منها تقلص الاوعية الدموية في الجلد ، الاستجابة للاجهادات (Stress responses) وتنظيم بناء صبغة الميلانين في الجلد خلال الإصابة ببعض الأمراض مثل أمراض سرطان الجلد والأمراض المناعية للجلد التي تزيد او تقلل من بناء صبغة الميلانين والتصبغ مثل مرض البهاق (Slominski *et al.*, 2012) أشار Johansson وآخرون (2015) إلى ان الخلايا الميلانية تعبر عن مسار بناء السيروتونين في الجلد ، لذلك يلاحظ ارتفاع مستوياته في المصل بالإضافة إلى الجلد أثناء الإصابة بمرض البهاق.

ومن خلال ما تقدم تم تسليط الضوء على دراسة تأثيرات بعض الجينات الوراثية مثل $TNF-\alpha$ و $IL-2$ gene على بعض المتغيرات المناعية لدى المصابين بمرض البهاق Vitiligo من خلال ما يأتي:

1. التحري عن بعض مستويات المعايير المناعية مثل عامل التخر الورمي نوع الفا (Tumer $TNF-\alpha$ necrosis factor type alpha) والحركي الخلوي الثاني IL-2 (Interleukin-2) و مضاد الاكسدة من نوع superoxide dismutase(SOD-1) والسيروتونين Serotonin باستخدام تقنية اليزا. وكذلك هرمون الكورتيزول Cortisol باستخدام تقنية التألق المناعي للأشخاص المصابين بمرض البهاق .

2. إجراء دراسة وراثية جزيئية لجين الـ *TNF-α* gene و *IL-2RA* gene باستخدام تقنية PCR و PCR-RFLP و PCR-ARMS و PCR-SSCP وذلك بسبب أهمية هذا المرض وكثرة تكراره في العراق وقلّة الدراسات الوراثية الجزيئية المتعلقة به .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

LITRETURE REVIEW

استعراض المراجع

Literature Review

1.2. تعريف وتاريخ مرض البهاق Definition and History of Vitiligo

إن مرض البهاق هو مرض قديم جداً تعود بدايات اكتشافه إلى العصور القديمة ومازالت الأبحاث الحديثة مستمرة في الكشف عن أصول بداياته إذ تشير الدراسات إلى أن أول وصف لهذا المرض يعود إلى العهد الآشوري في حضارة وادي الرافدين في العراق وتعود إلى سنة 2200 قبل الميلاد من خلال وجود وصف في الآثار والمسلات القديمة التي تعود إلى ذلك العهد ، كما أظهرت الدراسات والأبحاث التي أجريت على الآثار الفرعونية القديمة وجود وصف لمرضى جلديين كانا منتشرين في تلك العصور الوصف الأول لمرض الجذام (Leprosy) والآخر وصف لمرض إزالة أو اختفاء اللون من جلد الإنسان وهو ما له علاقة بمرض البهاق لكنه لم يكن معروف كما هو معروف بالوقت الحاضر ولا تسميته بمرض البهاق بما هو موصوف حالياً (Whitney and Samhita, 1905). منذ ذلك الحين إلى وقتنا الحاضر ينتشر مرض البهاق بشكل واسع في العالم، وتشير الدراسات إلى أن أسباب وهيئة وعلاج هذا المرض مختلفة (Charaka,1949). في السنين الماضية أخذ مرض البهاق مسميات كثيرة ومختلفة على مختلف العصور أما مصطلح البهاق (Vitiligo) فهو يعود إلى الكلمة اليونانية التي تسمى (Vitium) والتي تعني (Defect) بمعنى الخلل أو الضرر ويستخدم مصطلح البهاق (Vitiligo) حالياً في القواميس والمعاجم الطبية (Nair,1978).

يعد مرض البهاق (Vitiligo) على أنه من الأمراض المهمة والشائعة ويُعرف على أنه مرض جلدي يتصف بفقدان التصبغ (Discoloration) من الجلد ويتميز بظهوره على شكل بقع بيضاء-طباشيرية اللون (Chalky-white macules) ومحددة أو ذو لون وردي محمر (Flush) تغطي سطح الجلد ، كما يتميز الشعر النامي في المنطقة الفاقدة للتصبغ والمصابة بهذا المرض بكونها ذو لون اعتيادي أو لون أبيض (Poliosis) (Sehgal, 2007; Glassman,2011). إذ أشارت الدراسات إلى حدوث مسارات مرضية تؤدي إلى تحطم تلك الخلايا وتقود إلى حدوث الأمراض (Pathogenesis) لمرض البهاق ، وظهور هذه البقع قد يكون في سنين مبكرة أو قد يظهر خلال سنين لاحقة من حياة الإنسان

(Lee et al., 2011) ، أسباب البهاق ماتزال غير معروفة بشكل دقيق لكن هناك دراسات تشير إلى وجود العديد من الأسباب منها أسباب وراثية (Genetic factors) وعوامل أجهاد (Stress factors) وعوامل مناعية ذاتية (Autoimmunity factors) وأسباب عصبية (Neural causes) ومركبات سمية فضلا عن فقدان عوامل النمو للخلايا الميلانية في الجلد ، وجميع هذه العوامل تساهم في ظهور مرض البهاق لدى الانسان (Njoo and Westerhof, 2001).

2.2. الجلد The skin

الجلد هو الحاجز والغطاء الرئيس للجسم الذي يحميه من البيئة الخارجية ويعتمد على الخلايا الصبغية المنتجة فضلا عن مكونات خلوية اخرى، وتعد الخلايا الصبغية ذات أهمية بالغة في الجلد بفعل وظيفتها في امتصاص الضوء والحرارة من خلال إنتاج صبغة الميلانين وهي صبغة حيوية توجد في الجلد والعين والشعر تنتج من قبل الخلايا الميلانية وتتأثر بعوامل داخلية وخارجية مثل السايبتوكينات والهرمونات واشعة الشمس (Lin and Fisher, 2007) ، يتركب الجلد من ثلاث طبقات رئيسة هي البشرة (Epidermis) والأدمة (Dermis) وتحت الأدمة (Hypodermis) ، وتترتب البشرة إلى اربعة طبقات رئيسة وهي الطبقة القاعدية او المولدة (Stratum basale or germinativum) ، الطبقة الشفافة (Stratum spinosum) ، الطبقة الحبيبية (Stratum granulosum) والطبقة المتقرنة (Stratum corneum) وتضم البشرة أنواعاً مختلفة من الخلايا وتعد الخلايا الكيراتينية النوع الأهم في البشرة والتي تشكل مايقارب 95% من مجموع الخلايا النموذجية في البشرة فضلاً عن أن وجود أنواع أخرى من الخلايا وهي الخلايا الصبغية (Melanocytes)، خلايا لانجرهانس (Langerhans cells)، خلايا ميركل (Merkel cells) والخلايا المناعية (Leuckocytes) والتي تشكل 5% من مجموع الخلايا للبشرة في الجلد (Yaar and Park, 2012). تعد الخلايا الصبغية من الخلايا المهمة في البشرة وهي ثاني نوع من الخلايا الأكثر أهمية في البشرة والتي لديها القدرة على أنتاج صبغة الميلانين وهي الصبغة المسؤلة عن لون الجلد أذ لم يتم العثور على الخلايا الصبغية في الجلد فحسب ولكن وجدت أيضا في مناطق اخرى في الجسم مثل الشعر ، العينين ، الأذنين والجهاز العصبي المركزي. ان التوزيع المختلف للخلايا الميلانية يعطيها وظائف مختلفة في الكائن الحي، لكنها جميعا تشترك في وظيفة رئيسية واحدة هي بناء صبغة الميلانين (Melanin) في الجلد (Schallreuter et al., 2009). تم تحديد الطفرات التي تؤثر في عملية التصبغ في كثير من الأنواع ويمكن تصنيف هذه الطفرات تبعاً الى التأثير

على عملية التصبغ إلى طفرات مسؤولة عن نقص التصبغ (Hypopigmentation) وطفرات مسؤولة عن فرط التصبغ (Hyperpigmentation) وقد أتاحت هذه الفروق المظهرية الفرصة لتصنيف الجينات التي تؤثر في أعداد الخلايا الصبغية وإمكانية التصبغ والجينات التي تتعلق بعملية التمايز للخلايا الصبغية أو الجينات التي تسيطر على كلا العمليتين معا من حيث العدد والتمايز ، وبشكل عام أصبحت عملية التصبغ أو الطفرات الحاصلة في لون الجلد مصدراً مهماً لتحليل الخلايا الصبغية وتمايزها ونموذجاً لمجالات أوسع للتمايز الخلوي وعلم الوراثة للإنسان (Passeron *et al.*, 2005).

2.2.2. الخلايا الصبغية للجلد :Skin melanocytes

يتم بناء الخلايا الصبغية للجلد في الطبقة القاعدية (Basal layer) من البشرة عند منطقة الأنتصال أو التقاطع مع الأدمة، وتمتلك الخلايا الصبغية تشجرات (Dendrites) تتوسع أو تنتشر بين الخلايا الكيراتينية من الطبقة التي تليها من الأعلى هذه التشجرات تسمح للخلايا الصبغية لأجراء اتصالات مع الخلايا الكيراتينية لنقل صبغة الميلانين هذا الأتصال الخلوي من خلية إلى خلية أخرى يحفز تكاثر وتمايز الخلايا الصبغية نتيجة لعوامل النمو التي تنتجها الخلايا الكيراتينية (Lee *et al.*, 2005)، وبالتالي فإن الجسيم الميلانيني (Melanosome) الموجود في السايوبلازم والذي يحتوي على صبغات الميلانين يمكن ان ينتقل إلى الخلايا الكيراتينية المجاورة عن طريق آليات النقل الخلوي الخاصة بين الخلايا وهي طريقة الاخراج الخلوي (Exocytosis) وهكذا تصل تلك الصبغات وتخزن في الخلايا السطحية للجلد بعد ذلك تتحطم عندما تتحرك نحو سطح الجلد (Marks and Seabra, 2001) . عندما تتواجد تلك الصبغات في الخلايا المتقرنة فإنها تعطي لونا للبشرة مع مزيج من صبغات أخرى موجودة في الجلد مثل الكاروتينات (Carotenoides) ومشتقات الهيموغلوبين (Hemoglobin derivatives) (Brenner and Hearing, 2008). على الرغم من تواجد صبغات أخرى لكن صبغة الميلانين تعد الصبغة الرئيسية في الجلد (Stamatas *et al.*, 2004). وتوجد صبغة الميلانين بلونين مختلفين في البشرة هما: أصفر / أحمر (Pheomelanin) والبني / أسود (Eumelanin) ان وجود هذين النوعين من الصبغات في البشرة هي واحدة من التفسيرات لأختلاف لون البشرة العرقي في العالم كما وتلعب الأشعة فوق البنفسجية عاملاً أساسياً في التأثير على لون البشرة مما تسبب في حدوث تفاوت تصبغات الجلد ، أذ يمكن أن تنتج الضرر الضوئي (Photodamage) الذي يؤدي إلى طفرات وراثية في الحامض النووي بالإضافة إلى تأثيرها على بناء فيتامين D وتصبغات الجلد (Costin and Hearing , 2007).

3.2.2. أنواع البشرة العرقية :Ethnic skin types

تعد صبغة الميلانين هي الصبغة الرئيسية الموجودة في الجلد والتي يمكن أن تؤثر في لون البشرة بعدة طرائق مثل عدد الخلايا الصبغية المتواجدة وفعالية انتاج صبغة الميلانين ونوع صبغة الميلانين وحجم وعدد الأجسام الصبغية وتوزيعها في البشرة إن حجم الأجسام الصبغية في الخلايا مهم في تصبغ الجلد ، فقد ثبت أن الأجسام الصبغية تكون كبيرة الحجم في البشرة السوداء في حين تميل الأجسام الصبغية إلى ان تكون صغيرة الحجم في البشرة البيضاء ، كما ان آلية نقل تلك الأجسام الصبغية من الخلايا الميلانية إلى الخلايا الكيراتينية يمكن أن تؤثر في تصبغ الجلد (Brenner and Hearing , 2008)، يعتمد لون الجلد لدى مختلف الأعراق في جميع أنحاء العالم على عوامل مختلفة مثل العوامل البيئية والوراثية (Rawlings, 2006). إذ أن جميع تلك العوامل يمكن أن تؤثر أيضا في لون الجلد . أثبت Alaluf وآخرون 2002 وجود فروق في الجلد لدى الأشخاص من ذوي العرق الأبيض عن الأشخاص من ذوي العرق الأسود ، إذ يتصف أشخاص العرق الأبيض بوجود عدد قليل من الخلايا الصبغية ، إذ تقدر بـ 1 خلية صبغية لكل 36 خلية كيراتينية ، وتكون الأجسام الصبغية صغيرة الحجم والصبغة الميلانية من نوع (Pheomelanins) فيكون أمتصاصها لأشعة الشمس بشكل قليل ، بينما تتميز البشرة السوداء بوجود عدد أكبر من الخلايا الصبغية ، والأجسام الصبغية موجودة بحجم أكبر وصبغة الميلانين من نوع (Eumelanins) . كما إن توزيعها في البشرة بصورة غير متساوية مهم جداً ويؤثر على خصائص ولون الجلد إذ أثبتت الأبحاث أيضا أن في الجلد الأبيض يكون توزيع الأجسام الصبغية متركز بشكل كبير في الطبقات السفلى ويقل توزيعها كلما اقتربنا من السطح بفعل الاحتكاك وقلة الإنتاج مقارنة مع العرق الأسود إذ يكون أنتاجه أكبر وتوزيعه متساوي تقريبا في كل الطبقات لذلك يعطي اللون الغامق للجلد (Thong, 2003; Gendreau et al., 2013).

4.2.2. تنظيم عملية التصبغ على المستوى الجيني

إن عملية التصبغ تعد عملية منظمة في الأنواع المختلفة من الفقريات ، ففي بعض الأنواع مثل الأسماك تحدث عملية التصبغ من قبل أنواع أخرى من الخلايا غير الخلايا الصبغية للإنسان والمعروفة بأسم (Xanthophores) و (Iridiphores) (Ziegler, 2003) ، أما في الإنسان وبعض الحيوانات

الفقرية الأخرى ، مثل الفئران فعلى الرغم من تحديد أكثر من 100 موقع جيني loci للجينات التي تشارك في تنظيم عملية الترجمة لحدوث عملية التصبغ ، ولكن أثبت بأن مستقبلات من نوع ميلانوكورتين (Melanocortin-1 receptor) MC1R بأنها هي المحدد الرئيس للطراز المظهري (Phenotype) لعملية التصبغ في الإنسان والفئران اذ يسيطر على تشفير وعمل هذه المستقبلات المسؤولة عن ظهور اللون أليل وراثي (Rees, 2003) . وقد شخص هذا الأليل لأول مرة وهو المسؤول عن تشفير تلك المستقبلات MC1R في الفئران على أساس الطفرات الحاصلة في لون الشعر والناجمة عن حدوث طفرات في تلك الجينات المشفرة لهذه المستقبلات (Lin and Fisher, 2007). أذ أثبت إن الطفرات المتحيزة لهذا الأليل مسؤولة عن الشعر الأصفر (Pheomelanotic) في حين أن الفئران البرية التي لديها الشعر الرمادي من نوع (Eumelanotic) تكون فيها هذه الأليلات من النوع السائد كما توجد هذه الأليلات في حيوانات أخرى مثل القطط والكلاب (Everts *et al.*, 2000) .

يُشفّر أليل المسؤول عن مستقبلات MC-1R سبعة بروتينات ناقلة للغشاء-G-protein coupled receptor) كما ينشط انزيم الادنين الحلقي (Adenyl cyclase) الأمر الذي يؤدي بدوره إلى إنتاج AMP الحلقي ويعمل AMP على فسفرة بروتين من نوع (cAMP-responsive-element-binding protein) CREB وهو عامل بروتيني يوجد في الخلية ويعد أحد المكونات البروتينية التي تدخل في المسارات المسؤولة عن إنتاج صبغة الميلانين في الجلد يعمل عامل CREB بدوره على تنشيط عملية الترجمة لجينات مختلفة مسؤولة عن تشفير إنزيمات مسؤولة عن عملية التصبغ والتمايز للخلايا الصبغية (Levy *et al.*, 2006). أذ يعمل هذا الإنزيم على تحفيز المستقبل من نوع MC1R ، أذ يرتبط مع هرمون تحفيز الخلايا الصبغية من نوع الفا (Melanocyte stimulating hormone- α) MSH- α وهرمون قشر الكظر ACTH (Adrenocorticotrophic hormone) وهذا يسبب زيادة في الإنتاج لصبغة (Eumelanin) وتنظيمها في الجلد (Dorazio, 2006) . أشارت بعض الدراسات إلى أن مستقبل MC1R له دور مهم في عملية التصبغ للجلد في الإنسان كونه يَأثر على الأنزيمات المسؤولة عن عملية التصبغ كما يترافق مع تأثير بعض العوامل الأخرى مثل التعرض للأشعة فوق البنفسجية (Balthasar, 2005).

3.2. أسباب البهاق وأماكن حدوث المرض Vitiligo causes and mechanisms of disease occurrence

البهاق مرض جلدي مكتسب يتميز بظهور بقع بيضاء اللون مختلفة الأحجام والأشكال ويمكن أن تشمل كلا الجنسين وتظهر في أي عمر وينتشر مرض البهاق لدى 1-2% من سكان العالم وتعد النساء عادة أكثر تأثراً من الرجال وهذا قد يعود إلى أسباب فسيولوجية ، في حين أشارت بعض دراسات أخرى إلى أن هذا المرض لا يتأثر بنوع الجنس (Alikhan *et al.*, 2011) . أظهرت الدراسات أن هناك عدة عوامل وأسباب تترافق مع هذا المرض أهمها العوامل الوراثية ، إذ تشتمل على تأثر بعض الجينات الطافرة السائدة (Dominant) التي تزيد من التعبير الجيني لبعض المركبات المناعية التي يمكن ان تهاجم الخلايا الميلانية (Nath *et al.*, 1994) . البهاق مرض مناعي ذاتي وقد أشارت بعض الدراسات إلى وجود علاقة توافقية بين الأصابة ببعض الأمراض المناعية الأخرى مثل التهاب الغدة الدرقية وداء السكري وداء الثعلبة وبين مرض البهاق فقد يظهر مرض البهاق لدى نفس الأشخاص الحاملين لهذه الأمراض ، كما بينت بعض الدراسات عن وجود علاقة مع بعض الجينات الطافرة مثل الطفرات التي تحصل في جينات مستضدات التوافق النسيجي لخلايا الدم البيضاء للإنسان (Human *HLA*-genes) (leukocytes antigen-genes) والتي تشفر إلى العوامل المناعية ذات العلاقة بهذا المرض وأمراض مناعية أخرى (Elgandy *et al.*, 2016).

أما بالنسبة لتاريخ العائلة ، فيعد من المؤشرات المهمة التي يعتمد عليها في تفسير أسباب ظهور المرض إذ انه قد يكون له علاقة بتاريخ العائلة التي ينتمي لها ذلك الشخص من حيث وجود آخرين من نفس العائلة مصابين بمرض البهاق أو مصابين بأمراض مناعية أخرى ، وتتنوع هذه العوامل من مكان إلى آخر في العالم (Gauthier *et al.*, 2003). أما بالنسبة للعوامل التي تستحث هذا المرض فلم يتم تحديدها بدقة لكن يمكن الاستفادة من خلال تحديد تلك التفاصيل للشخص المصاب بهذا المرض مثل تأريخ المرض، ومدة التعرض للأجهادات وكذلك نوع المواد الكيميائية المستهلكة إذ تشير أغلب الأبحاث إلى ان غالبية الأجهادات التأكسدية التي تحدث في البهاق ناتجة عن الأنخفاض في مستويات انزيم الكاتاليز (Catalase) والتي يرافقها ارتفاع في مستويات انزيم SOD-1 وهذا بدوره يؤدي إلى زيادة تراكم

الجزور الحرة في الخلايا الميلانية وتدميرها ، كما ان هناك العديد من العوامل التي تساهم في حدوث الاجهاد التأكسدي وتؤدي الى زيادة تراكم بيروكسيد الهيدروجين في البشرة وتؤدي الى زيادة تحطم الخلايا الصبغية وتوجد هناك تقنيات لقياس مستوياته في البشرة داخل الجسم *invivo* اذ ان فهم هذه العوامل قد تساهم في إيجاد علاج فعال لمرض البهاق (Schallreuter *et al.*, 2002).

أظهرت دراسات أخرى ان 10-76% من مرضى البهاق سبق وأن تعرضوا إلى بعض العوامل البيئية مثل الإجهاد والتعرض الشمسي الشديد أو التعرض لبعض المبيدات الحشرية والتي قد تكون بمثابة عوامل محفزة لهذا المرض من خلال زيادة حدوث الطفرات ومنها الطفرات الحاصلة في الجينات المسؤولة عن تنظيم عملية التصبغ في الجلد (Slominski *et al.*, 1989; Denat *et al.*, 2014). اما ما يخص دور المناعة كأحد اسباب الأمراض فقد اشارت الدراسات الى ان مرض البهاق يتميز طبييا بظهور بقع فاقدة للتصبغ في مناطق معينة من الجسم مثل الوجه والظهر واليدين فضلا عن مناطق اخرى ، كما يسبب ظهور شيب الشعر في نهاية المطاف او ظهور الشيب الموضعي بما في ذلك الحاجبين والرموش وشعر العانة ، اما حدوث الحكة أو الالتهاب فهو نادراً ما يحدث (Barona ,1995). غالبا ما تترافق هذه التغيرات مع تبدلات نسيجية ، اذ تشير نتائج الفحص المجهرى الإلكتروني الى حدوث انحطاط في الخلايا الكيراتينية والخلايا الصباغية وخلايا لانكرهانز من طبقة الغشاء القاعدي ويرافق ذلك حدوث التهابات مع ارتشاح الخلايا الوحيدة والخلايا الليمفاوية (Cytotoxic T cells) والخلايا البلعمية من الدم الى الأدمة في الجلد أن هذا التسلل للخلايا البيضاء ومنها الخلايا اللمفاوية والتي تتكون بصورة أساسية من اللمفاويات التائية السمية من نوع T-Cells CD8 (Abdel-Nasser,1994). ونظراً لتعدد أسباب مرض البهاق فقد أفتحت الدراسات الباثولوجية عدة نظريات في محاولة لشرح أسباب فقدان عملية التصبغ الذي يحدث في مرض البهاق

وتشمل هذه النظريات :

أولاً: النظرية الوراثية Genetic theory

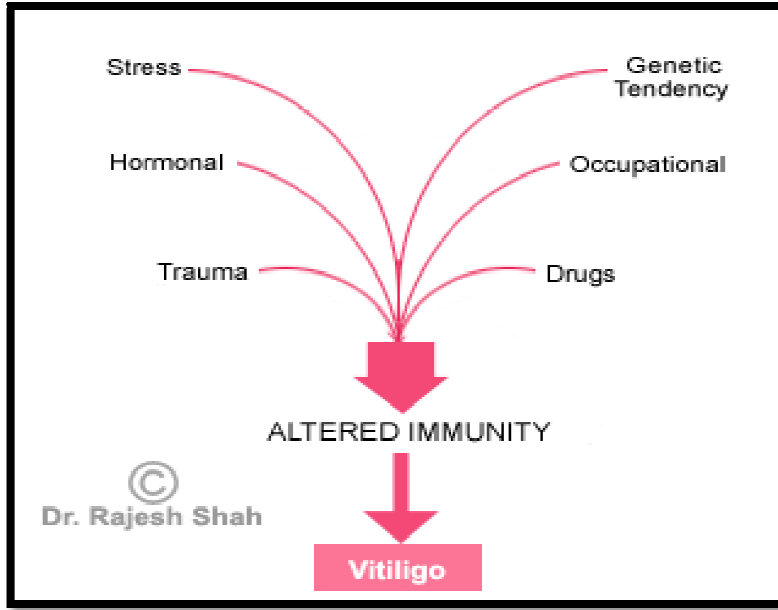
أشار Nath وآخرون 1994 الى وجود جين واحد يوجد في بعض الأفراد يسبب الإصابة بمرض البهاق وطبيعة هذا الجين على الأرجح هو المسؤول عن التعقيد السريري للمرض . أفترض Majumder وآخرون 1993 اشتراك ثلاثة جينات مختلفة على الأقل في ظهور مرض البهاق ولذلك يعد اضطراب

متعدد الجينات (Polygenic disorder) وأشارت هذه الدراسة الى أن مزارع الخلايا الصبغية الماخوذة من المرضى الذين يعانون من البهاق النشط تكشف عن انخفاض التعبير الجيني لعامل الخلية الجذعية (Stem cell factor) SCF ، والتي تعد المستقبلات الأساسية في عملية تمايز الخلايا الصبغية والتصبغ لاحقاً. ذكر Chen و Jimbow (1994) في دراسة على مزارع الخلايا الصبغية الماخوذة من الأمراض الجلدية ان هناك زيادة في مستويات البروتين من نوع البروتين المرتبط بأنزيم التايروزينيز TRP-1 (Tyrosinase related protein-1) . كما ان هناك دور للاستعداد الوراثي أيضا في تطور هذا المرض ، فقد أثبتت التجارب أن بعض المواد الكيميائية البيئية مثل مشتقات الفينول يمكن أن تشكل مواد سامة لخلايا الميلانين، في التجارب المختبرية أو داخل الجسم *in vivo* ، ويعد هيدروكينون (Hydroquinone) هو أحد هذه المكونات فقد كان يستخدم في العلاج الموضعي لقرح التصبغ ولكن أثبت أنه يكون ذات تأثير سام للأفراد من ذوي الاستعداد الوراثي (Norris *et al.*, 1998).

ثانياً: نظرية المناعة الذاتية Autoimmune theory

أقترحت عدة دراسات تمت على هذا المرض بأن البهاق هو أحد الأمراض المناعية الذاتية التي تستهدف الخلايا الصبغية (Pigmentary cells) وشملت هذه النتائج وجود علاقة بين مرض البهاق وبين عدد من الأمراض الاخرى مثل التهاب الغدة الدرقية، فقر الدم الخبيث ومرض السكري وتصلب الجلد ومرض اديسون وداء الثعلبية والوهن العضلي الوبيل (Ortonne and Bose, 1996). كون الإصابة بهذه الامراض تطور اجسام مضادة ذاتية (Auto antibodies) من الممكن ان تهاجم الخلايا الميلانية وتحطيمها بمسارات القتل المناعي اذ أن المرضى الذين يعانون من البهاق لديهم أجسام مضادة ضد الغدة الدرقية، الغدة الكظرية والخلايا الجدارية تبعاً لذلك فقد أعدت بعض العلاجات المناعية لمرض البهاق مثل الكوابح المناعية immunosuppressors ان استخدام تلك العلاجات حقيقة تشير إلى أن فوائد هذه العلاجات يمكن أن يؤدي إلى تثبيط التفاعلات المناعية ضد الخلايا الصبغية وتحجيم فعاليتها . إن الأجسام المضادة الموجودة لدى مرضى البهاق هي موجودة أيضاً في الأشخاص الذين يعانون سرطان الجلد مما يدل على أن البهاق هو أحد أمراض المناعة الذاتية من خلال وجود الأجسام المضادة لخلايا الميلانين لدى هؤلاء المرضى (Bystryn and Naughton, 1985). وقد برهنت هذه الأجسام المضادة في البداية من قبل تقنية الترسيب المناعي وكذلك بواسطة التآلق المناعي غير المباشر والتي تم التأكيد وجودها من خلال تقنيات أخرى، بما في ذلك التقنية التي تسمى التحلل الخلوي لخلايا الميلانين والذي

يتوسطه نظام المتمم (Complement-mediated cytotoxic of human melanocytes) ودور الأجسام المضادة في تحليل خلايا الميلانين (Harning *et al.*, 1991). يلخص الشكل اللاحق الأسباب المؤدية الى مرض البهاق حسب المصدر (Sehgal, 2007).



أسباب مرض البهاق (Sehgal, 2007)

4.2. الميزات المظهرية لمرض البهاق Morphologic features of vitiligo

وصف Sehgal (2007) الهيئة المظهرية للبهاق من خلال اتخاذه الأشكال التالية:

1. البهاق ثلاثي الألوان Trichrome vitiligo

يستدل عليه من خلال وجود منطقة ضيقة أو واسعة تتوسط بين منطقة لطخات البهاق والبشرة الطبيعية المحيطة بالمنطقة المصطبغة ، إذ أثبتت الخصائص السريرية والتشريحية - المرضية على ان مرض البهاق مرض متغاير وغير مستقر.

2. البهاق رباعي اللون Quadric- chrom vitiligo

تظهر بقع البهاق رباعية اللون ويمكن رؤيتها بشكل واضح في البشرة الغامقة اذ يلاحظ فرط التصبغ في الحافات للطخات البهاق ويعد السمة البارزة لهذا النوع ويدل على مرض عودة التصبغ.

3. البهاق خماسي اللون Penta chrome vitiligo

هذا النوع نادر التغيرات يبدو متسلسلا في اللون الأبيض والبني والأزرق الرمادي في منطقة فرط التصبغ والجلد الطبيعي . ان العرق الاسود هم الأفراد الاكثر استعداداً للاصابة بهذا النوع من الاضطراب.

4. البهاق الازرق Blue vitiligo

تظهر بقع البهاق الأزرق عادة في المنطقة التي تنتج من ألتهاب الخاص بفرط التصبغ وتتطور هذه البقع بشكل واسع النطاق كنتيجة لتطور المرض بعد فرط التصبغ الناتج من أمراض النقص المناعي المكتسب.

5. البهاق الالتهابي Inflammatory vitiligo

ان نشوء هذه التغيرات قد تكشف عن حدوث ألتهابات في لطخات البهاق مع حكة متكررة وتحسس هذه التغيرات ممكن أن تتسبب هذه التغيرات عن استخدام بعض العلاجات.

5.2. تصنيف مرض البهاق Classification of vitiligo

تم التوصل الى أنه ليس لكل أنواع مرض البهاق نفس الهيئة أو نفس الخصائص، فقد تم اقتراح نظم تصنيف كثيرة على مدى السنوات الخمسين الماضية، وعليه يمكن تقسيم مرض البهاق إلى فئتين أساسيتين وهما العام (Generalized) والمتقطع (Segmental) ، ويتميز البهاق المتقطع بظهوره في وقت مبكر وبكونه سريع التقدم ومن ثم توقفه بعد سنة أو سنتين من الأنتشار وينتشر هذا المرض بشكل

خطي ، أما البهاق العام فيكون منتشر بكافة أنحاء الجسم (Bellet and Prose, 2005). وفي تصنيف آخر لمرض البهاق ، قسم الى المتقطع (Segmental) والعام (Generalized)، والموضعي (Focale) والكلي أو الشامل (Universal) (Behl *et al.*, 2003). صنف الباحث Lerner (1959) مرض البهاق الى : المتقطع (Segmental) وفيه تنتشر اللطخات بشكل مستقيم أو خطي في منطقة اليد أو الأرجل ، والعام (Generalized) وفيه تنتشر لطخات فقدان التصبغ بشكل واسع في منطقة الظهر واخيراً النوع الجزئي (Partial) او الموضعي (Focal) أذ تظهر اللطخات بشكل موضعي وقد تبدوا متداخلة مع البشرة الطبيعية . فيما قسم Sehgal (2007) مرض البهاق الى التقسيم التالي وحسب الأشكال:

1. البهاق المتقطع (Segmental Vitiligo zosteriform) : تنتشر اللطخات على طول الجسم او بشكل خطي .



(Sehgal, 2007) Segmental Vitiligo

2. البهاق غير المتقطع (Non segmental) ويشمل:

أ. البهاق البقعي (Vitiligo areate): يتراوح عدد اللطخات الظاهرة على الجسم تتراوح بين 1-2 وتقسم الى (Localized و Partial او Focale).

ب. بهاق الوجه والأطراف (Vitiligo acrofacialis): تنتشر اللطخات في الوجه والشفاه واليد والرجل.

ج. البهاق المنتشر (Vitiligo vulgaris) : يقسم الى generalized و Universal وينتشر في كافة أنحاء الجسم .

D. البهاق المخاطي (Vitiligo mucosal): يعد هذا النوع خاص اذ ينتشر في الأغشية المخاطية فقط. والأشكال التالية توضح أنواع البهاق تبعاً الى تقسيم كل من Sehgal و Virendra (2007)



البهاق الموضعي Focal vitiligo



البهاق الغير متقطع (العام) Non segmental vitiligo (General) البهاق الكلي Universal Vitiligo

6.2. تشخيص مرض البهاق Diagnosis of vitiligo

عادة ما يتم تشخيص مرض البهاق سريريا وغالبا ماتستخدم تقنية مصباح وود (Wood's lamp) في تحديد مدى توسع وفعالية مرض البهاق فضلا عن رصد الاستجابة للعلاج وكذلك مدى توسع القرع لهذا المرض بمرور الوقت (Gawkrodger *et al.*, 2008).

7.2. الأنتشار Prevalence

سجلت أعلى إصابة لمرض البهاق في الهند ثم المكسيك تليها اليابان وقد يعزى سبب ارتفاع نسبة الإصابة بمرض البهاق في هذه المناطق إلى نوعية التغذية ونوعية المواد الكيميائية التي يتعرض لها السكان مثل بعض المواد الكحولية كالفينولات اذ تؤدي الى ازالة التصبغ من الجلد (Behl, 1971). يصاب كل من البالغين والاطفال بهذا المرض كما يصاب كلا الجنسين بصورة متساوية لكن أظهرت بعض الدراسات الى كون النساء اكثر نسبة في الإصابة بهذا المرض خاصة لدى الفتيات مقارنة مع الذكور وهذا يعود الى أسباب هرمونية (Sabek *et al.*, 2015). ينتشر مرض البهاق في كافة أنحاء العالم وتبلغ نسبة أنتشار هذا المرض على مستوى العالم بنسبة 1-2% (Alkhateeb *et al.*, 2003). سجلت غالبية الحالات المصابة بمرض البهاق خلال المدة الفعالة من النمو اذ ان نصف الأشخاص المصابين بهذا المرض هم مادون سن 20 سنة اما النسبة المتبقية من الأشخاص المصابين هم القريبين من عمر 30 سنة او ما بين 70-80 سنة (Behl *et al.*, 2003).

وفي دراسة اجريت في العراق عن اسباب وانتشار هذا المرض فقد بينت هذه الدراسة على ان احد اسباب انتشار مرض البهاق هو كثرة الإصابة بفايروس (Herpes Simplex Labialis) وهو فايروس يصيب منطقة الشفة وحول الفم ويترك ندبة وفي بعض الأشخاص المصابين بهذا الفيروس يحدث ازالة للتصبغ في منطقة الأصابة لذا عد هذا الفيروس احد الأسباب المؤدية الى التطور وظهور مرض البهاق في منطقة الوجه (Elethawi, 2013)

8.2. البهاق والمناعة الذاتية Vitiligo and autoimmunity

تتميز تقرحات البهاق في الجلد بأرتشاح العديد من أنواع الخلايا المناعية وخاصة التائية السامة (Cytotoxic T cells) والخلايا التائية المساعدة (T Helper) والخلايا البلعمية (Macrophages) ان هذا الأرتشاح هو التفاعل المناعي الأبرز في المناطق المحيطة للجلد قبل ظهور الهيئة المظهرية الخارجية للبهاق بشكل واضح على الجلد تظهر الخلايا للمفاوية في المناطق المتقرحة في مرحلة مبكرة من الإصابة اذ تكون الخلايا للمفاوية فقط بشكل غير متخصص في البشرة والأدمة مما يشير إلى فعاليتها في تطور المرض وظهور البقع في الاماكن المتقرحة للبهاق (Aslanian *et al.*, 2010).

كما أظهرت الدراسات ان مستويات الأجسام المضادة مرتفعة ضد مستضدات الخلايا الصبغية في عدد كبير من مرضى البهاق كما أظهرت زيادة تردد او تكرار مرض البهاق مع اضطرابات مناعة ذاتية أخرى مثل اضطراب الغدة الدرقية وفقر الدم الخبيث ومرض أديسون والذئبة الحمراء الجهازية وغيرها من الامراض المناعية مما يوحي بوجود ارتباط جيني مشترك بين مرض البهاق وبقية الأمراض المناعية الذاتية الأخرى (Alkhateeb *et al.*, 2003). علاوة على ذلك فقد أقرحت Michelsen (2010) الآليات الرئيسية التي تستند إلى فعالية ودور الخلايا التائية و الأضداد وهكذا فان ظهور مرض البهاق هو نتيجة لفعالية الآليات المناعية الخلطية والخلوية التي تشارك في تدمير الخلايا الصبغية في الجلد .

1.8.2. البهاق والاستجابة المناعية الخلطية Vitiligo and humeral immune response

تم الكشف عن الاستجابة المناعية الخلطية وفعالية الأجسام المضادة ضد المستضدات للخلايا الصبغية في المصل لدى مرضى البهاق وأقرحت دراسة حديثة أيضا أن 75% من المرضى الذين يعانون من البهاق ينتجون كميات من الأجسام المضادة (Antimelanocyte) في جهاز الدوران (Laddha *et al.*, 2013). ان إنزيم التيروسينيز Tyrosinase ينتج من قبل الخلايا الميلانية ويعد المستضد الرئيس الذي يدرك من قبل هذه الأجسام المضادة (Kemp *et al.*, 2011). كشفت الدراسات المختبرية أن الأجسام المضادة لمرض البهاق قادرة على تدمير الخلايا الصبغية اما عن طريق الآلية المعتمدة على المتمم (Complement-mediated damage) وآلية القتل الخلوي المعتمد على الأجسام المضادة (Antibody dependent cellular cytotoxicity) (ADCC) مع فعالية الخلايا البلعمية

(Macrophage) لتدمير الخلايا البلعمية المجهدة (Trcka *et al.*, 2002). لذلك فإن فقدان الأنتقائي للخلايا الصبغية قد يكون ناجم عن تفاعل الأجسام المضادة ضد للمستضدات المعبرة على أسطح الخلايا الصبغية، او قد تنجم عن الاستعداد الوراثي والذي يزيد من مستويات ونشاط المناعة على مستوى الخلية التائية والخلايا البائية والذي بدوره يزيد من نشاط تلك الخلايا مع زيادة أجسامها المضادة (Kemp *et al.*, 2001).

2.8.2. البهاق والاستجابة المناعية الخلوية Vitis and cellular immune disease

ان المستويات العالية للخلايا التائية المضادة للخلايا الصبغية الموجودة في جهاز الدوران المحيطي للمرضى الذين يعانون من البهاق وكذلك أرتشاحها الى مناطق التقرحات الخاصة بهذا المرض في الجلد وفقدان الخلايا الصبغية في تلك المواقع تشير إلى عد المناعة الذاتية الخلوية أحد أسباب حدوث الأمراض للبهاق (Pichler *et al.*, 2009) وقد أثبتت الدراسات ان للحالات النشطة للبهاق مستويات أعلى من الخلايا التائية السامة (Cytotoxic T cells) مقارنة مع الخلايا المناعية المنظمة (Regulatory T cells) (Le Poole *et al.*, 2008). كما أثبتت الدراسات المناعية النسيجية والمصلية ان لدى مرضى البهاق من نوع (Generalized vitiligo) أرتشاح كبير في اعداد الخلايا التائية السامة من نوع (T- CD8+cells) والتي تحفز بفعل نشاط الخلايا التائية المساعدة في الجلد (T- Helper cells) (Lili, 2012). أظهرت الدراسات المختبرية زيادة في إنتاج السايبتوكينات الألتهايبية pro-inflammatory cytokines من نوع الحركي الخلوي الأول IL-1 السادس IL-6 و TNF- α لمرضى البهاق والتي سوف تؤثر على استجابة وهجرة الخلايا المناعية الى الأنسجة المحيطية وتنشيطها (Denman *et al.*, 2008). هناك أختلال في التوازن في معظم المرضى الذين يعانون من البهاق بين كبح الخلايا السامة cytotoxic/suppressor وتحفيز الخلايا المساعد helper/inducer T cells في الدم المحيطي (Nigam *et al.*, 2011)، علاوة على ذلك هناك أرتفاع تدريجي في نسبة الخلايا التائية من نوع CD4+/CD8 التي تعمل على تحطيم الحماية المحيطية (Peripheral

(tolerance) في الجلد كما وقد بينت دراسات أخرى أن عدد الخلايا التائية المحيطة التنظيمية (Peripheral T regulatory cells) ينخفض تدريجياً مع البهاق مما يشير إلى وجود ضعف في قدرتها على التمايز والتفعيل مما يقلل آلية كبح فعالية الجهاز المناعي ضد الخلايا الميلانية (Lili, 2012). في الآونة الأخيرة اكتسب دور الخلايا المساعدة من نوع Th17 المزيد من الأهتمام في دورها بتطور مرض البهاق كما أظهرت دراسات التحليل المناعي ان خلايا Th17 لها القابلية على الأرتشاح بين خلايا الجلد لمرضى البهاق بالإضافة إلى خلايا T CD8+ وعلاوة على ذلك، توفر هذه الدراسات دليلاً على أرتشاح السايوتوكينات الخلوية IL-17 α ، IL-1 β ، IL-2 ، IL-6 ، TNF و مما يبرز دورها في مهاجمة وتحطيم الخلايا الميلانية ومما يزيد من دعم تلك الدراسات هو وجود زيادة في مستويات الحركي الخلوي نوع-IL 17 في مصل الدم وفي التقرحات الجلدية للمناطق المصابة بالمرض كون هذا النوع من السايوتوكينات تزيد من الفعالية الألتهايبية في المناطق المصابة بالبهاق في الجلد (Bassiouny and Shaker, 2011)

3.8.2. السايوتوكينات وموت الخلايا المبرمج Cytokines and cells and Appoptosis

يعرف الموت المبرمج على انه عملية محددة المعالم تتضمن سلسلة من الخطوات المنظمة التي تؤدي الى التدمير الذاتي والموضعي للخلايا (Laddha *et al.*, 2013) وعلى الرغم من عدم تحديد السبب الرئيسي لفقدان الخلايا الصبغية حتى الآن بشكل قطعي ومع ذلك فقد أقتراح Van den وآخرون 2000 ان الموت المبرمج للخلايا الميلانية هو المسبب لمرض البهاق. تعمل السيتوكينات مثل IL-1 و TNF- α كمثبطات للأفراز الجانبي (Paracrine inhibitors) للخلايا الصبغية ويمكن الشروع بحدوث الموت المبرمج للخلايا (Huang *et al.*, 2002). وقد أظهرت الدراسات الأخيرة حدوث زيادة في مستويات TNF- α في المصل والجلد في المرضى الذين يعانون من البهاق مما يدل على زيادة الموت المبرمج للخلايا الميلانية في وقت مبكر من أنتاج وتمايز الخلايا الصبغية في الجلد لمرضى البهاق (Laddha *et al.*, 2012). بالإضافة إلى ذلك ان TNF- α ينشط عمل IL-1 وهذا بدوره يعزز التمايز الخلوي للخلايا البائية وزيادة نشاطها ومن ثم زيادة أنتاج الغلوبولينات المناعية وبالتالي ترتفع مستوياتها في الوقت نفسه يعمل TNF- α على نضوج الخلايا الجذعية وبالتالي ينتج زيادة في تطوير المناعة الذاتية كل هذه المسارات تزيد من الموت المبرمج لبعض الخلايا بما فيها الخلايا الصبغية نتيجة لظهور

مستضدات الأجهاد على تلك الخلايا مما يحفز مسار الموت المبرمج (Pichler *et al.*, 2009). أوضح Kotobuki وجماعته (2012) أن تحفيز إنتاج IL-17 α بشكل كبير ينشط ارتفاع مستويات IL-1 β ، IL-6 و TNF- α في الخلايا الكيراتينية والخلايا الليفية الاروماتية (Broblasts) والتي يمكن أن تزيد من الموت الخلوي المبرمج للخلايا الصبغية . ينتج الساييتوكين IL-6 و IL-13 من قبل الخلايا التائية من نوع CD8+ الموجودة في الحافات المحيطة بالثقراحات الخاصة بمرض الربهاق والتي قد تحفز الموت الخلوي المبرمج ايضاً للخلايا الصبغية (Wu *et al.*, 2013) . من الأنترلوكينات المهمة وذات العلاقة بمرض الربهاق هي عامل التنخر الورمي نوع الفا TNF- α والحركي الخلوي الثاني IL-2:

أولاً: عامل التنخر الورمي نوع الفا TNF- α

يحدث فقدان التصبغ لمرض الربهاق عن طريق تدمير الخلايا الصبغية وقد وضعت فرضيات مختلفة لتفسير سبب فقدان التصبغ فهناك أدلة متزايدة على أن الساييتوكينات مهمة في تقدم المرض من خلال دورها السلبي تجاه الجلد لدى مرضى الربهاق ، تفرز الخلايا الكيراتينية الجلدية بعض الساييتوكينات ومنها عامل التنخر الورمي TNF- α والذي يعمل كأفراز جانبي (Paracrine inhibition) للخلايا الميلانية في الجلد (Kroll *et al.*, 2005) وقد اقترح دور تلك الساييتوكينات في حدوث إمرضية مرض الربهاق من خلال زيادة الموت المبرمج للخلايا الميلانية من قبل الخلايا الكيراتينية في الجلد اذ يوجد هناك نوعين من الساييتوكينات المثبطة لنمو الخلايا الميلانية أحدها مثبط ضعيف لنمو الخلايا الصبغية مثل عامل تحفيز المستعمرات GM-CSF (Colony-stimulating factor) والخلايا البلعية – الخلايا اللمفاوية الحبيبية (Granulocyte macrophage) والبطانة الداخلية (Endothelins)، في حين تعتبر الساييتوكينات من نوع TNF- α ، IL-1 α ، IL-6 مثبطات قوية لنمو الخلايا الصبغية وتمايزها (Moretti *et al.*, 2002).

بينت الدراسات تأثير الساييتوكينات على الجلد وآلية فقدان التصبغ ووضعت فرضيتين لتفسير التصبغ في الجلد وذلك عن طريق فعالية عامل التنخر الورمي TNF- α على الخلايا الميلانية أول تأثير من خلال ما يقوم به TNF- α بتحفيز الحركي الخلوي الأول نوع الفا IL-1 α وهذا بدوره يرفع عملية نضج وتمايز الخلايا البائية وتعمل الأخيرة على أنتاج وإطلاق الغلوبولينات المناعية الى المصل والجلد

في المناطق المصابة أما المسار الآخر من التأثير من خلال تحفيز مستقبلات موجودة على أسطح الخلايا الميلانية وتستجيب هذه بدورها لهذا التحفيز فتعمل على ربط الخلايا للمفاوية بالخلايا الميلانية كما ان وجود نفس المستقبلات يحفز الاجسام المضادة على زيادة الأنطلاق من الخلايا البائية والارتباط مع تلك المستقبلات على أسطح الخلايا الميلانية وبالتالي تتحطم تلك الخلايا وتسبب ظهور مرض البهاق وفقدان التصبغ من الجلد بتقدم العمر وهذا المسار يكون بتحفيز الأجهاد وهذا يدل على الترابط بين الأجهاد وبين المناعة الذاتية والتي تتوسط فقدان الصبغة بتقدم العمر (Jain et al., 2011).

ثانياً: الحركي الخلوي الثاني IL-2

الجهاز المناعي هو الجهاز الدفاعي ضد جميع المكونات التي تُسبب الأصابات والأمراض سواء كانت داخلية او خارجية فهو قادر على أدراك عدد كبير من تلك المستضدات ، يضم الجهاز المناعي مكونات مناعية مختلفة وتعمل هذه المكونات على أدراك المستضدات ومنها مستضدات الأجهاد التي تظهر على الخلايا الميلانية والتخلص منها واحد من تلك المكونات البروتينية الدائبة هي عبارة عن مركبات لمفاوية والتي أُطلق عليها عام 1965 بأسم الحركيات للمفاوية (Lymphokines) بعد ذلك جاء Kasakura and Lowenstein ليثبتا أنطلاق عوامل دائبة من المزارع للمفاوية والتي أُطلق عليها أسم الحركي الخلوي الثاني لغاية عام 1976 اذ تم إعادة تسميتها بتسمية أخرى اذ اطلق عليها أسم T cell growth وذلك لقدرتها المستمرة على تحفيز ونضج الخلايا التائية ولحين عام 1979 اعيد اطلاق أسم الحركي الخلوي الثاني عليها IL-2 وبعد عدة سنوات تم اكتشاف ان هذه المركبات تمتلك مستقبلات تعد جداً مهمة في النظام المناعي (Kasakura and Lowenstein ,1965).

يُنتج الحركي الخلوي الثاني IL-2 بصورة أساسية من الخلايا التائية المحفزة بواسطة المستضد (Antigen-activated T-cells) ويحفز على الانتشار والتميز وبقاء الخلايا التائية الناضجة على قيد الحياة في الجسم وكذلك حل او إيقاف النشاط الخلوي للخلايا الفاتلة الطبيعية NK cells ضمن آليات الدفاع المناعي الغير نوعي (Innate immune defense) في جسم الإنسان (Nelson and

(Willerford,1998) . يستخدم الحركي الخلوي الثاني IL-2 كعلاج مناعي في أنواع معينة من الأمراض التكاثرية للمفاوية (Lymphoproliferative diseases) وبعض انواع السرطانات، ويمكن أن يشترك IL-2 بوجه الخصوص في منع رفض زرع الأعضاء (Organ transplant rejection) (Theze and Alzari,1996) ، كما انه يحد من سمية الجرعة العالية ويقلل من فعاليتها من الناحية الطبية وتتوسط هذه الفعالية للحركي الخلوي الثاني IL-2 وجود تراكيب مختلفة من مستقبلات IL-2 مما يوحي بأن البنية هندسية مبنية على أساس وجود مستقبلات مختلفة وأنتقائية في التحفيز الامر الذي يمكن أن يكون له فائدة سريرية (Shanafelt, 2000) .

لوحظ ان وجود زيادة في بعض السيتوكينات يمكن أن تؤثر على الخلايا الصبغية وبقاء تلك الخلايا على قيد الحياة فقد تبين ان هناك العديد من السايوتوكينات ترتفع في مناطق التقرحات الجلدية لمرضى البهاق بما في ذلك عامل الخلايا الجذعية (Stem cells factor) والخلايا البطانية (Endothelin) (Moretti et al., 2002) . كما لوحظ ان بعض الأنتروكينات ترتفع في مناطق التقرح والمصل لمرضى البهاق بشكل سلبي وله تأثير ضار على تقدم المرض ومن تلك الأنتروكينات هي الحركي الخلوي الثاني IL-2 كما لوحظ ارتفاع في مستويات مستقبلاته ويمكن استخدامه IL-2 كمراقب لنشاط الجهاز المناعي داخل الجسم الحي وقد عزى ارتباط الارتفاع في تراكيز IL-2 مع زيادة نشاط الخلايا المناعة التائية T cells وهذا الارتفاع يمكن أن يسبب بعض الأمراض المناعية الذاتية اذ لوحظ ارتفاع مستويات تلك الخلايا وزيادة نشاطها بشكل ملحوظ لدى مرضى البهاق مقارنة مع مجموعة السيطرة مشيراً إلى أن تنشيط خلايا التائية بشكل مفرط T cells هو عامل خطورة في التسبب بمرض البهاق (Klarquist et al., 2010) . كما برهنت العديد من الدراسات الألتهايبية والنسيجية والمصلية زيادة مستويات الحركي الخلوي الثاني IL-2 الذائب في المصل لدى الأشخاص المصابين بمرض البهاق مقارنة مع مجموعة السيطرة (Van den Boorn et al., 2011) . كما لاحظت الدراسات ارتفاع مستوياته مع زيادة التقدم في عمر المريض مع قدم الإصابة بالمرض اذ لاحظ ان مستويات تزداد لدى كبار السن بشكل ملحوظ وبين Tue وآخرون (1999) على ان هذه الزيادة لها دور كبير في تحفيز الخلايا التائية T-cells والتي تعد كمكون مناعي مهم ولها دور اهم في تقدم الإصابة بمرض البهاق من خلال زيادة تحطيم الخلايا الميلانية .

9.2. البهاق والأجهاد التأكسدي Vitiligo and oxidantion stress

يتعرض الجلد الى العديد من أنواع الأجهاد من المحيط الخارجي مثل المبيدات والسموم المختلفة والأشعاعات التي يتعرض لها الجسم ، فيعد الجلد خط الدفاع الأول للجسم لمواجهة ظروف الأجهاد المختلفة اذ يعمل الأجهاد الخارجي على تحفيز الجهاز العصبي والمناعي عن طريق مستقبلات عصبية منتشرة على سطح الجسم تعمل هذه المستقبلات على نقل المؤثرات والأجهادات كمستجيبيات عصبية تنقل الى الدماغ ومن تلك المستقبلات هي (Corticotropin releasing hormone) ثم يتم الرد على تلك الأجهادات عن طريق (Hypothalamic-pituitary adrenalien) وتنتهي بأستجابة الغدة الكظرية وأطلاقاً هرمونات الأجهاد ومنها الكورتيزول لحفظ التوازن الداخلي للخلايا الميلانية وكبح الأجهاد (Slominiki *et al.*, 2007).

1.9.2. مضاد الأكسدة من نوع SOD-1

السيروتونين (hydroxytryptamine, 5-HT) هو مركب بروتيني يبنى من البادرة (L tryptophan) في أماكن مختلفة من الجسم وله تأثير كبير على الخلايا الميلانية اذ وجد انه يمتلك مستقبلات تقع على الخلايا الميلانية لأنه يمتلك وظائف عديدة في الجسم كونه يعمل كمضاد للموت المبرمج وكذلك يعد عامل نمو للخلايا الميلانية (Oh *et al.*, 2016). على الرغم من عدم تحديد المسبب الرئيس لمرض البهاق بشكل دقيق لكن أصبح من الواضح تماماً في الآونة الأخيرة أنه مرض معقد يعود لمجموعة من الأسباب الوراثية، المناعية، العصبية وآليات التدمير ذاتية التفاعل المتمثلة بالجذور الحرة (Free radicals) بأنواعها المختلفة التي تتولد من آليات نقل الطاقة وعمليات اليض والقتل المايكروبي داخل الخلايا والتي تلعب دوراً هاماً في ظهور المرض وتقدمه (Hann and Nordlund, 2000; Ortonne *et al.*, 2003). وفقاً للفرضية السمية الذاتية (Autocytotoxic) او ما تسمى بفرضية الأجهاد التأكسدي والتي تقترح ان الأكسدة هي التي تسبب حدوث المرض من خلال زيادة تراكم العامل المؤكسد بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في الخلايا الصبغية للبشرة من المرضى الذين يعانون من مرض البهاق (Maresca *et al.*, 1997). وأظهرت الدراسات الحديثة على مساهمة عوامل الأكسدة في الفسيولوجيا المرضية لمرض البهاق اذ لوحظ تبدلات في نمط مضادات الأكسدة، مع حدوث ارتفاع معنوي كبير في مستويات إنزيم SOD-1 (Superoxide Dismutase) في الجلد والكريات الحمراء

والخلايا وحيدة النواة في الدم والمصل لمرضى الربو (Yildirim *et al.*, 2004; Hazneci *et al.*, 2005).

ان التغييرات التي تحصل خلال العمر تساهم مع العوامل المحيطة سواء مايتولد بصورة طبيعية داخل الجسم او نتيجة الاصابة بالأمراض والأصابات الخارجية على تزايد مستوى الأجهاد على الجسم (Harman, 1993) وقد بينت نظرية الأجهاد التي تم التوصل اليها الى وجود علاقة بين العمر ومستويات الأجهاد (Sohal *et al.*, 1993). لاحظت الدراسات النسجية والمصلية تزايد إنتاج المواد المؤكسدة في الجسم بزيادة العمر والناجمة مع ضعف فعاليات مضادات الأكسدة في مقاومة تلك العوامل المؤكسدة اذ تتسبب في حدوث ضرر للعديد من الخلايا والعضيات الخلوية والمركبات الخارج خلوية (Semsei *et al.*, 1991) بالمقابل هناك العديد من الإنزيمات التي تساهم في إزالة تلك المواد المؤكسدة السامة وتحقيق التوازن الطبيعي للجسم ومن تلك الإنزيمات هي إنزيم SOD-1 وإنزيم الكاتاليز CAT اذ لوحظ استمرار ارتفاع مستويات إنزيم SOD-1 مع العمر للأشخاص المصابين بمرض الربو نتيجة لاستمرار إنتاج تلك المركبات السامة في المناطق المصابة من الجسم يرافقتها انخفاض في مستويات إنزيم CAT (Fawzy and Rashed, 2012). اذ أظهرت الدراسات انخفاضاً كبيراً في نشاط إنزيم الكاتاليز CAT في الخلايا الصبغية للبشرة، خلايا الدم ووحيدات النواة المحيطة (Sravani *et al.*, 2009). وهذه النتائج تدعم مفهوم فرضية الأجهاد التأكسدي وتأثير المواد المؤكسدة على ظهور مرض الربو (Yildirim *et al.*, 2004). تفسر فرضية الأجهاد التأكسدي كيفية حدوث مرض الربو وتسمى هذه النظرية ايضاً بنظرية التدمير المناعي الذاتي للخلايا الصبغية والتي تشير إلى دور عوامل الأكسدة، اذ تتولد الجذور الحرة او ما تسمى بعوامل الأكسدة مثل السوبر اوكسيد O_2^- (Superoxide) وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (Hydrogen peroxide) وأكسيد النيتريك (Nitric oxide) هذه الجزيئات تنتج خلال في الحالات الفسيولوجية الطبيعية داخل الجسم وكذلك يزداد انتاجها في بعض الحالات المرضية لكن الجسم يكبح ويلفظ تلك الجذور الحرة وبشكل مستمر من الجسم بواسطة الانزيمات المضادة للأكسدة مثل إنزيم SOD-1 وإنزيم الكاتاليز CAT وبيروكسيد الكلوتاثيون (Glutathione peroxidase) وفيتامين C وفيتامين E وبعض العناصر الأخرى (Fawzy and Rashed, 2012).

في بعض الحالات المرضية قد يكون نشاط مضادات الأكسدة غير كافي مما يؤدي إلى الإفراط في تراكم الجذور الحرة والتي تسبب تلف في المركبات الخلوية مثل البروتينات والكربوهيدرات والدهون

والحامض النووي للخلايا DNA (Khan *et al.*, 2009). في الظروف العادية للجسم يعمل إنزيم SOD-1 وهو إنزيم مضاد للأكسدة يحفز على تحويل سوبر اوكسيد- O_2 (Superoxid) إلى اوكسجين O_2 وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ويعمل إنزيم الكاتليز على تحويل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 إلى اوكسجين O_2 وماء H_2O جميع تلك الإنزيمات تعمل على مواجهة وكنس تلك الشوارد اذ اظهرت الدراسات على زيادة تراكم بيروكسيد الهيدروجين والنتاج من زيادة تحويل سوبر اوكسيد- O_2 (Superoxid) بواسطة إنزيم SOD-1 الذي ترتفع مستوياته بشكل معنوي في المصل والجلد ويستطيع بيروكسيد الهيدروجين من المرور وبسهولة عبر أغشية الخلايا الميلانية مما يسبب الكثير من التراكم والضرر داخل الخلايا الميلانية بالوقت الذي تنخفض فيه مستويات إنزيم الكاتليز CAT في الخلايا الصبغية في الجلد وكريات الدم الحمراء وخلايا وحيدة النواة في الدم المحيطي، وهذا ما يوضح دور الأكسدة في تطور مرض البهاق (Koca *et al.*, 2004).

2.9.2. هرمون الكورتيزول Cortisol hormone

تنتج الغدة الكظرية هرمون الكورتيزول (Glucocorticoid) بالإضافة الى إنتاج ثلاث أنواع من الهرمونات الستيرويدية المبنية من الدهون (الكوليسترول) وهذه الهرمونات هي ، Mineral corticoid و Adrenal androgen، أما في الأجنة خلال مدة الحمل فإن إنتاج هرمون الكورتيزول فيتم من الغدة الكظرية والكبد إضافة الى المشيمة ويعد هرمون الكورتيزول سريع الاستجابة وذلك من خلال سرعة بنائه وأفرازه من قبل الغدة الكظرية كأستجابة للهرمون المحفز للغدة الكظرية (Adrenocortico tropic hormone) ACTH المفرز من الغدة تحت المهاد اذ ينطلق من هذه الغدة ليخزن في الفص الأمامي للغدة النخامية ثم ينطلق الى مجرى الدم ليرتبط مع مستقبلات موجودة على قشرة الغدة الكظرية وتحدث هذه الاستجابة نتيجة الأجهاد ، زيادة مستويات مركبات الطاقة في الجسم إضافة الى تبدلات مكونات الجهاز المناعي نتيجة الأمراض المناعية الذاتية هذه المحفزات تزيد من التعبير الجيني لهذا الهرمون (Simpson and MacDonald, 1981).

ينطلق هرمون الكورتيزول كأستجابة للأجهاد لذلك يسمى بهرمون الأجهاد وكذلك في حالات انخفاض الكلوكوز في الدم يقوم الكورتيزول بعدة وظائف في الجسم من خلال رفع مستويات الكلوكوز في الجسم ، كبح فعالية الجهاز المناعي المفرطة بالإضافة الى دوره في أيض الدهون والكاربوهيدرات

والبروتينات. أما علاقة الكورتيزول بمرض البهاق فقد أشارت الدراسات إلى أن أزيداد معدلات الكورتيزول لمرضى البهاق يعمل على كبح العوامل الألتهابية المفرطة مثل بعض الحركيات الخلوية ومنها عامل التنخر الورمي $TNF-\alpha$ إضافة الى الحركي الخلوي الثاني IL-2 (Scott, 2011).

يعمل هرمون الكورتيزول على كبح الأستجابة المناعية المرتفعة في الجسم للأشخاص المصابين بمرض البهاق اذ انه يعمل على كبح الأجسام المضادة الذاتية (Auto antibodies) إضافة الى أنه يعمل على تحفيز الموت المبرمج للخلايا التائية النشطة ضد الخلايا الميلانية ، اذ لوحظ ارتفاع مستويات الكورتيزول في المصل إضافة الى ارتفاعه في المناطق المصابة بالمرض كونها تعمل على كبح المناعة الذاتية في مناطق الاصابة وتثبيط وظائف المكونات المناعية في تلك المنطقة في حين لوحظ ارتفاع الكورتيزول في المصل اذ يعمل على كبح وتعطيل القتل بواسطة نظام المتمم عن طريق كبح آلية عمل الأجسام المضادة الموجودة في المصل وتقليل تراكيذها وبالتالي يقلل ارتباطها مع المتممات على المستضدات السطحية للخلايا الميلانية (Klarquist *et al.*, 2010).

يظهر تأثير الكورتيزول على الجلد من خلال زيادة الترابط بين الخلايا وذلك من خلال زيادة مستويات جزيئات الألتصاق بين الخلوي التي توجد على اسطح الخلايا الجلدية اذ لوحظ زياد مستويات وفعالية هذه الجزيئات كنتيجة لزيادة مستويات هرمون الكورتيزول ومن هذه الجزيئات الخلوية هي (ICAM-1,CD54) ان تحفيز هذه الجزيئات يعمل على كبح الأستجابة الألتهابية ونشاط مكونات الجهاز المناعي إضافة الى زيادة ترابط الخلايا الجلدية ومنها الخلايا الميلانية ومنع فقدانها عن طريق الموت الخلوي المبرمج (Hwang *et al.*, 1999) . وجد ان إطلاق هرمون الكورتيزول يحدث كأستجابة الى ظروف الأجهاد مثل التعرض للأشعة فوق البنفسجية ، إطلاق الساييتوكينات المناعية الألتهابية إضافة الى الأصابة بالأمراض الجلدية المعدية (Slominski *et al.*,2000) اذ لوحظ ارتفاع مستويات هرمون الكورتيزول في مصل مرضى البهاق مقارنة بمجموعة السيطرة (Leykon and Vays, 2000) .

بينت الدراسات الطبية وجود علاقة بين الأصابة بمرض البهاق وبين الأصابة بمرض أديسون وهو المرض الذي اكتشف من قبل أديسون عام 1855 وهو مرض ناتج عن حدوث ضرر في الغدة الكظرية وينتج عنها اضطراب في إفراز الهرمونات المنتجة منها بما في ذلك هرمون الكورتيزول اذ تقل مستويات بناء وإطلاق هذا الهرمون فيؤدي الى تطور مرض البهاق بسبب نقص كفاءة أنتاج الغدة

الكظرية لهذا الهرمون المسؤول عن كبح فعالية الجهاز المناعي اذ يزداد نشاطها ضد الخلايا الميلانية أثناء قصور إنتاج هرمون الكورتيزول عن طريق الغدة الكظرية لذلك أثبتت الدراسات عن وجود ترابط بين مرض البهاق وبين مرض أديسون في الوقت نفسه وجد ان الأصابة بمرض أديسون يلاحظ فيها ارتفاع مستويات الأجسام المضادة autoantibodies للغدة الكظرية وهذه الأجسام المضادة يمكن ان تهاجم الخلايا الميلانية وتدمرها وتظهر مرض البهاق (Burns-Cox & Pearson 1972) .

3.9.2. السيروتونين Serotonin

ينتج هرمون السيروتونين عبر مسارات أيضية متعددة وفي أعضاء مختلفة من الجسم ومنها الجلد فقد بينت الدراسات وجود علاقة بين بناء صبغة الميلانين وبين هرمون السيروتونين، ويعد التربتوفان Tryptophan هو البادئة الأساسية لبناء السيروتونين ففي الجلد يتم بناء السيروتونين من Tryptophan اذ يتحول الى Hydroxytryptophan بواسطة إنزيم Tryptophan Hydroxylase اذ يوجد هذا الإنزيم في جلد الفئران والانسان (Oh *et al.*, 2016) بعد ذلك يتحول Tryptophan hydroxylase الى Decarboxy tryptophan لينتج منه السيروتونين (Slominski *et al.*, 2005) . يقوم هرمون السيروتونين بعدة وظائف في الجلد منها تقلص الاوعية الدموية في الجلد (Vasocontraction) والاستجابة للأجهادات (Stress response) وتنظيم بناء صبغة الميلانين في الجلد يعتمد عمل السيروتونين على عائلة من المستقبلات المهمة (Nordlind *et al.*, 2008) تشفر المستقبلات من قبل مجموعة من الجينات التي توجد في الجلد والتي تعبر عنها جينيا وهذه الجينات توجد في مجموعة من الحيوانات اضافة الى الانسان . بينت الكثير من الدراسات ان تأثير السيروتونين في الجلد من خلال تنظيم بناء صبغة الميلانين خلال الاصابة ببعض الأمراض مثل امراض سرطان الجلد والأمراض المناعية التي تزيد او تقلل من التصبغ مثل مرض البهاق (Slominski *et al.*, 2012) .

يحتاج الجلد الى وسائل وقاية ومقاومة للبشرة ضد مرض البهاق وضد الأجهاد والأضطرابات الأخرى للجلد لذلك فقد هي الجلد تضافر مجموعة من الفعاليات لعدة انظمة مثل فعالية الجهاز المناعي وفعالية الجهاز العصبي والتي تعد كخطوط دفاعية في الجسم ومن تلك المكونات التي تعود الى تلك الانظمة هي السيروتونين/الميلاتونين فقد برهنت الدراسات وجود علاقة بين السيروتونين ومضادات الأوكسدة ومنها نوع SOD-1 وذلك من خلال دور السيروتونين بحماية الخلايا الميلانية والحفاظ على

عملية التصبغ والنظام الداخلى لتلك الخلايا ضد الأجهادات والألتهابات وضد مرض البهاق وذلك من خلال تعبير تلك الخلايا وزيادة إنتاج السيروتونين والذي بدوره يتحول الى الميلاتونين في الجلد عبر إنزيمات مختلفة وهنا يقوم السيروتونين بدور مضاد للألتهابات من خلال تعزيز إنتاج مضادة الأكسدة مثل SOD-1 والكلوتاثيون (Glutathion) في الجلد ضد الأجهادات ومرض البهاق (Slominski *et al.*, 2005).

10.2. الوراثة ومرض البهاق

عزت الكثير من الدراسات والأبحاث الدور الوراثي في التأثير على ظهور مرض البهاق وتقدمه وعتد الوراثة من الأسباب الرئيسة للأمراضية ومن هذه الدراسات التي قدمت في هذا المجال هي الدراسة التي قدمها Zheng وآخرون (2012) اذ اشار الى وجود بعض جزيئات وراثية وهي (Micro-RNA molcules) ودورها الهام في تطور المرض وهي عبارة عن صنف صغير من الجزيئات الغير مشفرة هذه الجزيئات البروتينية تشفر من قبل مجموعة من الجينات يتسم عمل هذه الجزيئات في الحالات الطبيعية بتنظيم العديد من المكونات المناعية والخلايا المناعية في الجسم (Zhou *et al.*, 2011). كشفت الدراسات الحديثة عن وجود علاقة لزيادة التعبير الجيني لتلك الجزيئات مع مرض البهاق اذ عُد ارتفاع مستويات تلك الجزيئات في المصل بشكل ملحوظ يعطي مؤشر حيوي خطير لحدوث الأمراض (Yang *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2010; Weiland *et al.*, 2012). كما أشار كل من (Kosaka *et al.*, 2010; Weiland *et al.*, 2012) زيادة مستويات جزيئات miRNA خلال الاصابة بمرض البهاق يحفز زيادة اطلاق بعض الخلايا المناعية مثل الخلايا التائية نوع (CD4-Tcells) والخلايا القاتلة (NK cells) كما تزيد من الفعالية للخلايا الألتهمية (Phagocytic cells) كما انه يعطي تحفيز في زيادة اطلاق TNF- α في المصل الذي ينتهي بزيادة الموت المبرمج للخلايا الميلانية وزيادة تحطيمها والتهامها من قبل الخلايا البلعمية.

أشارت بعض الدراسات الى دور المناعة الذاتية في ظهوره اذ بين البعض دور الأجسام المضادة للخلايا المناعية والبعض اشار الى دور الخلايا المناعية مما يدل على دور الأستجابة المناعية الخلطية والخلوية في ظهور المرض وتطوره (Deo *et al.*, 2011). ان الدراسات التي قدمت عن دور المناعة في ظهور المرض قاد العديد من الباحثين الى تفسير تلك الأسباب المناعية وارجاعها الى أسباب وراثية مسؤولة عن الأستجابة المناعية والمناعة الألتهابية وحدث بعض التغيرات الحاصلة في الجينات

المتخصصة والمسؤولة عن تعبير تلك المكونات المناعية وقد كشف من خلال الكثير من الدراسات الوراثةية وبأستخدام تقنيات وراثية مختلفة عن وجود تغيرات وطفرات وراثية في العديد من تلك الجينات المسؤولة عن أنتاج المكونات المناعية والتي تهاجم خلايا الجسم ومنها الخلايا الميلانية في الجلد (Jin et al., 2007; Van- den et al., 2009). بينما أوضح Deo وآخرون (2011) عن وجود تغيرات وراثية في بعض المواقع (Locus) على الكروموسوم 17 لمرضى البهاق هذه المواقع مسؤولة عن تعبير مجموعة من الجزيئات البروتينية على الخلايا الاحادية (Mononuclear cells) في الدم والخلايا التائية Tcells والخلايا الحبيبية (Granulocytes) والخلايا الميلانية (Melanocytes) زيادة التعبير الجيني لتلك الجزيئات البروتينية على تلك الخلايا مسؤولة عن حدوث الموت المبرمج للخلايا بما فيها الخلايا الميلانية.

كما أشار Laddha وآخرون (2012) الى ان عامل $TNF-\alpha$ يلعب دوراً أساسياً في الأمراض العديدة من الأمراض المناعية منها مرض البهاق كأستجابة مناعية غير طبيعية ضد الخلايا الميلانية للجلد لمرضى البهاق اذ لوحظ ان $TNF-\alpha$ يمتلك مستويات عالية في المصل وقرح البهاق الظاهرة في الجلد والتي ظهرت بشكل فاقد للتصبغ اذ يلعب التغيرات الوراثية والنتائج من حدوث طفرات وراثية مختلفة في منطقة المشغل (Promoter region) للجينات المسؤولة عن تشفير $TNF-\alpha$ دوراً هاماً في تنظيم التعبير الجيني لاطلاق هذا العامل كما وجد ان هذا التغيرات الجيني في منطقة المشغل مرتبطة الى زيادة الترجمة والتعبير الجيني لعامل $TNF-\alpha$ وزيادة مستوياته لمرضى البهاق هذا الارتفاع يؤدي الى زيادة تقدم المرض وظهور البقع على الجلد نظراً للدور الذي يقوم به من حدوث الموت الخلوي للخلايا الميلانية.

يتميز البهاق بكونه يمتلك عدة مواضع جينية حساسة وغير متجانسة وراثياً وتلك الجينات قد تشترك مع الجينات المرتبطة بالبناء الحيوي لصبغة الميلانين وكذلك النظام المضاد للأكسدة وتنظيم المناعة الذاتية (Spritz, 2008). وتشير الدراسات الحديثة إلى أن العوامل الوراثية قد تلعب دوراً رئيساً في التسبب في مرض البهاق وذلك لأن هذا المرض مرتبط بتضرر عدد من الجينات المسؤولة عن ظهوره (Birlea et al., 2013). وهناك العديد من الجينات المرشحة المسببة لهذا المرض بما في ذلك *MHC* (major histocompatibility complex gene) اذ تمتلك جينات التوافق النسجي مناطق *Lcci* هذه المناطق وثيقة الارتباط بالكثير من الأمراض المناعية الذاتية ومنها مرض البهاق اضافة الى الجينات الأخرى التي لها تأثير على مرض البهاق وهي *CAT* (Catalase gene) و *Human*

IL-2RA و (Tumor necrosis factor gene) *TNF-α* و leukocytes antigen gene) *HLA* (Interleukin-2 receptor alpha gene) التي تشارك في تنظيم المناعة والتي تترافق مع مرض البهاق (Spritz, 2010; Elgendy *et al.*, 2016) اما الجينات التي هي محض الدراسة هي:

أولاً: الجينات الخاصة بعامل التنخر الورمي نوع الفا *TNF-α*:

يؤدي *TNF-α* إلى استجابة التهابية أولية (Proinflammatory) والتي تلعب دوراً حاسماً في التسبب في العديد من الاضطرابات الجلدية بما في ذلك مرض البهاق (Taieb, 2012). تقع الجينات الخاصة بعامل التنخر الورمي (*TNF-α* (OMIM 191160) ضمن منطقة معقد التوافق النسيجي الرئيسي الثالث (Major histocompatibility complex III) للكروموسوم 6، اذ يظهر الارتباط الوثيق للجينات المرتبطة بمستضد الكريات البيضاء البشرية (HLA) بصنفيها الأول (HLA-B) والصنف الثاني (HLA-DR) فقد بينت الدراسات المخبرية خارج جسم الكائن الحي *in vitro* باستخدام سموم داخلية (Endotoxin) محفزة على عينات دم مأخوذة من التوائم متماثلة الزيجوت فقد أظهرت الأدلة على أن 60% من التباين في القدرة الإنتاجية لـ *TNF-α* محدد وراثياً ومعتمد على تباين الجينات المسؤولة عنه (Westendorp *et al.*, 1997)، فقد بين ان انتاج *TNF-α* مرتبط بوجود العديد من الأشكال الوراثية داخل منطقة المشغل promoter من *TNF-α* وإنترون من *TNF-β* هي المسؤولة على وجه الخصوص على حدوث تبدلات في مستويات *TNF-α* (Sharma *et al.*, 2008) واحد من أفضل النيوكليوتيدات الموصوفة هو وصف الواقع عند الموقع -308 داخل منطقة *TNF-α* promoter (rs1800629)، الذي يؤثر على تسلسل الموقع الخاص بعامل النسخ البروتيني المنشط الثاني (Abraham and Kroeger, 1999) وقد حاولت العديد من الدراسات لإظهار الروابط بين التعرض للأمراض والتعدد الشكلي للجينات الخاصة بعامل التنخر الورمي بالإضافة إلى دورها الحاسم في التسبب في أمراض المناعة الذاتية، منها مرض البهاق وقد يساعد في تطوير استراتيجيات أفضل للوقاية وعلاج مرض البهاق (Qidwai and Khan, 2011).

ثانياً: الجينات الخاصة بالحركي الخلوي الثاني IL-2

تتواجد العديد من الأمراض المناعية الذاتية المختلفة في نفس الفرد والأسر، مما يشير إلى أنها قد تشترك مجموعة من المتغيرات الجينية الحساسة لذلك تعد المسببات الأكثر شيوعاً لتلك الأمراض

(Barcellos *et al.*, 2006) على سبيل المثال في الأسر التي لديها الذئبة الحمراء الجهازية (Systemic lupus erythematosus) وأمراض مناعة ذاتية أخرى مثل التصلب المتعدد (Multiple Sclerosis) والتهاب المفاصل الروماتيزمي (Rheumatoid arthritis) (Corporaal *et al.*, 2002) تشير الأبحاث والدراسات إلى وجود بعض الجينات المشتركة التي تساهم في المسارات البيوكيميائية المشتركة في هذه الأمراض ويدعم هذه الفرضية من خلال العديد من التقارير عن الجينات التي ترتبط مع أمراض المناعة الذاتية على سبيل المثال أرتبط التغيرات الوراثي لبعض جينات مرضى الذئبة الحمراء SLE مع أمراض الأمعاء الالتهابية وكذلك التغيرات الوراثي لجين IL-2RA مع أمراض الغدة الدرقية ومرض تصلب الشرايين ومرض البهاق (Dideberg *et al.*, 2007).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

MATERIALS AND
METHODES

المواد وطرائق العمل

1.3. الأجهزة والأدوات المستخدمة

جدول (1-3) الأجهزة المستخدمة في الدراسة الحالية

Origin المنشأ	Company اسم الشركة	Devices الأجهزة
Germany	Memmert	حمام مائي Water bath
France	Biomrieux	جهاز التآلق المناعي MINIVIDAS
Germany	Hettich Zenteifugen	جهاز الطرد المركزي Centrifuge
England UK	Cleaver	جهاز ترحيل الكهربائي Gel electrophorsis
France	Quantum	جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية
		Vortex مازج
Germany	Heidoph	مسخن حراري Heater
U.S.A	Biotteck Washer ELX -50 Rwedeer ELX-800	منظومة الاليزا ELISA
England		ميزان الكتروني حساس

2. 3. المواد المستخدمة

جدول (2-3) المواد المستخدمة في الدراسة الحالية

Origin المنشأ	Company اسم الشركة	Material المادة
Korea	Bioneer	PCR master mix kit
Canada	BIO BASIC	أكاروز Agarose
England	Biolabs	انزيم القطع الخاص بتقنية PCR-RFLP(MWOI)
Korea	Bioneer	بادئ لجين الحركي الخلوي الثاني IL-2RA Primer
Korea	Bioneer	بادئ لجين عامل التنخر الورمي TNF- α Primer
England	Biolabs	بروتيناز ك Proteinase K
Korea	Bioneer	حامض نووي معلوم الوزن الجزئي DNA Ladder
USA	Sigma	صبغة ايثيديوم برومايد البرتقالية Ethidium bromide
Taiwan	Favorgen Biotech	عدة استخلاص الحامض النووي DNA extraction
WuHan P.R.C	Elabscience	عدة قياس الحركي الخلوي الثاني IL-2 Kit
WuHan P.R.C	Elabscience	عدة قياس السيروتونين Serotonin Kit
WuHan P.R.C	Elabscience	عدة قياس عامل التنخر الورمي نوع الفا TNF- α kit
WuHan P.R.C	Elabscience	عدة قياس مضاد الاكسدة نوع اول SOD-1 kit
France	Biomerieux	عدة قياس هرمون الكورتيزول Cortisol Kit

3.3. طرائق العمل Methods

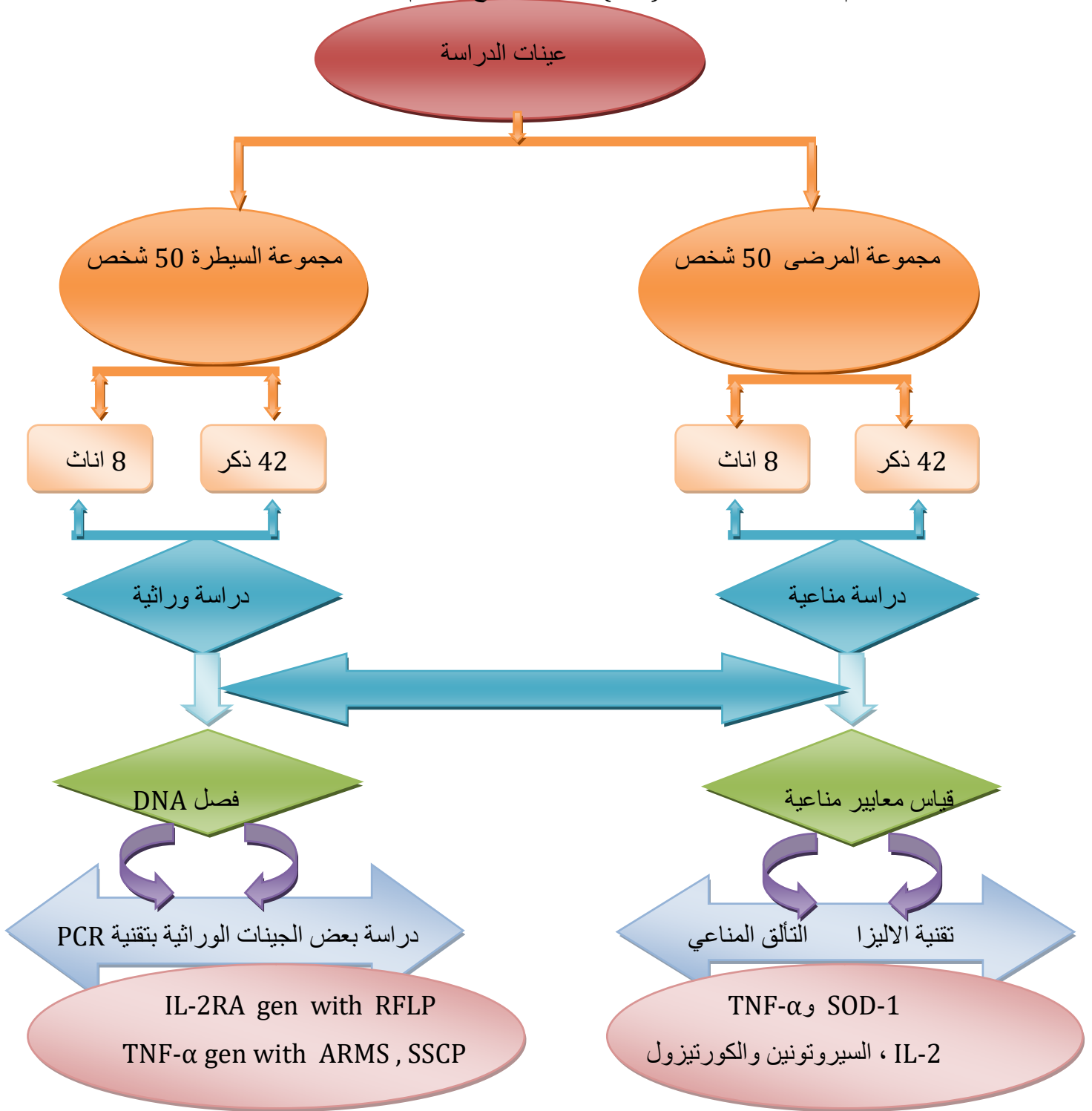
1.3. 3. عينات الدراسة Samples of study

تم تحديد نوع الدراسة وهي دراسة حالات مرضية لمرضى البهاق مقارنة بالسيطرة (Case control study) جمعت العينات من الأستشارية الجلدية في مستشفى الحسين التعليمي في محافظة كربلاء خلال المدة الزمنية 2015/5/1 ولغاية 2016/1/15، إذ شملت مجموعة المرضى (50) مريضا مؤلفا من ذكور (42) وأناث (8) إضافة الى مجموعة السيطرة الأصحاء ظاهرياً مع ملاحظة خلوهم من أية أعراض مرضية اعتماداً على التشخيص السريري من قبل الطبيب المختص وسيرة حياتهم الصحية وقد تم جمع المعلومات من المرضى والتي شملت (العمر، الجنس، التدخين، التاريخ العائلي، صلة القرابة بين الوالدين، الحالة الاجتماعية للمريض واخيراً مدة الإصابة بالمرض) كما تم أستبعاد بعض الحالات المرضية مثل مصابي الصدفية وذلك بسبب حدوث تداخل بين المرضى وظهور تأثير ذلك على المعايير المناعية والهرمونية.

2.3. 3. جمع عينات الدم وخبزنها blood sampling collection and store

تم سحب 5ml من الدم الوريدي (venous blood) بواسطة محقنة طبية للأشخاص قيد الدراسة بعد تطهير الجلد بالكحول بنسبة 70% ثم قسمت عينات الدم الى قسمين القسم الأول 2ml حفظت في أنابيب EDTA tubes لغرض الدراسات الوراثةية والقسم الآخر بمقدار 3ml حفظت في أنابيب gel tubes لغرض الدراسات المناعية، ترك القسم الثاني 1-2 ساعة تحت درجة حرارة الغرفة لغرض التبخثر التام وحدث التجلط أو الخثرة gloat وتم فصل المصل باستخدام جهاز الطرد المركزي Centrifuge (3000 دورة لمدة 5 دقائق) ثم تم جمع المصل في أنابيب ابندروف بلاستيكية نظيفة ومعقمة وحفظ في الثلاجة بدرجة (-10)م⁰ لحين الاستخدام. حفظت عينات الدم blood samples وعينات المصل serum samples بعد جمعها من الأشخاص المصابين بمرض البهاق ومجموعة السيطرة تحت درجة حرارة (-20)م⁰ في أنابيب EDTA المانعة للتبخثر وأنابيب ابندروف البلاستيكية على التوالي واستخدم الدم في الاختبارات الوراثةية اما المصل فقد استخدم للتحري عن مستويات الحركي الخلوي الثاني والقسم آخر للتحري عن مستوى عامل التبخثر الورمي إضافة الى قياس مستوى السيروتونين والكورتيزول في المصل (Lewise et al.,2001).

4.3. تصميم تجربة البحث: شكل (1-3) مخطط يوضح تصميم التجربة :



5.3. طرائق القياس المناعي

1.5.3. طريقة قياس تركيز الحركي الخلوي الثاني وعامل التنخر الورمي نوع الفا بتقنية الأليزا

Measurement of IL-2 and TNF- α levels by ELISA

1.1.5.3 مبدأ الأختبار للـ IL-2 بتقنية الأليزا

تعتمد عدة الأختبار للتحري عن الحركي الخلوي الثاني IL-2 وعامل التنخر الورمي نوع الفا TNF- α الخاصة بتقنية الأليزا على طريقة شطيرة الأليزا Sandwich-ELISA . تزود كل عدة قياس للحركي الخلوي الثاني وعامل التنخر الورمي نوع الفا بصفيحة دقيقة micro-ELISA plate تحوي كل صفيحة على حفر wells كل حفرة تحوي على جسم مضاد أولي specific pre-antibody للحركي الخلوي الثاني او عامل التنخر الورمي نوع الفا . عندما تضاف العينات samples او المحاليل القياسية standers في الحفر المناسبة للصفيحة ،سوف ترتبط المستضدات الموجودة في مصل العينة مع الجسم المضاد الأولي المتخصص، ثم يضاف الجسم المضاد للبيروكسيداز الكاشف biotinylated detection antibody والمتخصص للحركي الخلوي الثاني او عامل التنخر الورمي نوع الفا مع المحلول الرابط Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate داخل الحفر وتحضن في الحاضنة. تزال المكونات الحرة غير المرتبطة عن طريق الغسل بعد ذلك يضاف المحلول الأساس Substrate solution لكل حفرة داخل الصفيحة سوف يظهر اللون الأزرق في الحفر الحاوية فقط على الحركي الخلوي لثاني او عامل التنخر الورمي نوع الفا ،الجسم المضاد الكاشف biotinylated detection antibody والمحلول الرابط Avidin- Conjugate Horseradish Peroxidase (HRP). إضافة محلول التوقف Stop solution والذي ينهي التفاعل وهو عبارة عن محلول مكون من حامض الكبريتيك والذي يحول الحفر من اللون الأزرق الى اللون الأصفر. تقاس الكثافة الضوئية (OD) optical density طيفيا عند الطول الموجي 450 نانومتر وان قيمة الكثافة الضوئية هي مقياس لتركيز الحركي الخلوي الثاني او عامل التنخر الورمي نوع

الفا ويحتسب تركيز الحركي الخلوي الثاني او عامل التنخر الورمي للعينات من خلال مقارنة قيمة الكثافة الضوئية OD للعينات مع المنحني القياسي standard curve .

2.1.5.3 طريقة قياس عامل التنخر الورمي نوع الفا والحركي الخلوي الثاني TNF- α and TNF- α procedure وحسب خطوات شركة Elabscience المصنعة:

1. **أضافة العينة Add sample** : أضيف 100 مايكروليتر من المحلول القياسي standard ، blank او العينة لكل حفرة ، أضيف blank مع المحلول القياسي الأساسي References standard solution والعينة المخففة diluted sample اذ أضيفت جميع المحاليل أسفل الحفرة للصفحة plate الخاصة بعدة القياس لتقنية الأليزا Kit مع تجنب ملامسة جدران الحفر لتجنب حدوث الرغوة داخلها بعد ذلك غطيت الصفحة بسدادة sealer بلاستيكية شفافة مرفقة مع العدة الخاصة بالقياس Kit وحضنت لمدة 90 دقيقة وعند درجة حرارة 37 C⁰ .

2. **أضافة محلول البيروكسيد الكاشف Biotinylated Detection** : أزالة السائل من كل حفر الصفحة دون غسل مباشرة وأضيف 100 مايكروليتر من محلول البيروكسيد الكاشف Biotinylated Detection لكل حفرة ثم غطيت بسدادة Sealer بلاستيكية شفافة وحضنت لمدة ساعة عند درجة حرارة 37C⁰ .

3. **الغسل Wash**: فرغت محتويات الحفر وغسلت ثلاث مرات وذلك بأضافة محلول الغسل (حوالي 350 مايكروليتر) الى كل حفرة. ان أزالة السائل بشكل تام من الحفر تعد خطوة جدا ضرورية. بعد آخر عملية غسل يجب أزالة محلول الغسل المتبقي في الحفر بشكل كامل عن طريق النضح او الطرح من خلال قلب الصفحة وطرقها على ورق نشاف نضيف وجاف مثبت على سطح صلب .

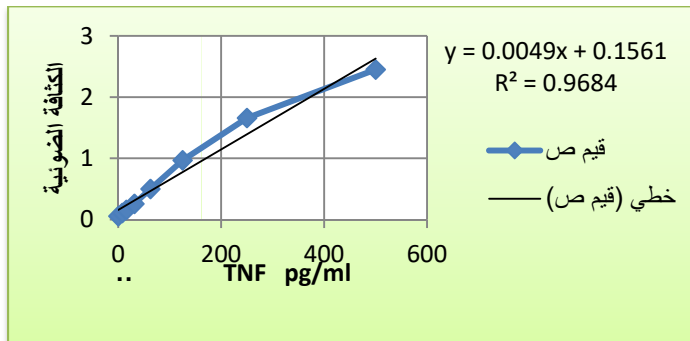
4. إضافة المحلول الرابط **HRP Conjugate**: أضيف 100 مايكروليتر من المحلول الرابط **HRP Conjugate** لكل حفرة ثم غطيت الصفيحة بالسدادة وحُضنت لمدة 30 دقيقة تحت درجة حرارة 37°C .

5. **الغسل Wash**: أُعيدت عملية الغسل كما في الخطوه الثالثة مع تكرار عملية الغسل 5 مرات.

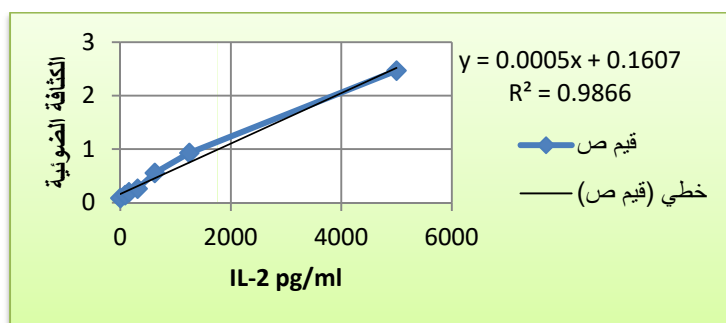
6. إضافة المحلول الأساس **Substrate**: أضيفت 90 مايكروليتر من إضافة المحلول الأساس **Substrate** لكل حفرة وهنا غطيت الصفيحة بسدادة جديدة وحضنت لمدة 15 ثانية تحت درجة حرارة 37°C وتمت حمايته من الضوء, ويمكن ان يزداد وقت التفاعل تبعاً الى الوقت ودرجة حرارة الحضانة شرط ان لا يزداد الوقت عن 30 دقيقة وعندما يظهر ميل التدرج اي التغير في اللون في الحفر القياسية يمكن ان يستخدم كدليل لنهاية التفاعل اذ يبدوا اللون في الحفر أزرق وتختلف شدة اللون باختلاف التركيز.

7. إضافة محلول التوقف **Stop solution**: تم إضافة 50 مايكروليتر من محلول التوقف لكل حفرة ولوحظ توقف التفاعل من خلال تغير اللون الى الاصفر مباشرة.

8. **القياس OD Measurement**: حددت الكثافة الضوئية لكل حفرة وتمت القراءة باستخدام الطول الموجي 450 نانومتر لقياس تركيز IL-2 و TNF- α باستخدام جهاز **Micro-plate reader** وطبعت النتائج .



شكل (2-3) منحنى تركيز TNF- α



شكل (3-3) منحنى تركيز IL-2

2.5.3. طريقة قياس تركيز مضاد الأكسدة 1 Superoxide Dismutase وهرمون السيروتونين

Measurement of SOD-1 and Serotonin levels by Serotonin

ELISA

1.2.5.3 مبدأ اختبار SOD1 وهرمون Serotonin بتقنية الأليزا

تعتمد عدة الأختبار لمضاد الأكسدة نوع SOD-1 وهرمون السيروتونين الخاصة بتقنية الأليزا على الطريقة التنافسية الأليزا Competitive-ELISA. تزود عدة قياس SOD-1 وهرمون السيروتونين بصفيحة دقيقة microtiter plate تحوي كل صفيحة على حفر wells كل حفرة تحوي على جسم مضاد أولي specific pre-antibody لمضاد الأكسدة نوع SOD1 وهرمون السيروتونين. عندما تضاف العينات samples او المحاليل القياسية standers في الحفر المناسبة للصفيحة سوف ترتبط المستضدات الموجودة في مصل العينة مع الجسم المضاد الاولي المتخصص ، ثم يضاف الجسم المضاد للبيروكسيديز الكاشف biotinylated detection antibody والمتخصص لقياس SOD-1 وهرمون السيروتونين مع المحلول الرابط Avidin-Horseradish Peroxidase Conjugate (HRP) داخل الحفر وتحضن في الحاضنة. تزال المكونات الحرة غير المرتبطة عن طريق الغسل بعد ذلك يضاف المحلول الأساس Substrate solution لكل حفرة داخل الصفيحة فسوف يظهر اللون الازرق في الحفر الحاوية فقط على SOD-1 او السيروتونين، الجسم المضاد الكاشف biotinylated detection antibody والمحلل الرابط Avidin-Horseradish Peroxidase Conjugate (HRP). إضافة محلول التوقف Stop solution سوف ينهي التفاعل وهو عبارة عن محلول مكون

من حامض الكبريتيك والذي يحول اللون في الحفر من اللون الأزرق الى اللون الأصفر. تقاس الكثافة الضوئية (OD) optical density طيفيا عند الطول الموجي 450 نانومتر وان قيمة الكثافة الضوئية هي مقياس لتركيز SOD-1 او السيروتونين ويمكن ان يحتسب تركيز SOD-1 وهرمون السيروتونين للعينات من خلال مقارنة قيمة الكثافة الضوئية OD للعينات مع المنحني القياسي standard curve .

2.2.5.3 طريقة قياس مضاد الأكسدة والسيروتونين Serotonin and SOD-1 procedure assay وحسب خطوات شركة Elabscience المصنعة:

1. إضافة العينة **Add sample** : أضيف 50 مايكروليتر من المحلول القياسي blank ، standard او العينة لكل حفرة ، وهنا أضيف blank مع المحلول القياسي الأساسي References standard solution والعينة المخففة sample diluted واطيف 50 مايكروليتر مباشرة من Biotinylated Detection Ab لكل حفرة ، اذ أضيفت جميع المحاليل أسفل الحفرة للصفحة plate الخاصة بعدة القياس لتقنية الأليزا مع تجنب ملامسة جدران الحفر لتجنب حدوث الرغوة داخلها ، بعد ذلك غطيت الصفحة بسدادة sealer بلاستيكية شفافة مرفقة مع العدة الخاصة بالقياس وحُضن SOD-1 لمدة 90 دقيقة وعند درجة حرارة 37 C⁰ اما السيروتونين فقد حُضن لمدة 45 دقيقة.

2. إضافة محلول البيروكسيديز الكاشف **Biotinylated Detection** : تم إزالة السائل من كل حفر الصفحة دون غسل مباشرة وأضيف 100 مايكروليتر من محلول البيروكسيديز الكاشف Biotinylated Detection لكل حفرة ثم غطيت بسدادة Sealer بلاستيكية شفافة وتحضن لمدة ساعة عند درجة حرارة 37 C⁰ .

3. **الغسل Wash** : فرغت محتويات الحفر وغسلت ثلاث مرات وذلك بأضافة محلول الغسل (حوالي 350 مايكروليتر) الى كل حفرة باستخدام الماصة Micropipet متعددة القنوات ، ان إزالة السائل بشكل تام من الحفر تعتبر خطوة جداً ضرورية, بعد اخر عملية غسل يجب إزالة محلول الغسل المتبقي في الحفر

بشكل كامل عن طريق النضح او الطرح من خلال قلب الصفيحة وطرقها على ورق نشاف نضيف وجاف مثبت على سطح صلب .

4. اضافة المحلول الرابط **HRP Conjugate**: أضيف 100 مايكروليتر من المحلول الرابط HRP Conjugate لكل حفرة ثم غطيت الصفيحة بالسداة وحضنت لمدة 30 دقيقة تحت درجة حرارة 37C^0

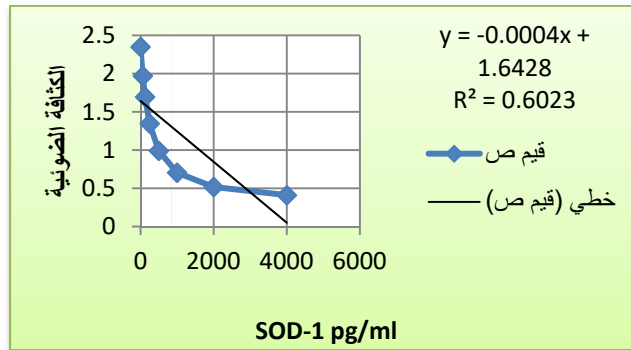
5. الغسل **Wash**: أعيدت عملية الغسل كما في الخطوه الثالثة مع تكرار عملية الغسل 5 مرات.

6. اضافة المحلول الأساس **Substrate**: أضيفت 90 مايكروليتر من المحلول الأساس **Substrate**

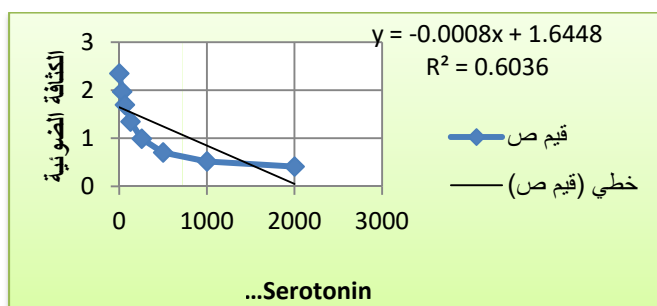
لكل حفرة وهنا غطيت الصفيحة بسداة جديدة وحضنة لمدة 15 ثانية تحت درجة حرارة 37C^0 وتمت حماية من الضوء, ويمكن ان يزداد وقت التفاعل تبعاً الى الوقت ودرجة حرارة الحضان شرط ان لا يزداد الوقت عن 30 دقيقة وعندما يظهر ميل التدرج اي التغيير في اللون في الحفر القياسية يمكن ان يستخدم كدليل لنهاية التفاعل اذ يبدو اللون في الحفر أزرق وتختلف شدة اللون باختلاف التركيز.

7. اضافة محلول التوقف **Stop solution**: تم اضافة 50 مايكروليتر من محلول التوقف لكل حفرة ولوحظ توقف التفاعل من خلال تغير اللون الى الأصفر مباشرة.

8. القياس **OD Measurement**: حددت الكثافة الضوئية لكل حفرة وتتم القراءة بأستخدام الطول الموجي 450 نانومتر لقياس تركيز SOD-1 والسيروتونين بأستخدام جهاز **Micro-plate reader** وطبعت النتائج .



شكل (4-3) منحنى تركيز SOD-1



شكل (3-5) منحنى تركيز Serotonin

3.5.3. طريقة قياس تركيز هرمون الكورتيزول Measurement of Cortisol levels

1.3.5.3 مبدأ الأختبار لهرمون الكورتيزول بطريقة التآلق المناعي

تمت طريقة القياس بواسطة نظام VIDAS ذاتي العمل وحسب طريقة الشركة المصنعة (Biomerieux) الفرنسية تمكن من احتساب هرمون الكورتيزول مباشرة بطريقة كمية في المصل والبلازما . يعتمد مبدأ القياس على الأحتساب بواسطة الإنزيمات المناعية القياسية enzyme immunoassay التي تترافق مع المواد المتألقة fluorescent detection materials يعمل طور الصلب solid phase كطور صلب و pipetting device (SRP) في ذات الوقت . تمتاز المواد المتفاعلة بكونها تستخدم مباشرة في التفاعل . يدور وسط التفاعل عدة مرات داخل وخارج طور الصلب (SRP) . تنقل العينة الى داخل حفر التفاعل والتي تحوي على المادة الرابطة وهي مشتق الكورتيزول المعلم بالفوسفات القاعدية Conjugated : alkaline phosphatase-labeled Cortisol derivative وهنا يرتبط الكورتيزول الموجود في المصل او البلازما مع مشتق الكورتيزول في حفرة التفاعل في الموقع الخاص الموجود على سطح الجسم المضاد للكورتيزول والذي يثبت على الجزء الداخلي للوسط الصلب . في الخطوة الأخيرة تُدور المادة (4-methyl-umbelliferone) خارج الوسط الصلب . يقوم إنزيم الكتلز الرابطة بتحليل المواد المتفاعلة وتألقتها بعد ذلك تقاس على الطول الموجي 450 nm . ان كمية التآلق يعكس تركيز المستضد في المصل.

2.3.5.3 طريقة قياس هرمون الكورتيزول Cortisol procedure

حسب طريقة الشركة المصنعة (Biomerieux) الفرنسية

1. تُحضّر المواد المتفاعلة وتذوب في درجة حرارة المختبر مع تحضير العينات أيضاً .

2. أستخدم شريط واحد من CORS strip مع CORS SRPs لكل عينة .

3. تحديد الأختبار بواسطة CORS code الموجود على instrument وتحديد المعاييرة بواسطة (S1) اي العينة الأولى ثم أختبرت بواسطة triplicate اما في حالة المعاييرة لعينة السيطرة فحددت بأستخدام (C1).

4. خلطت مواد المعاييرة مع العينات التجريبية والسيطرة بأستخدام المازج من نوع Vortex type mixer .

5. أدخلت CORS SRPs و CORS strip الى instrument مع أختبار اللون الخاص بـ instrument المعلمة .

6. يبدأ القياس مباشرة اذ تحدث جميع الخطوات أوماتيكيا داخل الجهاز بواسطة instrument .

7. أعيد أغلاق العبوة vials وإعيدت إلى الحضان تحت درجة حرارة 2-8C⁰ بعد pipetting .

8. يكتمل التفاعل بعد 40 دقيقة وبعد أنتهاء التفاعل يزال SRP و strip من instrument .

9. وضع المستخدم على الراسب المناسب اذ يقوم الجهاز بأعطاء النتيجة ذاتياً وحسب عدة الكشف .

3. 6. دراسة التغيرات الوراثية لجينات الحركي الخلوي الثاني وعامل التنخر الورمي:

3. 1.6. طريقة أستخلاص DNA extraction DNA وحسب خطوات شركة

(Favorgen Biotech) المصنعة

أولاً: تحضير العينات Sample preparation

1. نقل 200µl من الدم الى انبوبة ابندروف بقياس 1.5 ml .

2. أضيف 30µl من بروتينيز k (10mg/ml) الى الأنبوبة الدقيقة الحاوية على عينة الدم مع الخلط بشكل جيد ثم يحضن لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 60 C⁰ في الحمام المائي .

ثانياً: تحليل الخلية Cell lysis

1. أضيف 200µl من المحلول المنظم FABG buffer الى العينة واخلطها جيداً .

2. حُضنت العينة في الحمام المائي لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 70 C⁰ لغرض تحليل العينة خلال عملية الحضن مع تقليب العينة كل ثلاثة دقائق .

ثالثاً: الارتباط Binding

1. أضيف 200 مايكروليتر من الإيثانول (96-100%) الى العينة ويخلط جيداً لمدة 10 دقائق في حالة وجود ترسبات .

2. وضع أنابيب FABG في أنابيب جامعة بقياس 2 مل ، ثم نقل إليها العينة الخالية من أي ترسب الى أنابيب FABG ، ثم طردت مركزياً لمدة 5 دقائق عند اعلى سرعة (14,000 دورة بالدقيقة) ، بعد ذلك طرح الراسب مع أنبوبة الجمع ثم وضعت انبوبة FABG في انبوبة جامعة جديدة بقياس 2 مل.

رابعاً: طريقة الغسل Washing

1. أضيف 400 مايكروليتر من المحلول المنظم نوع W1- buffer الى أنبوبة FABG من ثم طرد مركزياً لمدة دقيقة واحدة عند نفس السرعة السابقة ثم طرح الراسب ايضاً .

2. أضيف 600 مايكروليتر من المحلول المنظم FABG wash buffer الى نفس أنبوبة الجمع السابقة مع غسل الانبوبة وطردت مركزياً ايضاً لمدة دقيقة واحدة بنفس السرعة السابقة مع طرح الراسب ايضاً .

3. أرجاع أنبوبة FABG الى نفس انبوبة الجمع وتطرد مركزياً لمدة ثلاثة دقائق بنفس السرعة السابقة لغرض تجفيف أنبوبة FABG .

خامساً: الأستخراج والحفظ Elution :

1. وضعت أنبوبة FABG الجافة في أنبوبة أبندروف بقياس 1.5 مل جديدة .
2. أضيف 100 مايكروليتر من محلول Elution الموضوع مسبقاً في الحمام المائي بعد ذلك طردت العينة مركزياً لمدة ثلاثة دقائق بنفس السرعة السابقة للحصول على قطع DNA في أنبوبة الابندروف .
3. خفضت العينة الحاوية على قطع DNA عند درجة حرارة - 20⁰م.

3. 2.6. الترحيل:

بعد أستخلاص DNA اعتمدت طريقة (Sambrook *et al.*,1989) للتأكد من وجود DNA المستخلص من الدم .

اولاً- تحضير جل الأكاروز

1. تم إذابة (0.4 غم) من الأكاروز في (40 مل) من 0.5 X TBE بوساطة تسخين المزيج إلى درجة الغليان بأستخدام صفيحة حرارية إلى أن تم إذابة كل دقائق الجل ، إذ يبدو المزيج صافي من دون أي دقائق عالقة من المسحوق .
 2. أضيف 1 مايكروليتر من بروميد ألاتيديوم Ethidium Bromide إلى سائل الأكاروز .
 3. حرك سائل الأكاروز لكي يمتزج ولتجنب حدوث فقاعات
 4. صب المزيج في صفيحة الإسناد وبعد غمس المشط comb قرب إحدى نهايتي الصفيحة
 5. ترك المزيج ليتصلب في درجة حرارة الغرفة
 6. أزيل المشط بهدوء وكذلك مساند الصفيحة
 7. وضعت الصفيحة في مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي ثم غطيت بيفر الترحيل 1X TBE وعلى ارتفاع (1 ملم) فوق سطح الجل .
- ثانياً- تحضير صبغة برومومثيل الزرقاء **Bromomethyle Blue**: والتي حُضرت من خلال إضافة 5 مل من الماء المقطر D.W إلى 4 غم من السكروز sucrose مع إضافة 0.25 غم من صبغة Bromomethyle Blue ثم اكمل الخليط إلى 10 مل من الماء المقطر تبعاً لطريقة كل من (Sambrook and Russell,2001)

ثالثاً- تحميل الـ DNA والترحيل الكهربائي DNA loading & Electrophoresis

مزج 5 مايكروليتر من DNA مع 3 مايكروليتر من صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol Blue ، إذ حُملت العينات في الحفر المفردة من الجل. تم ترحيل العينات على طاقة كهربائية مقدارها (70 فولت) ولمدة ساعة ، إذ تم الترحيل من الكاثود (-) إلى الأنود (+)، ثم أُستخدم جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV light transillminator لغرض مشاهدة حزم الـ DNA، وان الحزم الملونة بصبغة برومايد الإثيديوم صُورت باستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي Photo documentation system.

3.6.3. طريقة عمل PCR

أولاً: تحديد البوادي:

تم اختيار البوادي وكما موضح في الجدول رقم (3-3) لغرض إجراء الكشف الجزيئي على الطفرات المدروسة لجيني IL-2RA و TNF- α (Al-Harthi *et al.*, 2013 ; Alcina *et al.*, 2009).

جدول رقم (3-3) البوادي التي تم استخدامها في الدراسة

اسم الجين	النتائج
IL2RA (rs1570538) forward	TCATGTGACATCTGGAGGGTTA
Reverse	AAAATGAATTTTCGTCAATTCGAG
TNF- α Forward	184 bp 5'-TCT CGG TTT CTT CTC CAT CG-3

5'-ATA GGT TTT GAG GGG CAT GG-3	Revisers 1 G allele
5'-AAT AGG TTT TGA GGG GCA TGA-3	Revisers 2 A allele

ثانياً: تخفيف البوادئ Primers Dilution

تم تجهيز جميع البوادئ من شركة (Bioneer) (Lyophilized product) وتم تحضير محلول الخزن Stock solution ومحلول العمل Working solution بحسب تعليمات الشركة. حضر محلول الخزن بعد طرده مركزياً ولفترة قليلة بعد ذلك أضيف الماء المزال الأيون Deionized water للحصول على التركيز النهائي للعالق (100 picomols/ μ l). أما محلول العمل Working solution فقد تم تحضيره بواسطة سحب (10 μ l) من محلول الخزن (100 picomols/ μ l) وتخفيفه بـ (90 μ l) من الماء المزال الأيون للحصول على التركيز النهائي لمحلول العمل والذي هو (10 picomols/ μ l).

ثالثاً: تحديد درجة الحرارة المثالية وظروف التضخيم والوزن الجزيئي لجين IL-2RA بتقنية PCR وتحميل ناتج تفاعل البلمره المتسلسل والترحيل الكهربائي:

تم أستخلاص DNA في الخطوة السابقة وأستخدم ناتج عملية الأستخلاص والمكون من قطع DNA الكروموسومي للخطوة اللاحقة وهي تحديد درجة الحرارة المثالية لتضخيم قطع DNA عن طرق تقنية التدرج الحراري للـ PCR وبعد ذلك تحديد الوزن الجزيئي لقطع DNA بتقنية PCR المضخم إذ تم أستخدام المواد التالية كما في جدول (4-3) (5-3) (6-3):

جدول (4-3) مكونات مسترمكس Master mix components

الكمية	العنصر
1 U/ μ l	Top DNA polymerase
250 Mm	Each: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

10 Mm	Tris-HCl (pH 9.0)
30 mM	KCl
1.5 mM	MgCl ₂
	Stabilizer and tracking dye

جدول (5-3) المكونات المستخدمة في التدرج لتقنية PCR والتضخيم

الكمية	المادة
1 µl	IL-2RA forward
1 µl	IL-2RA revers
2.5 µl	DNA exraction
10.5 µl	Deionized D. water
5 µl	Master max
20 µl	Total

جدول (6-3) الظروف المستخدمة في تحديد درجة الحرارة المثالية لتضخيم جين (IL2RA) بتقنية PCR gradient

stage	Cycle	Step	Temperature	Function	Time
1	1	1	94.0	Pre-denaturation	5:00
2	30	1	94.0	denaturation	0.30
		2	55-61	annealing	0.20
		3	72.0	Elongation	0.23
3	1	1	72.0	Extension	10:00
		2	4.0	Elongation	HOLD

تم استخدام تقنية التدرج PCR لتحديد درجة الحرارة المثلى فقد استخدمت درجة حرارة تراوح بين 55-61 درجة مئوية في خطوة التصلب Annealing step فقد تبين ان أفضل درجة حرارة هي 61 وقد تم أكمل بقية العينات على نفس الظروف للحصول على نواتج pcr (pcr products) من خلال ضبط جهاز التضخيم على درجة حرارة 61 في خطوة التصلب Annealing step من أجل تضخيم القطع الهدف لجين IL-2RA .

جدول رقم (7-3) الظروف المستخدمة لتقنية PCR لجين (IL2RA)

stage	Cycle	Step	Temperature	Function	Time
1	1	1	94.0	Pre-denaturation	5:00
2	30	1	94.0	denaturation	0.30

		2	61	annealing	0.20
		3	72.0	Elongation	0.23
3	1	1	72.0	Extension	10:00
		2	4.0	Elongation	HOLD

تم تحميل 5 مايكروليتر من DNA ladder (DNA ladder معلوم الوزن الجزيئي مع 5 مايكروليتر من نواتج PCR في جل الأكاروز وتركيز (0.6 %) في 40 مل من (0.5X TBE Buffer) ، إذ تم الترحيل على طاقة كهربائية مقدارها (70V) ولمدة ساعة أضيف الى الجل صبغة بروميد الإثيديوم السائلة وبكمية 1 مايكروليتر تم مشاهدة الحزم بواسطة مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV transiluminater، وتم تصويرها باستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي Photo documentation system وبأستخدام Ladder لتحديد الوزن الجزيئي اذ يبلغ حجم 1000 pb Ladder .

*دراسة التغيرات الجينية لجين IL-2RA بأستخدام تقنية التباين في اطوال قطع التقييد Restriction

Fragment Length Polymorphism (RFLP)

هو أحد تقنيات PCR ويطلق على تسلسل الحمض النووي التي يتم التعرف اليها من قبل إنزيم القطع بمواقع القطع ويتم التعرف على هذه المواقع عن طريق عدد نيوكليوتيدات الأقطاع الداخلية التي تشطر الحمض النووي إلى أجزاء مختلفة الاحجام.

مصدر الإنزيم القاطع هو *Methanothermobacter wolfeii* حسب شركة (Biolabs)

البريطانية المصنعة

تسلسل الإنزيم القاطع:

5' ... G C N N N N N ▼ N N G C ... 3'

3' ... C G N N ▲ N N N N N C G ... 5'

التسلسل بعد القطع:

5' G C N N N N N N N G C... .. 3'

3'C G N N N N N N N C G... .. 5'

جدول (8-3) المواد والتراكيز الخاصة بانزيم القطع MWOI Restriction enzyme

الكمية	المادة
100 ml	Restriction Enzyme
	10X NE Buffer

جدول (9-3) المواد والتراكيز التي استخدمت في تقنية PCR-RFLP :

الكمية	المادة
1 µl	Restriction Enzyme
5 µl	1X NE Buffer
10 µl	DNA(PCR products)
34 µl	dH ₂ O
50 µl	Total Rnx Volume
37C ⁰	Incubation Temperature
15 min	Incubation Time

رابعاً: دراسة التغيرات الجينية لجين TNF- α باستخدام تقنية البلمرة الرجعية الطافرة لجين TNF- α (308) بتقنية **Amplification Refectory Mutation ARMS-PCR**:

تم الاعتماد على تقنية ARMS-PCR لتحديد genotyping الخاص بجين TNF- α (308) وتعتمد هذه التقنية على استخدام ثلاث بادئات وتعد طريقة سهلة في الأجراء وتمتاز بوقت أقصر في إعطاء النتائج، تم استخدام الظروف المدونة في جدول (10-3) لتحديد درجة الحرارة والوزن الجزيئي وتحديد التغيرات الوراثي لجين TNF- α (308) في أن واحد (Al-Harhi *et al.*, 2013).

جدول رقم (10-3) الظروف المستخدمة لتقنية ARMS-PCR الخاصة بجين (TNF- α 308)

Stage	Cycle	Step	Temperature	Function	Time
1	1	1	94.0	Pre-denaturation	5:00
2	10	1	94.0	Denaturation	0.15
		2	65.0	Denaturation	0.50
		3	72.0	Annealing	0.40
3	25	1	94.0	Extension	0:20
		2	59.0	Denaturation	0.50
		3	72.0	Annealing	0.50

4	1	1	72.0	Extension	7:00
		2	4.0	Final extension	HOLD

جدول (3-11) المواد والتراكيز التي استخدمت في تقنية ARMS-PCR :

المادة	الكمية
TNF- α Forward	1 μ l
Revisers 1 G allele	1 μ l
Revisers 2 A allele	1 μ l
DNA	1 μ l
dH ₂ O	16 μ l

* دراسة التغيرات الجينية بتقنية مسخ الشريط المفرد SSCP Study with single strand conformation polymorphism technique

مبدأ طريقة الشريط المفرد : تستند هذه التقنية على حقيقة ان الشريط المفرد مبني على تركيب ثانوي معروف الاختلافات المتسلسلة الصغيرة جداً مثل ، تغير قاعدة واحدة يمكن أن تؤثر على هذا الهيكل الثانوي ويمكن الكشف عنها بواسطة الترحيل الكهربائي في جل بولي - الاكريلاميد غير المساخ ، مسخ الشريط المزدوج الطافر بالإضافة الى أنواع عديدة من العينات سرعان ما يتمسخ إلى خيوط مفردة ومن ثم تم تحميلها على هلام . ان الاختلافات في حركة تلك الأشرطة المفردة بين

مجموعة السيطرة والعينات الأخرى تشير إلى وجود الطفرة mutation ، تبعاً لطريقة (Orita *et al.*, 1989).

طريقة العمل:

أستخدم صبغ هلام التحميل 95% الفورماميد formamide ، 20 مايكرون EDTA الرقم الهيدروجيني 8.0 ، 0.05% برموفينول الأزرق bromophenol blue ثم أستخدم مادة هلامية غير ماسخة وهي بولي أكريلاميد acrylamide لفصل الحمض النووي ، ان تغيير التشكل المقرر للـDNA والنتائج عن حدوث طفرة في التسلسل يمكن أن يسبب طفرة في الشريط المفرد للـDNA والهجرة بشكل مختلف عن السيطرة ويمكن رؤية هذه الهجرة بشكل واضح على شكل حزم Bands .

1. أضيف 10µl من PCR-product مع 10 مايكروليتر من صبغة 2X SSCP في أنبوبة الخاصة بالـPCR microfuge tube ثم خلط جيداً.

2. وضعت الأنابيب في درجة حرارة 95 C⁰ في حمام مائي ولمدة 7 دقائق ثم وضعت على الجليد لمدة حوالي 5 دقائق.

3. تحميل 10 ميكروليتر من العينات في الحفر من مادة الأكريلاميد ، اما ظروف الترحيل فهي مدونه في الجدول أدناه:

جدول (3-12) ظروف الترحيل

المادة	الكمية
Buffer	1x TBE
Constant power	30 W
Buffer temperature	10°C

3.5 hours	Run time
-----------	----------

جدول (13-3) مكونات الترحيل لتقنية SSCP-PCR

الحجم	المادة
8 ml	40% acrylamide/bis (37.5:1)
8 ml	5x TBE
2.8 ml	100% glycerol
40µl	TEMED
400 µl	10% ammonium persulfate
20.8MI	dH ₂ O

التحليل الإحصائي:

تم تحليل النتائج إحصائياً ومقارنة المتوسطات بأستعمال اختبار باتجاه واحد (A.N.O.V.A) test one way test وكذلك اختبار أقل فرق معنوي (L.S.D.) Least Significant Difference على مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ ، اختبار T-test (mean \pm SD) ومعامل الارتباط Person تبعاً الى طريقة كل من (Al-Mashhadni and Al-Mashhadni ,1989؛ الراوي وخلف الله ، 1980؛).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

RESULTS AND DISCUSSION

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

1.4. الدراسة الديموغرافية

1.1.4. دراسة المجاميع (السيطرة والمرضى) تبعاً للمتغيرات

أظهرت نتائج الدراسة الحالية على مرضى البهاق والذي تضمن دراسة المعايير المناعية التالية (Serotonin, Cortisol, SOD-1, TNF- α , IL-2) والتي تم قياسها بواسطة تقنية الأليزا وتقنية التآلق المناعي كما تم إجراء دراسة جزيئية بتقنيات مختلفة حول التغيرات الوراثية لبعض الجينات المتأثرة بمرض البهاق . بينت نتائج الدراسة الحالية تبعاً لتقسيم العمر الى فئات (29-)(39-30)(49-40)(59-50) (20) سنة وبناءً على هذا التقسيم بلغ العدد والنسبة لكل فئة 10(20%) كما هو الحال مع مجموعة السيطرة بينما بلغت قيمة مربع كاي (1.00) عند مستوى معنوية (0.00) . كما أظهرت نتائج البحث من خلال تقسيم مرضى البهاق على اساس الجنس فقد برزت النتائج كما يلي فقد بلغت نسبة الذكور لدى المرضى (84%) أما الإناث فقد بلغت نسبتها (16%) اسوةً بذلك كانت مجموعة السيطرة وظهرت قيمة Odds ratio (1) اما فترة الثقة (95%CI) فقد تراوحت بين (0.343-2.913) بينما كانت قيمة مربع كاي (0.61) عند مستوى احتمالية (0.00). كما أشارت النتائج الى وجود تأثير للتدخين قد يكون مباشر على المرض ، لذلك فقد تم تقسيم المرضى الى مجموعة المدخنين وكان عددهم والنسبة 13(26%) ومجموعة غير المدخنين 37(74%) اذ بلغت قيمة Odds ratio (1) كما تراوحت فترة الثقة (95%CI) بين (0.409-2.444) في الوقت الذي بلغت فيه قيمة مربع كاي (1.00) وبمستوى احتمالية (0.00) ، بينما بلغت نسب المرضى تبعاً لوجود التاريخ العائلي وعدم وجوده 20(40%) و30(60%) على التوالي ، بينما كانت الحالة معكوسة تبعاً الى صلة القرابة بين الوالدين للمرضى ، اما الحالة الاجتماعية فقد قسمت مجموعة المرضى الى متزوج وغير متزوج بواقع 33(66%) و17(17.0%) على التوالي وشملت نفس القيم لدى مجموعة السيطرة وظهرت قيمة Odds ratio (1) مع فترة الثقة (95%CI) التي تراوحت بين (0.437-2.288) بينما كانت قيمة مربع كاي (1.00) عند مستوى احتمالية (0.00). بينما شهدت نسب المرضى تبعاً الى موقع الإصابة كما يلي 30(60%) المنتشر في كافة أنحاء الجسم ، المصاب في الأطراف 18(36%) ، المصاب بالبطن والظهر 1(2%) والمصاب بالوجه 1(2%) واخيراً بينت النتائج نسب المرضى على أساس فترة الإصابة بالمرض والتي قسمت على

مجاميع من (1-80) شهر وقد بلغت لديها النسبة 16(32%)، من (81-160) شهر وكانت نسبتها 11(22%)، من (161-240) شهر وكانت نسبتها 6(12%)، من (241-320) شهر بلغت نسبتها 6(12%) ، من (400-321) ظهرت نسبتها 11(22%) كما في جدول (1-4).

جدول (1-4) يوضح دراسة المجاميع (السيطرة والمرضى) تبعا للمتغيرات

Sig	Chi-Square	95% CI	Odds ratio	العدد (%) للمرضى	العدد (%) للسيطرة	المتغيرات
العمر						
0.00	1.00	-	-	(20.0%)10	(20.0%)10	سنة (10-19)
				(20.0%)10	(20.0%)10	سنة (20-29)
				(20.0%)10	(20.0%)10	سنة (30-39)
				(20.0%)10	(20.0%)10	سنة (40-49)
				(20.0%)10	(20.0%)10	سنة (50-59)
الجنس						
0.00	0.61	2.913-0.343	1	(84%)42	(84%)42	ذكر
				(16%)8	(16%)8	انثى
التدخين						
0.00	1.00	2.444-0.409	1	(13.0%)13	(13.0%)13	المدخنين
				(37.0%)37	(37.0%)37	غير المدخنين
التاريخ العائلي						
-	-	-	-	-	(40.0%)20	وجود تاريخ عائلي
					(60.0%)30	عدم وجود
صلة القرابة						
					(60.0%)30	وجود صلة
					(40.0%)20	عدم وجود

الحالة الاجتماعية						
0.00	1.00	2.288-0.437	1	(34.0%)33	(66.0%)33	متزوج
				(17.0%)17	(17.0%)17	غير متزوج
موقع الاصابة						
					(60.0%)30	منتشر
					(36.0%)18	البطن والظهر
					(2.0%)1	الاطراف
					(2.0%)1	الوجه
مدة الاصابة						
					(32.0%)16	شهر (80-1)
					(22.0%)11	شهر (160-81)
					(12.0%)6	(240-161) شهر
					(12.0%)6	(320-241) شهر
					(22.0%)11	(400-321) شهر

2. 1. 4. تردد مواقع الإصابة في الجسم تبعاً للفئات العمرية لمرضى البهاق

وصفت العلاقة بين مواقع الانتشار المرض في الجسم تبعاً الى الفئات العمرية اذ قسمت الأعمار الى الفئات العمرية وهي (19-10) ، (29-20) ، (39-30) ، (49-40) و (59-50) سنة في حين قسمت مواقع الانتشار الى منتشر، الأطراف ، الظهر والبطن والوجه بلغت نسبة الإصابة بالمنتشر لدى الفئة العمرية (19-10) 10(8%) اما الفئة العمرية (29-20) فقد بلغت (2%) اما بقية الفئات (39-30)(49-40)(59-50) سنة قد بلغت (20%) (16%) (60%) على التوالي وظهر مجموع النسب لنوع المنتشر (60%). فيما وصفت العلاقة للإصابة بالأطراف تبعاً للفئات العمرية اذ بلغ مجموع نسبة الإصابة بالأطراف (36%) قسمت فيها الأعمار كما في حالة الإصابة بكافة أنحاء الجسم على النحو الآتي (19-10)(20-29)(30-39)(40-49)(50-59) اما

النسب فقد قسمت بواقع (8%) (18%) (6%) (0%) (4%) على التوالي، شمل نفس التقسيم للفئات العمرية كلاً من الأصابة بالبطن والظهر والوجه وكانت مجموع النسب للبطن والظهر والوجه 2% على التوالي، اما تقسيم النسب للأصابة بالبطن والظهر تبعاً للفئات العمرية فقد كانت على النحو الآتي (2%) (0%) (0%) (0%) (0%) اما نسب الأصابة بالوجه كما مبين في أدناه وعلى التوالي (2%) (0%) (0%) (0%) (0%) كما في جدول (2-4).

جدول (2-4) يوضح وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم وبين الفئات العمرية

المجموع	الفئات العمرية					النسبة المئوية	موقع الانتشار
	50-59	40-49	30-39	20-29	10-19		
30	8	10	7	1	4	No	منتشر
%60	%16	%20	%14	%2	%8	%	
18	2	0	3	9	4	No	الاطراف
%36	%4	%0	%6	%18	%8	%	
1	0	0	0	0	1	No	الظهر والبطن
%2	%0	%0	%0	%0	%2	%	
1	0	0	0	0	1	No	الوجه
%2	%0	%0	%0	%0	%2	%	
50	10	10	10	10	10	No	المجموع
%100	%20	%20	%20	%20	%20	%	

أظهرت النتائج المدونة في الجدول السابق وملحق رقم (1-4) وجود تأثير معنوي بين نسبة انتشار المرض في الجسم وبين التقدم في العمر للأشخاص المصابة بمرض البهاق إذ لوحظ تنوع انتشار المرض في الجسم تأثراً بتقدم العمر للعينات التجريبية المصابة بمرض البهاق، كما لوحظ تدرج في نسبة الأصابة بالمرض من نوع المنتشر في كافة أنحاء الجسم إذ ان نسبة المنتشر تزداد مع زيادة التقدم في العمر للفئات العمرية المدروسة وبلغت النسبة الأعلى لدى الفئات العمرية التي تراوحت بين (40-49) و(50-59) سنة بينما كانت أقلها لدى بقية العينات دون عمر 40 سنة ، في الوقت نفسه لوحظ ان نسب المنتشر في الأطراف تزداد ايضاً بشكل متدرج مع العمر حتى بلغت أعلى نسبة لدى الفئات العمرية التي تراوحت (50-59) بين سنة ، وقد لوحظ ان نفس النتائج أنطبقت على المنتشر في البطن والظهر والوجه إذ لوحظ ان زيادة نسب الأصابة بها وظهور المرض في تلك المناطق يزداد مع زيادة التقدم في المرض. أتفقت نتائج البحث مع Sharquie (2011) التي

كانت قد تناولت الفئات العمرية المتراوحة بين (2-56) سنة اذ بينت هذه الدراسة ان الإصابة بمرض البهاق يمكن ان تظهر في أي مرحلة عمرية وفسرت سبب ظهور الإصابة بمرض البهاق دون سن 20 سنة نتيجة لتكرار الإصابة لبعض الأطفال واليافعين ببعض الأمراض المناعية وان هذه الأمراض يمكن ان يترافق معها فقدان التصبغ في الجلد وينتهي بالإصابة بمرض البهاق لدى تلك الفئات العمرية . بينما أكدنا كل من Antoniou و Katsambas (2009) من خلال ما أظهرته نتائجهم ان مرض البهاق على الرغم من كونه يمكن ان يظهر في اي مرحلة من العمر لكنه بين ان الفئة العمرية ما دون سن 20 سنة هي الأكثر عرضة للإصابة بمرض البهاق بينما أوضحا Nunes و Esser (2011) ان أكثر فئة يمكن ان تصاب بمرض البهاق هي فوق 50 سنة وهذا ربما يتعلق بأسباب مناعية .

3.1.4. تردد مواقع الإصابة في الجسم تبعاً لنوع الجنس لمرضى البهاق

أوضحت نتائج الاختبار وكما هو موضح في جدول (3-4) على ان أشكال انتشار المرض في الجسم قد تم تصنيفها تبعاً لنوع الجنس اذ بلغ مجموع نسبة المصابين بمرض البهاق من نوع المنتشر 60% كان لدى الذكور نسبة 52% و لدى الاناث بنسبة 8% اما النوع الآخر من الإصابة وهو المنتشر في الأطراف ، فقد بلغت النسبة الكلية 36% قسمت على 30% و 6% بين ذكور و أناث على التوالي ، فيما كانت نسب الإصابات من الأشكال الأخرى هي 0% ذكور و 2% أناث للإصابة من نوع في الظهر والبطن و 2% ذكور و 0% أناث للإصابة في الوجه .

جدول(3-4) يوضح وصف للعلاقة بين موقع الإصابة في الجسم ونوع الجنس

المجموع	الجنس		العدد والنسبة	الموقع
	انثى	ذكر		
30	4	26	No	منتشر
60%	8%	52%	%	
18	3	15	No	الأطراف
36%	6.0%	30%	%	
1	1	0	No	الظهر والبطن
2%	2.0%	0%	%	
1	0	1	No	الوجه
2%	0.0%	2%	%	
50	8	42	No	المجموع
100%	16%	84%	%	

مما تقدم في جدول (3-4) وملحق (2-4) أتضح وجود علاقة طردية بين أنواع أنتشار الأصابة بمرض البهاق وبين نوع الجنس ، اذ تبين ان نسب أنتشار المرض في كافة أنحاء الجسم كانت قد تركزَ بشكل كبير بين الذكور وشكلت النسبة الأكبر من العينات الكلية للأشخاص المصابين بمرض البهاق بينما كانت أقلها نسبة لدى الاناث مقارنة بالذكور . في الوقت ذاته شكلت نسبة الاصابة بالأطراف والوجه ايضاً النسبة الأكبر لدى الذكور مقارنة بالاناث بينما كانت نسبة الأصابة بالبطن والظهر بشكل أكبر لدى الاناث مقارنة مع الذكور .

لم تتفق هذه النتائج مع نتائج Lapeere وآخرون (2008) والتي بينت ان مرض البهاق يمكن ان يصيب كلا الجنسين بالتساوي ، بينما أظهرت Sharquie (2011) أن مرض البهاق قد ظهر بنسبة أعلى لدى الاناث اذ بلغت (59.76%) وأقلها عند الذكور وبلغت النسبة (40.24%) وفسر هذا الأرتفاع في نسب الأصابة بين الاناث الى كثرة استخدام مواد التجميل قليلة الجودة والتي يمكن ان تؤثر سلباً على الجلد وتزيد من نسب الأصابة بمرض البهاق . أشار Nordlund و Majumder (1997) الى ان النساء أكثر عرضة للأصابة بمرض البهاق من الرجال على العكس من بعض الدراسات والتي بينت ان الجنس ليس له تأثير على المرض ، بينما أوضح الباحثان Nunes و Esser (2011) ان النساء تعد أكثر عرضة للأصابة بالمرض وهذا قد يتعلق باسباب فسيولوجية منها تأثير الهرمونات.

4.1.4. تردد مواقع الأصابة في الجسم تبعاً للتدخين لمرضى البهاق

أعتماًدا على تأثير التدخين على الجلد وتطور مرض البهاق آليات مختلفة ، تناولت الدراسة التدخين من خلال تقسيم المرضى الى مجموعة مدخنين وغير مدخنين وبلغ عدد المدخنين المرضى 13 مدخن بينما كان عدد المرضى غير المدخنين 37 شخص من مجموع المصابين . هذا وقسم المدخنين المرضى اعتماداً على موقع ظهور المرض في الجسم الى 7 شخص مصاب بالمرض وبنسبة 14% من النوع المنتشر في كافة أنحاء الجسم بينما بلغ عدد الاصابة في منطقة الاطراف 6 وبنسبة 12% من المدخنين اما المدخنين والمصابين في البطن والظهر والوجه فقد كان العدد والنسبة 0% لكل مجموعة . اما غير المدخنين فقد قسمت اعتماداً على مواقع الأصابة في الجسم الى ما يلي : 23 من نوع المنتشر و 12 من نوع المصاب في الأطراف بينما كان عدد ونسب الأصابة في البطن والظهر والوجه من المرضى غير المدخنين 1 لكل مجموعة كما في جدول (4-4).

جدول (4-4) يوضح وصف للعلاقة بين موقع الإصابة في الجسم والتدخين

المجموع	التدخين		النسبة	الموقع
	غير مدخن	مدخن		
30	23	7	No	منتشر
%60	%46	%14	%	الاطراف
18	12	6	No	الظهر والبطن
%36	%24	%12	%	
1	1	0	No	الوجه
%2	%2	%0	%	
1	1	0	No	المجموع
%2	%2	%0	%	
50	37	13	No	
%100	%74	%26	%	

بينت نتائج نسب المدخنين تبعا لنوع الإصابة المدونة في الجدول اعلاه وملحق (3-4) على ان اكثر نسبة للمدخنين كانت ضمن الفئة المصاب بالبهاق من النوع المنتشر وهذا دليل على التأثير السلبي للتدخين على الجلد ودوره في تطور الإصابة . وهذا يتطابق مع نتائج دراسة Delijewski وآخرون (2014) والتي تشير الى تأثير التدخين بشكل عام على الجسم ومن ضمنها تأثيره الخطير على الجلد وعلى خلايا الجلد ومنها الخلايا الميلانية اذ يعمل النيكوتين على تثبيط عملية التصبغ في الخلايا الميلانية كما يسبب تغيرات في النظام الدفاعي الذي يشمل مضادات الأكسدة اذ يسبب حدوث تغييرات كبيرة في الإنزيمات المضادة للأكسدة الخلوية مثل الكلوتاثيون و SOD-1 ، فقد فسرت النتائج التي تم الحصول عليها التأثير المحتمل للنيكوتين على العمليات الكيميائية الحيوية في الخلايا الصباغية في الجسم الحي من خلال التعرض على المدى الطويل الى جرعة النيكوتين لذلك أشارت النتائج ارتفاع مستويات الإصابة بالبهاق مقارنة مع غير المدخنين.

4. 5.1. 5. تردد مواقع الإصابة في الجسم تبعا للتاريخ العائلي لمرضى البهاق

تناولت نتائج الدراسة جمع المعلومات لمعرفة تأثير التاريخ العائلي للشخص المصاب من حيث وجود أشخاص مصابين بمرض البهاق في العائلة او لا والدور الوراثي لذلك ومدى تأثيره على نسب الإصابة وأشكال أنتشار المرض في الجسم ظهرت النتائج التالية ان مجموع نسب الاصابة بالمنتشر 60% وكانت مقسمة الى 30% يمتلك تاريخ عائلي للمرض و30% لا يمتلك ، بينما أظهر التحليل الأحصائي عن المعدل العام لنسبة الأصابة بالأطراف تراوح بين نسبة 8% لذوي التاريخ العائلي و 28% للذين لا يملكون تاريخ عائلي للأصابة بمرض البهاق ، بينما وردت نتائج الأحصاء عن ظهور نسب للأصابة بالبطن والظهر قسم بين 0% و2% يملكون ولا يملكون على التوالي، اما الوجه فقد بلغت 2% يملكون و0% لا يملكون تاريخ عائلي للمرض على التوالي كما هو ظاهر في جدول (5-4) .

جدول (5-4) يوضح وصف للعلاقة بين موقع الأصابة في الجسم والتاريخ العائلي

المجموع	التاريخ العائلي		النسبة	الموقع
	لا يوجد تاريخ عائلي	وجود تاريخ عائلي		
30 %60	15 %30	15 %30	No	منتشر
18 %36	14 %28	4 %8	No	الاطراف
1 %2	1 %2	0 %0	No	الظهر والبطن
1 %2	0 %0	1 %2	No	الوجه
50 %100	30 %60	20 %40	No	المجموع

كشفت النتائج المدونة في جدول (5-4) وملحق (4-4) عما يخص تأثير التاريخ العائلي ودوره في تحديد أنتشار المرض في الجسم للعينات المصابة فقد بينت النتائج على ان نسبة المنتشر في كافة أنحاء الجسم كانت متساوية بين الأشخاص الذين لديهم تاريخ عائلي وبين الأشخاص الذين لا يملكون وهذا يدل على عدم تأثير التاريخ العائلي على أنتشار المرض في كافة أنحاء الجسم بينما كان له تأثير على المنتشر في الأطراف اذ كان أكبر نسبة لدى أصحاب التاريخ العائلي وأقلها عند الاشخاص الذين لا يملكون كذلك هو الحال للمنتشر في الظهر والبطن بينما كان الأنتشار في الوجه أكثر نسبة بين ذوي التاريخ العائلي دون الذين لا يملكون . بينما

أكدت بعض الدراسات على أهمية التاريخ العائلي للشخص المصاب بمرض الربو وأعتبر من أهم الأسباب والعوامل في ظهور وانتشار المرض كون المرض يتوقف على عدة عوامل منها عوامل وراثية وعوامل بيئية وتعد جميع هذه العوامل من مسببات مرض الربو فقد وجد ان أعلى نسبة للمصابين بمرض الربو يمتلكون تاريخ عائلي للمرض نفسه او تاريخ عائلي لأمراض جلدية ومناعية أخرى (Lapeere *et al.*, 2008; James *et al.*, 2006). وفي دراسة سجلت فيها الولايات المتحدة نسبة عالية من مرض الغدة الدرقية المناعية إذ لوحظ ان الإصابة بهذا المرض غالباً ما ترافقت معها الإصابة بمرض الربو وتبين ان 10% من مجموع السكان يمتلكون أجسام مضادة لمستضدات الغدة الدرقية إذ لوحظ ان تلك الاجسام المضادة نفسها يمكن ان تهاجم مستضدات تظهر على الخلايا الميلانية مما يؤدي الى تحطيمها (Bellet and Prose, 2005; Daneshpazhooh *et al.*, 2006).

4. 6.1. تردد مواقع الإصابة في الجسم تبعاً لصلة القرابة بين الوالدين لمرضى الربو

أشارت نتائج البحث أحصائياً وكما هو موضح في الجدول (4-6) الى وجود اختلافات في نسب انتشار أشكال المرض تبعاً الى درجة القرابة بين الأب والأم إذ تبين ان عدد ونسبة الإصابة بشكل عام قد بلغت (30)60% وقد كانت (17)34% لدى الأشخاص المصابين الذين يمتلكون صلة قرابة بين الأب والأم من نوع المنتشر وبنسبة (12)24% من نوع المنتشر في الأطراف بينما بلغت نسبة الإصابة من نوع المصاب في منطقة الظهر والبطن (0)0% اما في الوجه فقد بلغ (1)2% اما المرضى الذين لا يمتلكون صلة قرابة فقد بلغت الأعداد والنسب حسب الانتشار من نوع المنتشر (13)26% والمنتشر في الأطراف (6)12%، البطن والظهر (1)2% واخيراً في الوجه (0)0% على التوالي .

جدول (4-6) يوضح وصف للعلاقة بين موقع الإصابة في الجسم ودرجة القرابة بين الوالدين للمرضى

المجموع	درجة القرابة بين الاب والام		النسبة المئوية	الموقع
	عدم وجود درجة قرابة	وجود درجة قرابة		
30	13	17	No	منتشر
60%	26%	34%	%	
18	6	12	No	الأطراف
36%	12%	24%	%	
1	1	0	No	الظهر والبطن
2%	2%	0%	%	
1	0	1	No	الوجه

%	%0	%2	%	
50	20	30	No	Total
%100	%40	%60	%	

بين جدول (4-6) وملحق رقم (4-5) تأثير صلة القرابة بين الوالدين على نسب أنتشار المرض في الجسم اذ كانت الزيادة في نسبة المنتشر ، الأطراف والوجه أكثرها عند الأشخاص المصابين الذين يمتلكون صلة قرابة بين الوالدين وأقلها عند الأشخاص الذين لا يمتلكون صلة قرابة بين الوالدين بينما كانت نسبة الإصابة بالبطن والظهر أكثرها نسبة عند الذين لا يمتلكون صلة قرابة دون الذين يمتلكون صلة قرابة مما يدل على وجود تأثير لدرجة القرابة على أشكال أنتشار المرض في الجسم ودوره الأكبر على ذوي صلة القرابة دون الذين لا يمدون بين الوالدين بصلة قرابة. أشارت الدراسة التي قام بها (Alzalbani, 2009) الى دور صلة القرابة بين الوالدين او ما تسمى بصلة الدم اضافة الى صلة القرابة بين الأقارب وبين المجتمعات ، اذ بين ان معدل الإصابة بمرض البهاق يزداد نسبياً لدى افراد العوائل التي تمتلك صلة قرابة بين الوالدين لذلك عُدت صلة القرابة بين الوالدين عامل خطورة يزيد من نسبة ظهور المرض وأحد أسباب شيوعه وأنتشاره خاصة لدى الجماعات المغلقة، وتبعاً الى دراسات الوراثة وأنماط التوريث نتوقع تكرار ظهور المرض بين الأشقاء للعائلة الواحدة او تكرار ظهوره بين الأشخاص الذين يعودون الى جماعة واحدة تربطها صلة دم. ان التوافق العائلي او ما يسمى بصلة القرابة أشير الى تأثيره منذ عام 1993 فقد تبين ان مرض البهاق يسيطر على ظهوره مجموعة من الجينات الجسمية تتراوح بين 4-5 جينات ، وهذه الجينات تصل الى الأبناء عن طريق الآباء الحاملة لتلك الجينات المؤثرة في حدوث المرض لذلك أشير الى الجماعات المغلقة بأنه يزداد لديها هذا المرض نتيجة لزيادة الألتقاء بين تلك الجينات بين الأبوين وزيادة توريثها وتكرارها الى الأبناء (Alkhateeb et al., 2002) .

4.1.7. تردد مواقع الإصابة في الجسم تبعاً للحالة الاجتماعية لمرضى البهاق

بينت نتائج الاحصاء المدونة في جدول (4-7) وصف العلاقة بين أشكال مرض البهاق وبين نوع الحالة الاجتماعية للشخص المصاب وجاءت هذه النتائج كما يلي ان مجموع نسب المنتشر قد بلغت بشكل عام 60% كانت أعلاها عند المتزوجين فقد بلغت 48% وأدناها عند غير المتزوجين اذ بلغت 12%، بينما كان مجموع النسب عند مصابي الأطراف 36% كانت عند المتزوجين وغير المتزوجين 18% اما مصابي البطن

والأطراف فكان مجموع الأصابة لديهم 2% قسمت ايضاً الى 0% و 2% متزوج وغير متزوج على التوالي ،
 اخيراً وردت نتائج الأحصاء عن مصابي الوجه بمجموع 2% تراوحت بين متزوج 0% و 2% غير متزوج .

جدول (7-4) يوضح وصف للعلاقة بين موقع الأصابة في الجسم والحالة الاجتماعية

المجموع	الحالة الاجتماعية		النسبة المئوية	الموقع
	اعزب	متزوج		
30	6	24	No	منتشر
%60	%12	%48	%	
18	9	9	No	الاطراف
%36	%18	%18	%	
1	1	0	No	الظهر والبطن
%2	%2	%0	%	
1	1	0	No	الوجه
%2	%2	%0	%	
50	17	33	No	Total
%100	%34	%66	%	

أظهرت نتائج جدول (7-4) وملحق (6-4) الأحصائية عن دور الحالة الزوجية للشخص المصاب وأثرها في توزيع انتشار المرض في الجسم ، وهذا يبرز دور الحالة الاجتماعية في تحديد نوع انتشار المرض وتأثيرها بشكل كبير على المتزوجين دون غير المتزوجين ، وهذا يبين ان المتزوجين هم أكثر عرضة للأصابة بمرض البهاق خاصة من النوع المنتشر وهذا يتعلق باسباب هرمونية تحدث لدى المتزوجين وخاصة لدى النساء نتيجة للفاعليات الحيوية الفسيولوجية التي تمر بها النساء من حمل وولادة وما لها من تأثيرات على الجسم من ناحية تراكم الأجهاد على الجسم مما يرد بالتأثير السلبي على الجسم مع إمكانية ظهور المرض وتطوره. توافقت هذه النتائج مع العديد من نتائج البحوث المنشورة فيما يخص تأثير المرض بالحالة الزوجية للشخص المصاب ، فقد بين كل من Delatorre وآخرون (2013) وكذلك Jorgensen وآخرون (2012) ان نسبة ظهور المرض تزداد بين النساء دون الرجال خاصة خلال فترات الحمل وما بعد الولادة وقد فسر ذلك تبعاً الى التغيرات الفسيولوجية والتبدلات الهرمونية التي تؤثر على الجهاز المناعي في الجسم التي تحصل لها خلال فترات الحمل

وما بعد الولادة وهذا يجعلها عرضة أيضاً للإصابة ببعض الأمراض المناعية الأخرى مثل الذئبة الحمراء (Erythrus lupus) والروماتيزم (Rhomatoid).

4.1.8. تردد مواقع الإصابة في الجسم تبعاً لمدة الإصابة بالمرض لمرضى البهاق

قُسمت مجموعة مرضى البهاق إلى فئات اعتماداً على مدة الإصابة بالمرض وظهرت نتائج البحث على شكل نسب اعتماداً على موقع الإصابة بالجسم فكانت على النحو التالي إذ بلغت فيها نسبة المنتشر 30 من مجموع المصابين وبنسبة 60% إذ قسمت بواقع 5 وبنسبة 10% من النوع المنتشر في أنحاء الجسم وضمن مدة الإصابة (1-80) شهر بينما ظهر عدد الإصابات 7، 4، 4، و10 وبنسب 14%، 8%، 8%، 20% ضمن المدة الزمنية من الإصابة (160-81) (240-161) (320-241) (400-321) على التوالي. وفيما يخص عدد ونسب الإصابة بالأطراف فقد ظهرت النتائج كالتالي 9، 4، 2، 2، 1 وبنسب 18%، 8%، 4%، 4%، 2% مقسمة على نفس الفئات السابقة وعلى التوالي أما الإصابة في منطقة البطن والظهر فقد كانت 1 وبنسبة 2% وظهرت ضمن المدة الزمنية (160-81) وكما هو الحال للإصابة في الوجه إذ ظهرت الإصابة بواقع 1 من مجموع المصابين وبنسبة 2% وضمن المدة الزمنية (160-81) فقط كما في جدول (4-8).

جدول (4-8) يوضح وصف للعلاقة بين موقع الإصابة في الجسم ومدة الإصابة بالمرض

المجموع	مدة الإصابة بالمرض (شهر)					النسبة المئوية	الموقع
	400-321	320-241	240-161	160-81	80-1		
30	10	4	4	7	5	No	منتشر
60%	20%	8%	8%	14%	10%	%	
18	1	2	2	4	9	No	الأطراف
36%	2%	4%	4%	8%	18%	%	
1	0	0	0	0	1	No	الظهر والبطن
2%	0%	0%	0%	0%	2%	%	
1	0	0	0	0	1	No	الوجه
2%	0%	0%	0%	0%	2%	%	
50	11	6	6	11	16	No	Total
100%	22%	12%	12%	22%	32%	%	

من خلال النتائج أعلاه وفي ملحق رقم (4-7) ظهرت هناك تباينات في نسب الإصابة تبعاً لمدة الإصابة، فمن خلال النتائج لوحظ أن الفئة الأولى قد حظيت بالنسب الأوفر وهذا يبين أن بداية الإصابة بالمرض

لها تأثير كبير على تطور المرض اذ تعد فترة الإصابة بالمرض عامل محدد وهام لتطور المرض . أتفقت بعض نتائج البحث مع ما قدمه Shahin وآخرون (2013) والذي بين أزيداد نسبة الأنتشار مع قدم الإصابة اذ بينت نتائجه ان 65% من المرضى كان من نوع المنتشر (Generalized) لدى أصحاب الإصابة القديمة بينما كانت نسبة البهاق المتقطع 35% لدى حديثي الإصابة .

2.4. الدراسة المناعية ومرض البهاق

1.2.4. الفروقات في المتوسطات لمستويات المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق بشكل عام

كشفت نتائج الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات الظاهرة في جدول (4-9) وملاحق رقم (4-7)(4-8)(4-9)(4-10)(4-11) عن وجود تباين في مستويات تلك المعايير والهرمونات في المصل لمرضى البهاق . من خلال إجراء المقارنات بين متوسطاتها وبين متوسطات عينة السيطرة تحت مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) ، فقد بلغ متوسط SOD-1 للمرضى (93.67 ± 702.65) (pg/ml) والذي ارتفعت نسبته عن مجموعة السيطرة والتي بلغ معدله لديها (65.17 ± 231.98) (pg/ml) اما TNF- α فقد ارتفع معدله هو الآخر قياساً بمجموعة السيطرة ليبلغ لدى المجموعتين (1.73 ± 13.17) ، (4.07 ± 7.34) (pg/ml) على التوالي: وقد لوحظ الأنخفاض في مستويات IL-2 قياساً بمجموعة السيطرة اذ بلغ المعدل لدى المرضى (104.59 ± 594.97) (pg/ml) ولدى السيطرة (3252.55 ± 694.77) (pg/ml) بينما ارتفع مستوى السيروتونين في مصل المرضى عن السيطرة ليبلغ لدى المرضى (0.10 ± 0.80) (ng/ml) ولدى السيطرة (0.47 ± 0.69) (ng/ml) ،بينما ارتفع مستوى الكورتيزول عن السيطرة ليبلغ لدى المجموعتين (21.17 ± 60.80) و (18.01 ± 40.77) ($\mu\text{g/ml}$) على التوالي .

جدول (4-9) يوضح متوسطات المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق

Sig	SD±Mean	العينة	المعايير المناعية
0.01	93.67 ± 702.65	مرضى	SOD-1(pg/ml)
	65.17 ± 231.98	سيطرة	
0.00	1.73 ± 13.17	مرضى	TNF- α (Pg/ml)
	4.07 ± 7.34	سيطرة	
0.07	104.59 ± 594.97	مرضى	IL-2(Pg/ml)

	3252.55 ± 694.77	سيطرة	
0.00	0.10 ± 0.80	مرضى	Serotonin(ng/ml)
	0.47 ± 0.69	سيطرة	
0.06	21.17 ± 60.80	مرضى	Cortisol(µg/dl)
	18.01 ± 40.77	سيطرة	

2.2.4. الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للعمر

أولاً- الفروقات بين متوسطات SOD-1 للفئات العمرية

سجل المعيار المناعي من نوع SOD-1 ارتفاعاً معنوياً تدريجياً وعند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) لدى الفئات العمرية لمرضى البهاق ابتداءً من الفئة العمرية الأولى التي تراوحت بين (10-19) شهر ، ليبلغ (18.15 ± 566.00) (pg/ml) ثم الفئة العمرية الثانية والتي تراوحت بين (20-29) شهر ليصل الى (25.76 ± 641.99) (pg/ml) ثم الفئة العمرية الثالثة (30-39) شهر التي بلغ لديها (22.25 ± 744.54) (pg/ml) ثم الرابعة (40-49) (11.04 ± 749.74) (pg/ml) ليبلغ لدى الفئة العمرية الخامسة (4 ± 62.15) (pg/ml) مقارنة مع مجاميع السيطرة من نفس الفئات العمرية كما في جدول (4-10).

جدول (4-10) يوضح متوسطات SOD-1 تبعاً للفئات العمرية

SOD-1(pg/ml)			الفئات العمرية
sig	SD±Mean	العينة	
0.00	18.15 ± 566.00	مرضى	الفئة (10-19) سنة
	6.81 ± 154.91	سيطرة	
0.00	25.76 ± 641.99	مرضى	الفئة (20-29) سنة
	7.15 ± 191.81	سيطرة	
0.00	22.25 ± 744.54	مرضى	الفئة (30-39) سنة
	11.90 ± 212.70	سيطرة	
0.00	11.04 ± 749.74	مرضى	الفئة (40-49) سنة
	12.27 ± 263.16	سيطرة	
0.00	62.15 ± 810.99	مرضى	الفئة (50-59) سنة

22.75 ± 337.32

سيطرة

ثانياً- الفروقات بين متوسطات TNF- α للفئات العمرية

كما لوحظ ارتفاع معدلات المعيار المناعي من نوع TNF- α ايضاً لدى جميع الفئات المدروسة لمرضى البهاق وعند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) فقد بلغ لدى الفئة العمرية الأولى (10-19) شهر (0.32 ± 8.47) ثم الفئة العمرية الثانية (20-29) شهر ليصل الى (0.61 ± 10.08) (pg/ml) ثم الفئة العمرية الثالثة (30-39) شهر التي بلغ لديها (1.34 ± 12.32) (pg/ml) ثم الرابعة (40-49) (0.24 ± 15.41) (pg/ml) وأخيراً بلغ لدى الفئة العمرية الخامسة (50-59) (0.59 ± 19.58) (pg/ml) مقارنة مع مجاميع السيطرة من نفس تلك الفئات العمرية كما في جدول (4-11).

جدول (4-11) يوضح متوسطات TNF- α تبعاً للفئات العمرية

TNF- α (Pg/ml)			الفئات العمرية
sig	SD±Mean	العينة	
0.00	0.32 ± 8.47	مرضى	الفئة (10-19) سنة
	0.33 ± 4.91	سيطرة	
0.00	0.61 ± 10.08	مرضى	الفئة (20-29) سنة
	0.30 ± 6.31	سيطرة	
0.00	1.34 ± 12.32	مرضى	الفئة (30-39) سنة
	0.26 ± 7.45	سيطرة	
0.00	0.24 ± 15.41	مرضى	الفئة (40-49) سنة
	0.20 ± 8.28	سيطرة	
0.00	0.59 ± 19.58	مرضى	الفئة (50-59) سنة
	0.87 ± 9.77	سيطرة	

ثالثاً- الفروقات بين متوسطات IL-2 للفئات العمرية

لوحظ ايضاً من خلال ما أظهرته النتائج في جدول (4-12) ارتفاعاً متدرج ابتداءً من الفئة العمرية الأولى (10-19) شهر ليبلغ (15.25 ± 440.86) (pg/ml) مقارنة بمجموعة السيطرة التي كان لديها (3.00 ± 156.53) (pg/ml) وسجل أعلا ارتفاع في متوسطاته لدى الفئة العمرية الخامسة

(59-50) (34.48 ± 744.82) (pg/ml) مقارنة بمتوسط مجموعة السيطرة البالغ لديها (158.19 ± 314.06) (pg/ml) اما بقية الفئات فقد كان متوسط الأرتفاع لدى الفئة العمرية الثانية (34.14 ± 546.15) (pg/ml) والثالثة (5.91 ± 597.35) (pg/ml) والرابعة (9.61 ± 645.66) (pg/ml) (49-40) وعند مستوى احتمالية (P≤0.05) .

جدول (4-12) يوضح متوسطات IL-2 تبعاً للفئات العمرية

IL-2(Pg/ml)			الفئات العمرية
sig	SD±Mean	العينة	
0.00	15.25 ± 440.86	مرضى	الفئة (19-10) سنة
	3.00 ± 156.53	سيطرة	
0.00	34.14 ± 546.15	مرضى	الفئة (29-20) سنة
	7.71 ± 214.99	سيطرة	
0.41	5.91 ± 597.35	مرضى	الفئة (39-30) سنة
	7271.01 ± 2532.34	سيطرة	
0.00	9.61 ± 645.66	مرضى	الفئة (49-40) سنة
	1.07 ± 255.95	سيطرة	
0.00	34.48 ± 744.82	مرضى	الفئة (59-50) سنة
	158.19 ± 314.06	سيطرة	

رابعاً- الفروقات بين متوسطات Serotonin للفئات العمرية

سجلت الدراسة الحالية أختلافات في متوسطات السيروتونين تبعاً للفئات العمرية المدروسة فقد ظهرت مستوياته منخفضة لدى الفئة العمرية الأولى (19-10) شهر ليلغ (0.06 ± 0.17) (ng/ml) مقارنة بمجموعة السيطرة من نفس الفئة العمرية التي كان قد بلغ لديها (0.01 ± 0.53) (ng/ml) كذلك شهد انخفاض لدى الفئة العمرية الثانية التي تراوحت بين (29-20) ليلغ (0.06 ± 0.51) (ng/ml) مقارنة بمجموعة السيطرة (0.01 ± 0.63) بينما لوحظ ارتفاع مستويات السيروتونين تدريجياً ابتداءً من الفئة العمرية الثالثة (39-30) ليلغ

(0.01 ± 0.88) (ng/ml) ثم الفئة العمرية الرابعة (40-49) ليصل الى (0.04 ± 0.97) (ng/ml) وأخيراً (0.35 ± 1.47) (ng/ml) وعند مستوى احتمالية (P≤0.05) كما في جدول (4-13).

جدول (4-13) يوضح متوسطات Serotonin تبعاً للفئات العمرية

Serotonin(ng/ml)			الفئات العمرية
Sig	SD±Mean	العينة	
0.00	0.06 ± 0.17	مرضى	الفئة (10-19) سنة
	0.01 ± 0.53	سيطرة	
0.00	0.06 ± 0.51	مرضى	الفئة (20-29) سنة
	0.01 ± 0.63	سيطرة	
0.00	0.01 ± 0.88	مرضى	الفئة (30-39) سنة
	0.02 ± 0.69	سيطرة	
0.00	0.04 ± 0.97	مرضى	الفئة (40-49) سنة
	0.01 ± 0.75	سيطرة	
0.00	0.35 ± 1.47	مرضى	الفئة (50-59) سنة
	0.07 ± 0.82	سيطرة	

خامساً- الفروقات بين متوسطات Cortisol للفئات العمرية

كما سجلت النتائج الدراسية انخفاض في متوسطات الكورتيزول للفئة العمرية الأولى (10-19) شهر ليبلغ (6.75 ± 30.32) (µg/dl) دون مجموعة السيطرة البالغ لديها (17.03 ± 65.56) (µg/dl) بينما بدأ الأرتفاع من الفئة العمرية الثانية (20-29) ليبلغ لديها (1.54 ± 57.79) (µg/dl) وكذلك الفئة العمرية الثالثة (30-39) (12.74 ± 59.24) (µg/dl) والرابعة (40-49) (1.37 ± 84.57) (µg/dl) وأخيراً الفئة العمرية

الخامسة (59-50) (20.36 ± 72.08) ($\mu\text{g/dl}$) بشكل معنوي وعند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) مقارنة مع مجاميع السيطرة من نفس الفئات كما في جدول (4-14).

جدول (4-14) يوضح متوسطات Cortisol تبعاً للفئات العمرية

Cortisol($\mu\text{g/dl}$)			الفئات العمرية
Sig	SD \pm Mean	العينة	
0.00	6.75 \pm 30.32	مرضى	الفئة (19-10) سنة
	17.03 \pm 65.56	سيطرة	
0.00	1.54 \pm 57.79	مرضى	الفئة (29-20) سنة
	2.01 \pm 40.69	سيطرة	
0.00	12.74 \pm 59.24	مرضى	الفئة (39-30) سنة
	1.87 \pm 32.92	سيطرة	
0.00	1.37 \pm 84.57	مرضى	الفئة (49-40) سنة
	6.97 \pm 47.29	سيطرة	
0.00	20.36 \pm 72.08	مرضى	الفئة (59-50) سنة
	3.78 \pm 17.38	سيطرة	

تم اختبار الفروقات بين المجاميع تحت مستوى دلالة ($p \leq 0.05$) لجميع المعايير وقد بينت النتائج ان الفروقات في مستويات المعايير كانت دالة احصائيا بين جميع الفئات العمرية وهذا يدل مدى تأثير كل من مرض البهاق والعمر على تلك المعايير المناعية على حدا سواء في ظهور تلك الفروقات المعنوية الدالة احصائيا اذ اخذت متوسطات المعايير المناعية بالأرتفاع بشكل معنوي ملحوظ بزيادة التقدم بالعمر مما يبرهن دور العمر

في تقدم الاصابة وزيادة ظهورها في الجسم بزيادة مستويات تلك المعايير المناعية وتأثيرها السلبي والواضح على الجسم وزيادة تحطيمها للخلايا الميلانية في الجسم وهنا يعد دور تقدم العمر كعامل محفز لظهور المرض إذ ان ارتفاع تلك المستويات دليل على التأثير السلبي للجهاز المناعي ضد الخلايا الميلانية بأعتبار ان مرض البهاق هو أحد الأمراض المناعية الذاتية الناتجة من التأثير السلبي للجهاز المناعي ضد الجلد.

كشفت العديد من الدراسات الدور الهام للعمر وتأثيره الواضح على ظهور وتطور مرض البهاق فمن خلال ما أبدته نتائج البحث والتي توافقت مع الكثير من الدراسات اذ ان تأثير العمر يكون بشقين : في حالة ظهور المرض على شكل بقع في اي مرحلة عمرية فأن تأثير العمر يبدو واضحا من خلال زيادة تطور وانتشار المرض الى مناطق أخرى من الجسم خلال التقدم في العمر أما التأثير الآخر للعمر يبدو من خلال الفئات العمرية الأكثر عرضة للأصابة بالمرض اذ أكد Hann وآخرون (2000) على ان أكثر الفئات العمرية المعرضة لظهور مرض البهاق هم صغار السن (Childs) مادون سن 20 سنة ، اما Mattoo وآخرون (2002) فقد أشار الى ان الصغار أضافة الى كبار السن elder في سن 50 سنة هم الأكثر عرضة للأصابة بالمرض . اما (Hann and Lee,1996) فقد أشار الى انه على أساس العمر يمكن تصنيف المرض الى (Generalized) وهو النوع الأنتشاري بشكل عام ويتصف بكونه ينتشر بصورة متدرجة اعتماداً على التقدم بالعمر اما النوع الثاني وهو (Segmental) وهذا النوع يتصف بكونه يحتاج الى وقت قصير لأنتشاره كونه سرعان ما ينتشر ثم يأخذ بالثبات في مراحل متقدمة . اما Kemp وآخرون (2007) فقد ذكر ان مرض البهاق يمكن ان يظهر في اي مرحلة عمرية لكنه يمتلك الميل للظهور بشكل كبير في مراحل متقدمة مع العمر اذ يزداد ظهوره مع فقدان التصبغ بزيادة التقدم في السن .

لقد أكدت العديد من الدراسات على دور وأهمية فرضية الاجهاد التأكسدي ودورها في امراضية البهاق بتأثير العمر فقد أشار (Bleehen, 1968) ان تحطم الخلايا الميلانية ناتج من فعالية الجذور الحرة (Free radicals) ومركبات الفينول السامة (Exogenic phenol) . اما (Riley,1970) فقد بين زيادة أنتاج مركبات الفينول بكميات كبيرة كما بين تتراكم نفس تلك المركبات السمية في الادمة في الاشخاص الذين لديهم ميل او استعداد وراثي للأصابة بمرض البهاق مقارنة بالأصحاء وبالتالي فهي يسبب تلف وتحطم في الخلايا الميلانية فضلا عن ان الخلايا الميلانية تمتاز بقدرتها الواهية على اصلاح وتمايز ذاتها لدى هؤلاء الاشخاص مما يؤدي الى فقدان التصبغ بصورة تدريجية من الجلد. في حين أشار (Lerner,1971) بأن الخلايا الميلانية في الجلد تمتلك آليات حماية قادرة على إزالة المركبات السمية المتولدة خلال عملية أنتاج صبغة الميلانين وقد

لوحظ توقف او حدوث ضرر في تلك الآليات لدى الاشخاص الذين لديهم ميل للأصابة بمرض البهاق وكذلك لدى الاشخاص الذين ظهر لديهم المرض وهذا يعد احد اسباب فقدان التصبغ في الجلد .

برهنت بعض الدراسات التي قام بها بعض الباحثين على ان زيادة تراكم الجذور الحرة مثل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في خلايا البشرة يؤدي الى حدوث تبدلات في أنماط مضادات الاكسدة ، اذ لوحظ ارتفاع تراكيز مضاد الأكسدة من نوع SOD-1 في المصل إضافة الى ارتفاع مستوياته في خلايا أخرى كما في الخلايا الميلانية وكريات الدم الحمراء يرافق هذا الارتفاع انخفاض في تراكيز انزيم الكاتاليز CAT عن مستوياته الطبيعية في المصل والجلد وخلايا الدم المحيطة مقارنة مع مجموعة الاصحاء غير المصابين بمرض البهاق هذا الاكتشاف يدعم مفهوم نظام مضادات الأكسدة ودوره في حدوث أمراض البهاق وظهوره في الجسم *et al.* (Hazneci, 2005). بينما بين Kovacs (1998) ان الأجهاد يبدأ بمسار المرض من خلال عملية تحطيم الخلايا الميلانية بينما فسّر Koca وآخرون (2004) الى ان عملية التحطيم تبدأ بتوليد الجذور الحرة في الخلايا الميلانية ومن هذه الجذور الحرة وهي O_2^- (Superoxide) واوكسيد النتریک (Nitric oxide) تتولد هذه الجزيئات عبر سلسلة من المسارات الفسيولوجية والمرضية وتطرح هذه المواد باستمرار عن طريق انزيمات مضادات الأكسدة مثل SOD-1 ، CAT ، (Glutathion) وفيتامين A وعناصر أخرى ففي حالة الأجهاد التأكسدي هناك قلة في إنتاج تلك الإنزيمات المضادة للأكسدة يصاحبها زيادة تراكم الجذور الحرة فتؤدي الى حدوث ضرر في المكونات الخلوية مثل البروتينات والكربوهيدرات والدهون وDNA. ان التغيرات التي تحصل خلال العمر تساهم مع العوامل المحيطة سواء مايتولد بصورة طبيعية داخل الجسم او نتيجة الأصابة بالأمراض والأصابات الخارجية على تزايد مستوى الأجهاد على الجسم (Harman,1993) اذ تم التوصل الى وجود علاقة بين العمر ومستويات الاجهاد (Sohal *et al.*, 1993) اذ أوجدت الدراسات النسجية والمصلية تزايد إنتاج المواد المؤكسدة في الجسم بزيادة العمر يقابلها إنتاج العديد من الإنزيمات التي تساهم في إزالة تلك المواد المؤكسدة السامة ومن تلك الإنزيمات هي إنزيم SOD-1 وإنزيم CAT ، اذ لوحظ استمرار ارتفاع مستويات إنزيم SOD-1 مع العمر للأشخاص المصابين بمرض البهاق نتيجة لاستمرار إنتاج تلك المركبات السامة في المناطق المصابة من الجسم (Vertechy *et al.*, 1993) .

كشفت الدراسة التي قام بها Eser وآخرون (1998) انه في الحالات الطبيعية يقوم إنزيم SOD-1 بتحويل O_2^- (Superoxide) الى بيروكسيد الهيدروجين واوكسجين بينما يقوم انزيم CAT بتحويل H_2O_2 الى اوكسجين O_2 وماء H_2O اما في حالة مرضى البهاق فهناك زيادة في إنتاج وتراكم بيروكسيد الهيدروجين

والنتائج من زيادة مستويات SOD-1 و يترافق ذلك في انخفاض مستويات الكلوتاثيون ونتيجة لذلك ينخفض تحويل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء و اوكسجين الامر الذي يؤدي الى زيادة تراكم بيروكسيد الهيدروجين في الخلايا الميلانية مع قصور أزالتها من قبل الإنزيمات المؤكسدة فتؤدي الى تضرر الخلايا الميلانية وتحطمتها .

وهناك دراسة جاءت لتبين ان الجذور الحرة يمكن ان تتولد بطريقة أخرى ، اما عن طريق حدوث خلل في الدهون الغشائية للمايتوكوندريا في الخلايا الميلانية او عن طريق انخفاض مسويات انزيم (Methionin superoxide reductase) الذي له دور كبير في لفظ الجذور الحرة من الخلايا بما فيها الخلايا الميلانية اذ تبين زيادة أنتاج وتراكم الجذور الحرة يزيد من فعالية عامل كاييا النووي nuclear KB وهذا العامل ومن تلك الجينات هي $TNF-\alpha$ gen و $IL-2$ gen والتي تزيد من أنتاج $TNF-\alpha$ و $IL-2$ (Sliverberg, 2010) . اما فيمايرتبط بعلاقة عامل التنخر الورمي والعمر لمرضى البهاق فقد كشفت الدراسات المناعية المختبرية *in vitro* التي قام بها (Jain *et al.*, 2011) على انه تزداد تراكيز عامل التنخر الورمي بشكل ملحوظ للأشخاص المصابين بمرض البهاق اذ يعمل عامل التنخر الورمي $TNF-\alpha$ على تحفيز الموت المبرمج للخلايا الميلانية فينتج عنه فقدان التصبغ من الجلد بتقدم العمر ، وهذا المسار يكون بتحفيز الاجهاد وهذا يدل على الترابط بين الاجهاد وبين المناعة الذاتية والتي تتوسط فقدان الصبغة بتقدم العمر .

لاحظ Moretti وآخرون (2002) ارتفاع مستويات $TNF-\alpha$ في المصل والجلد المصاب بالبهاق مقارنة بالأصحاء وذلك عن طريق فعالية $TNF-\alpha$ على الخلايا الميلانية من خلال ما يقوم به $TNF-\alpha$ بتحفيز $IL-1\alpha$ وهذا بدوره يرفع عملية نضج وتمايز الخلايا البائية وتعمل الأخيرة على أنتاج وإطلاق الغلوبولينات المناعية الى المصل والجلد في المناطق المصابة او من خلال تحفيز مستقبلات موجودة على أسطح الخلايا الميلانية وتستجيب هذه بدورها لهذا التحفيز فتعمل على ربط الخلايا للمفاوية بالخلايا الميلانية كما ان وجود نفس المستقبلات يحفز الاجسام المضادة على زيادة الانطلاق من الخلايا البائية والارتباط مع تلك المستقبلات على اسطح الخلايا الميلانية وبالتالي تتحطم تلك الخلايا وتسبب ظهور مرض البهاق كما انه يعمل على تثبيط عملية توليد صبغة الميلانين عن طريق تثبيط إنزيم (Tyrosinase) والبروتينات المتعلقة به .

كما برهن Yeo وآخرون (1999) زيادة مستويات الحركي الخلوي الثاني $IL-2$ الذائب في المصل لدى الأشخاص المصابين بمرض البهاق مقارنة مع مجموعة السيطرة ، اذ اوجد ان مستوياته ترتفع مع زيادة التقدم في عمر المريض ومع قدم الإصابة بالمرض اذ لاحظ ان مستويات تزداد لدى كبار السن بشكل ملحوظ

وأوضح Tue وآخرون (1999) على ان هذه الزيادة لها دور كبير في تحفيز الخلايا التائية T-cells والتي تعد كمبرك مناعي مهم ولها دور أهم في تقدم الأصابة بمرض البهاق من خلال زيادة تحطيم الخلايا الميلانية .

على الرغم من ان صبغة الميلانين تعمل على حماية الجلد من تأثير الاشعة فوق البنفسجية لكن الأفرط او الأقلال في إنتاجها يسبب العديد من الاضطرابات والأمراض والصبغية للجلد فقد اكدت بعض الدراسات المختبرية الى دور السيروتونين في الجلد وتأثيره الكبير على مرض البهاق اذ ان السيروتونين يعد كنظام أصلاح للخلايا الصبغية في الجلد فعلى الرغم من انه ينتج في مناطق مختلفة في الجسم وبطرق وآليات مختلفة فقد أثبت انه ينتج موضعياً في الجلد ويزداد في حالة الاضطرابات الجلدية مثل الأصابة بسرطان الجلد والأصابة بمرض البهاق والأكزيما وحساسية الجلد وبعض الألتهابات الأخرى ولوحظ أزياد مستوياته بزيادة العمر وبتقدم الأصابة كونه يعمل على أصلاح المناطق المتضررة اذ وجد انه يمتلك مستقبلات خاصة به تقع على أسطح الخلايا الجلدية ومنها الخلايا الميلانية (Oh *et al.*, 2016).

كما أشارت الدراسات المختبرية الى ان السيروتونين ينتج بصورة موضعية في جلد الإنسان وبعض اللبائن اذ تمكنه المستقبلات التي يمتلكها على أسطح الخلايا الصبغية والخلايا الكيراتينية والأرومات الليفية من ممارسة فعاليته في الجلد اذ يؤدي السيروتونين العديد من الوظائف في الجلد منها تقلص الاوعية الدموية ، الحماية من الأجهاد ويعد كعامل مضاد للألتهابات الأولية (Anti-proinflammatory) كما انه يعد البادرة لبناء الميلاتونين (Melatonin) والذي بدوره ينظم عملية أنتاج صبغة الميلانين (Melanogenesis) في الجلد (Kim *et al.*, 2015). فسر Aune وجماعته (1994) أرتفاع مستويات السيروتونين وتنشيط مستقبلاته فضلا عن أرتفاع IL-2 و TNF- α كون السيروتونين يمتلك مستقبلات تسمى 5-hydroxytryptamine-1A receptor (5HT1A) تقع على الخلايا المناعية مثل الخلايا اللمفاوية فقد وجد أثناء الأصابة بمرض البهاق تنشيط تلك المستقبلات ويزداد مستوى السيروتونين وهذا بدوره ينشط الخلايا اللمفاوية على أطلاق IL-2 و TNF- α على زيادة مستوياته كما بينت الدراسات المختبرية ان تثبيط السيروتونين يؤدي الى تثبيط الحركي الخلوي الثاني وعامل التنخر الورمي من الأنتلاق .

وفيما يخص مستويات هرمون الكورتيزول فقد أتفقت النتائج مع (Leykon and Vays, 2000) اذ لوحظ أرتفاع مستويات هرمون الكورتيزول في مصل مرضى البهاق مقارنة بمجموعة السيطرة . وفسر Hwang وآخرون (1999) هذه الزيادة من خلال فعالية الكورتيزول في زيادة الترابط بين الخلوي وذلك من

خلال زيادة مستويات جزيئات الألتصاق بين الخلايا التي توجد على اسطح الخلايا الجلدية ولوحظ زياد مستويات وفعالية هذه الجزيئات كنتيجة لزيادة مستويات هرمون الكورتيزول ومن هذه الجزيئات الخلوية هي (ICAM-1,CD54). ان تحفيز هذه الجزيئات يعمل على كبح الاستجابة الألتهابية ونشاط مكونات الجهاز المناعي اضافة الى زيادة ترابط الخلايا الجلدية ومنها الخلايا الميلانية ومنع فقدانها عن طريق الموت الخلوي المبرمج .

هناك تأثير سلبي للعمر على الجلد بحد ذاته من خلال فقدان المرونة للجلد وظهور الخطوط وكثرة التجاعيد فيه و يترافق مع التقدم بالعمر الاصابة بمرض البهاق ينعكس ذلك التأثير على خلايا الجلد ومنها الخلايا الميلانية كبح لبعض مكونات الجهاز المناعي التي تضمن الحفاظ على الحماية (Tolerance) ضد مكونات مناعية اخرى مع تراكم الجذور الحرة داخل خلايا الجسم (Chen and Lyga, 2014)

3.2.4. الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للجنس

كشفت النتائج الموضحة في جدول (4-15) لدراسة تأثير نوع الجنس gander على المعايير المناعية قيد الدراسة . وهنا تناولت التحاليل الاحصائية دراسة ذكور المرضى مع مقارنتها مع ذكور مجموعة السيطرة اذ ظهر أن (90.23±706.51) (pg/ml) يمثل معدل المعيار المناعي SOD-1 لدى 42 شخص مصاب بمرض البهاق بينما مثل المعدل (60.66±231.62) SOD-1(pg/ml) عند ذكور مجموعة السيطرة ، اذ ظهرت هناك فروقات دالة احصائية للمجموعتين عند مقارنتها مع مستوى الاحتمالية (P≤0.05) ، بينما بلغ معدل TNF-α (3.80±13.19) (pg/ml) لدى ذكور العينة التجريبية اما ذكور مجموعة السيطرة فقد بلغ لديها معدل TNF-α (1.61±7.37) (pg/ml) اذ ظهرت هناك فروق معنوية دالة احصائيا (P≤0.05) بين المجموعتين ، أما في حالة IL-2 فقد أنخفضت معدلاته (97.14±596.53) (pg/ml) عند ذكور المرضى عن مجموعة السيطرة فقد بلغ (3548.02±786.96) (pg/ml) اما السيروتونين فقد بلغت قيمة معدلته (0.43±0.81) (ng/ml) عند الذكور المرضى مقارنة مع السيطرة والتي بلغت قيمته (0.10 ± 0.69)

(ng/ml) بينما كانت قيمة الكورتيزول (20.88 ± 62.75) ($\mu\text{g/ml}$) لدى المرضى و(15.69 ± 39.72) ($\mu\text{g/ml}$) لدى الأصحاء.

جدول (4-15) يوضح متوسطات المعايير المناعية والهرمونات لدى ذكور مرضى البهاق والسيطرة

Sig	SD±Mean	العينة	
0.00	90.23 ± 706.51	مرضى	SOD-1(pg/ml)
	60.66 ± 231.62	سيطرة	
0.00	3.80 ± 13.19	مرضى	TNF-α(Pg/ml)
	1.61 ± 7.37	سيطرة	
0.73	97.14 ± 596.52	مرضى	IL-2(Pg/ml)
	3548.02 ± 786.96	سيطرة	
0.09	0.43 ± 0.81	مرضى	Serotonin(ng/ml)
	0.10 ± 0.69	سيطرة	
0.00	20.88 ± 62.75	مرضى	Cortisol($\mu\text{g/dl}$)
	15.69 ± 39.72	سيطرة	

أجرت الدراسة مقارنة بين أنثى مرضى البهاق وبين أنثى مجموعة السيطرة والتي بلغت 8 أشخاص من مجموع المرضى إذ أظهرت نتائج المقارنة ارتفاع معنوي في كافة المعايير المناعية والهرمونات عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) إذ بلغ متوسط SOD-1 لأنثى مرضى البهاق (114.74 ± 682.42) (pg/ml) بينما كان معدل (90.39 ± 233.87) (pg/ml) لدى مجموعة السيطرة كما أتضح من النتائج الإحصائية وجود فروق معنوية دالة إحصائياً للمعيار المناعي TNF-α عند مقارنة معدلات أنثى المجموعة التجريبية والتي بلغت (5.56 ± 13.09) (pg/ml) مع أنثى مجموعة السيطرة إذ كانت معدلاتها (2.42 ± 7.23) (pg/ml) وبلغ مستوى المعنوية (0.016) ، كما أوضحت نتائج الاختبار وجود فروق معنوية دالة إحصائياً للمعيار المناعي الثالث IL-2 عند المقارنة بين أنثى المجموعة التجريبية ومجموعة السيطرة ، إذ بلغت المعدلات (145.69 ± 586.78) (pg/ml) ، (49.45 ± 210.77) (pg/ml) على التوالي أما معدل السيروتونين لدى الأنثى فقد بلغ (0.65 ± 0.75) (ng/ml) مقارنة بالسيطرة (0.13 ± 0.66) (ng/ml) فيما بلغ الكورتيزول (21.01 ± 50.54) ($\mu\text{g/ml}$) لدى المرضى مقارنة بالسيطرة (28.08 ± 46.29) ($\mu\text{g/ml}$) كما في جدول (4-16).

جدول (4-16) يوضح متوسطات المعايير المناعية والهرمونات لدى اناث مرضى البهاق والسيطرة

Sig	SD±Mean	العينة	
0.00	114.74 ± 682.42	مرضى	SOD-1(pg/ml)
	90.39 ± 233.87	سيطرة	
0.016	5.56 ± 13.09	مرضى	TNF-α(Pg/ml)
	2.42 ± 7.23	سيطرة	
0.00	145.69 ± 586.78	مرضى	IL-2(Pg/ml)
	49.45 ± 210.77	سيطرة	
0.72	0.65 ± 0.75	مرضى	Serotonin(ng/ml)
	0.13 ± 0.66	سيطرة	
0.74	21.01 ± 50.54	مرضى	Cortisol(μg/dl)
	28.08 ± 46.29	سيطرة	

من خلال النتائج أعلاه يلاحظ ان جميع المتغيرات قد ارتفعت مستوياتها عن مستويات الأصحاء وفي الوقت نفسه كانت مستويات المتغيرات لدى الذكور أكثر من مستوياتها لدى الأناث وهذا قد يكون متعلق بالعينة نفسها كون عينة الذكور التي تم الحصول عليها أكثر من الأناث أو قد يعزى الى الفروق بين الجنسين من الناحية الفسيولوجية .

بينت الكثير من الدراسات الى ان نسبة الإصابة بين الذكور والاناث متساوية وليس للجنس تأثير معنوي على حصول المرض وتطوره (Bilal and Anwar, 2014). اتفقت هذه النتائج مع النتائج التي قدمها كل من (Narit et al ., 2011; Babar et al., 2013) بينما عزي Sabek وآخرون (2015) كثرة الإصابة لدى النساء والرجال على حد سواء نتيجة لدور الهرمونات الجنسية وهي (Estrogen) و (Progesteron) و (Testosteron) وتأثيرها على تطور المرض ونشوءه من خلال وجود مستقبلات خاصة بها تقع على الخلايا الميلانية ترتبط الهرمونات الجنسية بهذه المستقبلات فتعمل على تحطيم الخلايا الميلانية ، بينما أشارت بعض الدراسات ان المرض ينتشر بين الأناث دون الذكور لأسباب تتعلق بالحمل والولادة بالنسبة الى الأناث (Delatorre et al., 2013) بينما بين البعض الآخر كثرة الإصابة بمرض البهاق لدى الأناث دون الذكور ناجمة عن كثرة استخدام مواد التجميل والتي قد تكون رديئة المنشأ (Sharquie, 2011) بينما فسّر Poojary (2011) من خلال نتائجه الى ان انتشار المرض لدى الذكور دون الأناث قد يعود الى أسباب متعلقة بالتدخين اذ ان الذكور يعدون أكثر تدخيناً من النساء. لم تتفق هذه النتائج مع (Shahin et al., 2013) الذي بين

ارتفاع مستويات السيروتونين لدى النساء أكثر من الذكور بينما أشار Flegr وآخرون (2012) من ارتفاع مستويات الكورتيزول ناتج عن تأثيره بالهرمونات الجنسية وقد أشار الى ان الأناث أكثر ارتفاعاً من مستوياته في الذكور . بينما أشار Larsson وآخرون (2009) ان هذا الارتفاع لدى النساء قد يكون متعلق بأسباب فسيولوجية ومنها السمنة وليس له علاقة بالمرض اذ يزداد نشاط هذا الهرمون نتيجة لزيادة عمليات الأيض.

4.2.4. الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للتدخين

تناول البحث دراسة تأثير التدخين ودوره السلبي على مرض البهاق فقد قُسمت عينات المرضى بين مدخنين وغير المدخنين فقد بلغ عدد المدخنين 23 بينما بلغ عدد غير المدخنين 13 شخص بلغ معدل SOD-1 (pg/ml) (71.06 ± 725.06) لدى مجموعة المرضى اذ ارتفعت القيمة مقارنة مع مجموعة السيطرة (pg/ml) (51.58 ± 225.57) كما ارتفع معدل TNF- α عن قيم مجموعة السيطرة اذ بلغت على التوالي (pg/ml) (3.09 ± 12.75) ، بينما شهد معدل IL-2 انخفاضاً معنوياً في مستوياته (pg/ml) (70.64 ± 611.58) مقارنة مع مجموعة السيطرة (pg/ml) (379.18 ± 199.15) ، اما السيروتونين والكورتيزول فقد ارتفعت مستوياتهما (ng/ml) (16.51 ± 64.27) ($\mu\text{g/ml}$) (0.37 ± 0.88) على التوالي مقارنة بمجموعة الأصحاء والتي بلغت لديها تلك المعدلات ($\mu\text{g/ml}$) (0.08 ± 0.68) ($\mu\text{g/ml}$) (16.19 ± 44.27) على التوالي كما في جدول (4-17).

جدول (4-17) يوضح متوسطات المعايير المناعية والهرمونات لدى المدخنين لمرضى البهاق والسيطرة

Sig	SD±Mean	العينة	
0.00	71.06±725.06	مرضى	SOD-1(pg/ml)
	51.58±225.57	سيطرة	
0.00	3.09±12.75	مرضى	TNF- α (Pg/ml)
	1.42±7.25	سيطرة	
0.44	70.64±611.58	مرضى	IL-2(Pg/ml)
	379.18±199.15	سيطرة	
0.07	0.37±0.88	مرضى	Serotonin(ng/ml)
	0.08±0.68	سيطرة	
0.01	16.51±64.27	مرضى	Cortisol($\mu\text{g/dl}$)
	16.19±44.27	سيطرة	

غير المدخنين

بينت النتائج الظاهرة في جدول (4-18) ان قيم المعايير المناعية والسيروتونين والكورتيزول قد أرتفعت بشكل معنوي لدى مرضى البهاق لمجموعة غير المدخنين اذ بلغت مستويات SOD-1 لدى المرضى الغير مدخنين (100.07 ± 694.78) (pg/ml) وبلغت لدى السيطرة (69.81 ± 234.23) (pg/ml) بينما بلغ معدل TNF- α لدى المرضى غير المدخنين (4.38 ± 13.32) (pg/ml) بينما بلغ معدله لدى الأصحاء 1.85 ± 7.37 (pg/ml) اما معدلات IL-2 والسيروتونين والكورتيزول فقد بلغت لدى مجموعة المرضى (114.43 ± 589.13) (pg/ml) (0.50 ± 0.77) (ng/ml) (59.58 ± 59.58) (μ g/ml) على التوالي مقارنة بمجموعة السيطرة والتي بلغت لديها معدلات تلك المعايير (97.46 ± 237.88) (pg/ml)، (0.11 ± 0.69) (ng/ml)، (18.66 ± 39.53) (μ g/ml) على التوالي .

جدول (4-18) يوضح متوسطات المعايير المناعية والهرمونات لدى غير المدخنين لمرضى البهاق والسيطرة

Sig	SD \pm Mean	العينة	
0.00	100.07 \pm 694.78	مرضى	SOD-1(pg/ml)
	69.81 \pm 234.23	سيطرة	
0.00	4.38 \pm 13.32	مرضى	TNF- α (Pg/ml)
	1.85 \pm 7.37	سيطرة	
0.00	114.43 \pm 589.13	مرضى	IL-2(Pg/ml)
	97.46 \pm 237.88	سيطرة	
0.32	0.50 \pm 0.77	مرضى	Serotonin(ng/ml)
	0.11 \pm 0.69	سيطرة	
0.00	22.66 \pm 59.58	مرضى	Cortisol(μ g/dl)
	18.66 \pm 39.53	سيطرة	

من خلال ما أظهرته النتائج لوحظ ان مستويات المعايير المناعية والهرمونات مرتفعة بشكل معنوي لدى مجموعة المدخنين وغير المدخنين لمرضى البهاق مقارنة بمجموعة السيطرة وجاءت النتائج واضحة ان مستويات المدخنين فيها اعلى من غير المدخنين وهذا يدل على تأثير التدخين على مرض البهاق اذ يمتلك التدخين تأثيراً غير مباشر على الجلد وذلك من خلال الجذور الحرة التي يولدها التدخين في الجسم والتي تعتمد على كمية النيكوتين المستهلكة من قبل المدخن.

للتدخين تأثيراً سلبياً على الجلد بشكل عام فهو يسبب نقص ترسب الكولاجين في الجسم مما يقلل مرونته كما يسرع من شيخوخة الخلايا الجلدية وهرمها نظراً للمواد السامة التي يمتلكها ومنها النيكوتين اذ يعمل النيكوتين على تقلص الاوعية الدموية في الجلد مما يؤدي الى تقليل التجهيز الدموي الى الخلايا فيؤدي الى حصول نقص الاوكسجين الواصل الى تلك الخلايا كما ان التدخين يحتوي على العديد من المركبات السامة اذ تتراكم على شكل جذور سامة في الخلايا الميلانية من نقص الاوكسجين الامر الذي يؤثر على الكثير من الوظائف الحيوية للخلايا الميلانية ومنها الية توليد الصبغة اضافة الى تثبيط العديد من الانزيمات المسؤولة عن أيض الأكسدة وعن بناء صبغة الميلانين وكذلك تثبيط نواقل الأوكسجين الخلوية وتحطيم DNA للخلايا الميلانية وغيرها وهذا التأثير يعتمد على كمية النيكوتين المستهلك من قبل المدخنين المرضى كما أشارت هذه الدراسة الى ان الجذور الحرة التي يمتلكها التدخين تزيد من الأجهاد فتسبب تبدلات في نظام مضادات الأكسدة لمقاومة الأجهاد نظراً لاستحاثتها على إطلاق المركبات الألتهايبية ومنها الساييتوكينات (Lee et al., 2012).

نظراً للمكونات الخطيرة التي يمتلكها دخان السكائر فقد لوحظ ان الجذور الحرة التي يمتلكها تسبب تبدلات في مستويات الأنظمة المضادة للأكسدة لذلك يلاحظ ارتفاع مستويات مضادات الأكسدة مثل الكلوتاثيون وSOD لمقاومة تلك الجذور الحرة لكن مع أستمرارية أستهلاك جرع كبيرة اثناء التدخين قد يضعف النيكوتين تلك فعالية تلك المضادات الحيوية (Ignatowicz et al., 2013)، بينما أشار Tappia وآخرون (2009) ان التدخين يحفز خلايا البلاعم الكبيرة macrophage على زيادة أنتاج وإطلاق المواد الألتهايبية ومنها الساييتوكينات بفعل الأجهاد لذلك لوحظ ارتفاع مستويات IL-2 وTNF- α بشكل متزايد لدى المرضى المدخنين والمصابين بمرض البهاق. كما اتفقت نتائج الدراسة مع (Jiao et al., 1998) الذي برهن ارتفاع مستويات IL-2 في مصل المرضى المدخنين مقارنة مع الأصحاء غير المدخنين. اوردَ كل من Tayarani و

(Changeux 2007) ان هناك توازن بين أفراس المواد الألتهايبية الأولية (Proinflammatory products) وبين بعض المركبات الأخرى التي تؤدي دوراً كمضاد للمركبات الألتهايبية (Anti-inflammatory products) الذي يشمل أنظمة مضادات الألتهايبات في الحالة الطبيعية لتفادي حدوث الألتهايبات لكن في حالة التدخين يحصل هناك تبدلات في تلك الأنظمة وهنا يقوم السيروتونين كأستجابة لهذه التبدلات من خلال زيادة مستوياته على تخفيف نشاط المواد الألتهايبية من خلال تقليل مستويات إطلاق TNF- α لتقليل التأثير العالي على الخلايا الميلانية. هذا وقد برهن Petrescu وآخرون (2010) ارتفاع مستويات الكورتيزول نتيجة لشدة الأجهاد والجدور الحرة التي تتولد من التدخين والأصابة وبتحفيز من ارتفاع مستويات السايبتوكينات.

5.2.4. الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للتأريخ العائلي

برزت نتائج البحث أهمية التأريخ العائلي وذلك من خلال ظهور فروق معنوية بين المرضى الذين يمتلكون تأريخ عائلي للمرض والذين لا يمتلكون تأريخ عائلي فقد بينت النتائج ارتفاع مستويات المعايير المناعية والهرمونات قيد الدراسة في أمصال الاشخاص المصابين بمرض البهاق والذين لديهم أصابات بنفس المرض بين أفراد العائلة مقارنة بالمرضى الذين لا يمتلكون ظهور لهذا المرض ، فقد لوحظ ارتفاع مستوى SOD-1 في المصل للأفراد ذوي التأريخ اذ بلغ (92.19 \pm 721.79) (pg/ml) مقارنة بالمجموعة الثانية والتي بلغ لديهم متوسط SOD-1 (93.99 \pm 689.89) (pg/ml) كما ارتفع في الوقت نفسه مستوى TNF- α ليبلغ لدى المرضى (4.06 \pm 13.94) (pg/ml) عن المجموعة الأخرى التي بلغ لديها TNF- α (4.05 \pm 12.66) (pg/ml) كما لوحظ ارتفاع مستويات بقية المعايير الأخرى ليبلغ IL-2 (101.92 \pm 617.13) (pg/ml) و السيروتونين (0.46 \pm 0.88) (ng/ml) والكورتيزول (20.51 \pm 63.48) (μ g/ml) مقارنة بالمجموعة الأخرى التي أنخفضت لديها تلك المتغيرات لتبلغ (105.43 \pm 580.19)، (0.47 \pm 0.75)، (21.76 \pm 59.01) كما في جدول (4-19).

جدول (4-19) يوضح متوسطات المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للتأريخ العائلي

Sig	SD \pm Mean	العينة	
0.24	92.19 \pm 721.79	وجود تاريخ عائلي	SOD-1(pg/ml)
	93.99 \pm 689.89	لايوجد تاريخ عائلي	
0.28	4.06 \pm 13.94	وجود تاريخ عائلي	TNF- α (Pg/ml)
	4.05 \pm 12.66	لايوجد تاريخ عائلي	
0.23	101.92 \pm 617.13	وجود تاريخ عائلي	IL-2(Pg/ml)

	105.43 ± 580.19	لا يوجد تاريخ عائلي	
0.32	0.46 ± 0.88	وجود تاريخ عائلي	Serotonin(ng/ml)
	0.47 ± 0.75	لا يوجد تاريخ عائلي	
0.47	20.51 ± 63.48	وجود تاريخ عائلي	Cortisol(µg/dl)
	21.76 ± 59.01	لا يوجد تاريخ عائلي	

من خلال النتائج أعلاه يظهر تأثير التاريخ العائلي واضحاً على المعايير المناعية كون هذا المتغير هو أحد العوامل الرئيسية التي يتوقف عليها المرض كون وجود شخص حامل لهذا المرض ضمن العائلة تزيد من فرص ظهورها مرة أخرى في نفس العائلة أو في الأجيال اللاحقة وهنا دور الوراثة يبدو واضحاً.

أنفقت هذه النتائج مع ما أكدته كل من (Kostovic and Pasic, 2005; Mohammed *et al.*, 2015) على أهمية التاريخ العائلي وتأثيره في ظهور وتطور مرض الربو للأشخاص المصابين وعده أحد الأسباب المهمة وفسره على ان وجود نفس الإصابة بمرض الربو بين احد افراد العائلة هي احد المؤشرات المهمة لزيادة الإصابة بنفس المرض لدى أفراد آخرين من نفس العائلة او بين اشخاص تجمع بينهم صلة قرابة كما بين من أهم الأسباب الأخرى هي الإصابة بأمراض مناعية ذاتية من نوع آخر لنفس الشخص المصاب مثل الإصابة بأمراض الغدة الدرقية (Thyroid disease) وداء السكر (Diabetes mellituse) والأصابة بمرض أديسون (Addison disease) ، اذ بين أنه غالباً ما تتوافق الإصابة بمرض الربو مع هذه الأمراض كون هذه الأمراض المناعية الذاتية تسبب ضرر للجهاز المناعي والذي بدوره يمكن ان تسبب ضرراً في الخلايا الميلانية وفقدان التصبغ كونه تنتج اجسام مضادة ومركبات التهابية عالية يمكن ان تهاجم تلك الخلايا الصبغية.

بينما لم تتفق هذه النتائج مع ما جاء به (Burns-cox and Pearson 1972) ، اذ بين وجود علاقة بين الإصابة بمرض الربو وبين الإصابة بمرض أديسون ومرض أديسون هو المرض الذي أكتشف من قبل أديسون عام 1855 وهو مرض ناتج عن حدوث ضرر في الغدة الكظرية وينتج عنها اضطراب في إفراز الهرمونات المنتجة منها بما في ذلك هرمون الكورتيزول اذ تقل مستويات بناء وإطلاق هذا الهرمون فيؤدي الى تطور مرض الربو بسبب نقص كفاءة إنتاج الغدة الكظرية لهذا الهرمون المسؤول عن كبح فعالية الجهاز المناعي اذ يزداد نشاطها ضد الخلايا الميلانية اثناء قصور انتاج هرمون الكورتيزول عن طريق الغدة الكظرية لذلك أثبتت الدراسات عن وجود ترابط بين مرض الربو وبين مرض أديسون ، في الوقت نفسه وجد انه الإصابة بمرض اديسون يلاحظ ارتفاع مستويات الأجسام المضادة الذاتية (Autoantibodies) للغدة

الكظرية وهذه الاجسام المضادة يمكن ان تهاجم الخلايا الميلانية وتسبب تدميرها وظهور مرض البهاق. بينما أتفقت النتائج مع Cucchi وآخرون (2003) والذي بين ارتفاع مستويات الكورتيزول والسيروتونين لدى مرضى البهاق الذين لديهم تاريخ عائلي ، وذلك بسبب أستمراية تحفيز الجهاز المناعي بفعل الأجهاد الذي يزيد من المكونات المناعية الأمر الذي يرفع من مستويات تلك المعايير .

6.2.4. الفروقات بين المعايير المناعية والهormونات لدى مرضى البهاق تبعاً لصلة القرابة بين الوالدين

بينت النتائج الظاهرة في جدول (4-20) أنخفاض مستويات المعايير المناعية والهormونات لدى المرضى الذين يمتلكون صلة قرابة بين الوالدين مقارنة بالمرضى الذين لايمتلكون صلة قرابة بين الوالدين وقد كان هذا الأنخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) اذ بلغ معدل SOD-1 عند مجموعة المرضى الذين يمتلكون صلة قرابة بين الوالدين (93.69 ± 697.61 pg/ml) مقارنة بمجموعة المرضى الذين لايمتلكون صلة قرابة بين الوالدين اذ بلغ المتوسط لـ SOD-1 (95.54 ± 710.20 pg/ml) اما TNF- α فقد بلغ (3.45 ± 12.47 pg/ml) اما مجموعة المرضى الذين لايمتلكون تاريخ عائلي فقد بلغ لديهم (4.75) ($14.22 \pm$ pg/ml) في حين بلغ IL-2 فقد بلغ (96.67 ± 578.47 pg/ml) اما المجموعة الأخرى فقد بلغ (113.48 ± 619.72 pg/ml) في حين كانت مستويات الهormونات السيروتونين والكورتيزول (ng/ml) (0.44 ± 0.74)، (22.93 ± 61.63) ($\mu\text{g/ml}$) قياسا بالمجموعة الأخرى والتي بلغ لديها نفس القياسات (0.51 ± 0.89)، (18.73 ± 59.55) على التوالي .

جدول (4-20) يوضح متوسطات المعايير المناعية والهormونات لدى مرضى البهاق تبعاً لصلة القرابة بين الوالدين

Sig	SD±Mean	العينة	
		وجود صلة	عدم وجود صلة
0.65	93.69 ± 697.61	وجود صلة	SOD-1(pg/ml)
	95.54 ± 710.20	عدم وجود	
0.14	3.45 ± 12.47	وجود صلة	TNF- α (Pg/ml)
	4.75 ± 14.22	عدم وجود	
0.17	96.67 ± 578.47	وجود صلة	IL-2(Pg/ml)
	113.48 ± 619.72	عدم وجود	
0.30	0.44 ± 0.74	وجود صلة	Serotonin(ng/ml)

0.74	0.51 ± 0.89	عدم وجود	Cortisol(µg/dl)
	22.93 ± 61.63	وجود صلة	
	18.73 ± 59.55	عدم وجود	

لوحظ من النتائج أعلاه ان جميع المتغيرات اخذت بالنقصان عدا الكورتيزول وهذا يشير الى ان صلة القرابة ليس لها تأثير على تلك المعايير عدا الكورتيزول الذي ظهر ارتفاعاً مقارنة بالمجموعة الأخرى . لم تتفق هذه النتائج مع بعض الدراسات الوراثية ودراسة الترابط الجيني ودراسات مرضية اخرى على ان مرض البهاق يرتبط الى مجموعة من الجينات الجسمية (Autosomal genes) التي تسيطر على ظهور المرض وبيئت الى ان تلك بعض من تلك الجينات هي جينات مناعية تنتقل من الآباء الى الأبناء عن طريق التوريث وتسيطر على الجهاز المناعي (Spritz *et al.*,2007) ، وقد تبين ان هذه الجينات تظهر بشكل كبير في أجيال الجماعات المغلقة والتي يحصل تزواج داخلي فيما بينها اذ يعطي هذا الأنغلاق في التزاوج فرصة أكبر لألتقاء هذه الجينات وتوريثها للأجيال اللاحقة وتزيد في ظهور وانتشار مرض البهاق كما انها تقلل فرص التغاير الوراثي كما انها تسبب ظهور أمراض مناعية أخرى إضافة الى زيادة تأثيرات عوامل الخطورة البيئية والوراثية على الأجيال اللاحقة وتبعاً لذلك سوف تضخم ظهور جينات خطيرة في الجماعات المغلقة مقارنة مع الجماعات المنفتحة وبعض من هذه الجينات هي المسؤولة عن تشفير العديد من المركبات المهمة في الجسم ، اذ يزداد التعبير الجيني لها وبالتالي ترتفع مستوياتها في الجسم بشكل ملحوظ (Wright *et al.*,1999) .

7.2.4. الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للحالة الاجتماعية

أوضحت نتائج المقارنة الظاهرة في جدول (4-21) وجود تأثير للحالة الاجتماعية على مستويات المعايير المناعية والهرمونات في المصل اذ لوحظ ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) متوسطات تلك المعايير لدى المتزوجين مقارنة بغير المتزوجين فقد سجلت متوسطات SOD-1 (67.42 ± 750.39) (pg/ml) لدى المتزوجين من المرضى و (62.84 ± 609.98) (pg/ml) لغير المتزوجين اما بقية المعايير الأخرى وهي

IL-2 ، TNF- α ، السيروتونين وأخيراً الكورتيزول فقد كانت كالتالي (3.58 ± 15.14) ، (pg/ml) (76.21 ± 648.74) ، (0.38 ± 1.03) (ng/ml) ، (16.23 ± 71.15) ($\mu\text{g/ml}$) على التوالي مقارنة بغير المتزوجين وعلى نفس الترتيب السابق (1.221 ± 9.35) ، (65.94 ± 490.59) ، (0.26 ± 0.36) ، (14.02 ، ($40.71 \pm$ على التوالي .

جدول (21-4) يوضح متوسطات المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للحالة الاجتماعية

Sig	SD±Mean	العينة	
		متزوج	اعزب
0.00	67.42 ± 750.39	متزوج	SOD-1(pg/ml)
	62.84 ± 609.98	اعزب	
0.00	3.58 ± 15.14	متزوج	TNF- α (Pg/ml)
	1.221 ± 9.35	اعزب	
0.00	76.21 ± 648.74	متزوج	IL-2(Pg/ml)
	65.94 ± 490.59	اعزب	
0.00	0.38 ± 1.03	متزوج	Serotonin(ng/ml)
	0.26 ± 0.36	اعزب	
0.00	16.23 ± 71.15	متزوج	Cortisol($\mu\text{g/dl}$)
	14.02 ± 40.71	اعزب	

كما تم إجراء مقارنة لمجموعة السيطرة تبعاً للحالة الاجتماعية ف لوحظ وجود اختلافات بين تلك المعايير بين المتزوجين وغير المتزوجين من السيطرة اذ ارتفعت معدلات مجموعة المتزوجين بشكل ملحوظ ، وكانت النتائج مرتبة كالتالي SOD-1 (58.06 ± 262.83) ، TNF- α (1.33 ± 8.23) ، IL-2 (399.47 ± 958.49) (pg/ml) ، السيروتونين (0.08 ± 0.74) (ng/ml) ، الكورتيزول (12.90 ± 33.79) ($\mu\text{g/ml}$) للمتزوجين من مجموعة السيطرة اما غير المتزوجين فقد كانت النتائج كالتالي SOD-1 (58.06 ± 262.83) ، TNF- α (1.33 ± 8.23) ، IL-2 (399.47 ± 958.49) (pg/ml) ، السيروتونين (0.08 ± 0.74) (ng/ml) واخيراً الكورتيزول (12.90 ± 33.79) ($\mu\text{g/ml}$) كما في جدول (22-4).

جدول (22-4) يوضح متوسطات المعايير المناعية والهرمونات لدى مجموعة السيطرة تبعاً للحالة الاجتماعية

Sig	SD±Mean	العينة	
		متزوج	اعزب
0.00	58.06 ± 262.83	متزوج	SOD-1(pg/ml)

0.00	22.13 ± 172.08	اعزب	TNF-α(Pg/ml)
	1.33 ± 8.23	متزوج	
0.43	0.96 ± 5.62	اعزب	IL-2(Pg/ml)
	399.47 ± 958.49	متزوج	
0.00	33.07 ± 182.85	اعزب	Serotonin(ng/ml)
	0.08 ± 0.74	متزوج	
0.00	0.06 ± 0.58	اعزب	Cortisol(μg/dl)
	12.90 ± 33.79	متزوج	
0.00	19.13 ± 54.31	اعزب	

وتبعاً للحالة الاجتماعية فقد لوحظ ارتفاع تلك المعايير لدى المتزوجين مقارنة بغير المتزوجين وكذلك تبين من خلال المقارنة بين المتزوجين المرضى والمتزوجين من غير المرضى ان غالبية تلك المتغيرات قد ارتفعت وهذا ما قد يكون له تأثير على تطور المرض . أتفقت هذه النتائج مع دراسة قام بها Sabek وآخرون (2015) على الأشخاص المصابين بمرض البهاق من المتزوجين والتي شملت مجموعة من الذكور والأناث وقارن تلك النتائج مع مجموعة السيطرة فوجد ارتفاع نسب الإصابة بمرض البهاق بين المتزوجين أكثر من غير المتزوجين وعزى سبب الارتفاع في الإصابة الى ارتفاع مستويات الهرمونات الجنسية الذكرية والأنثوية في المصل وبين ان هرموني البروجيستيرون والأستروجين والتستوستيرون يزداد تركيزه لدى المصابين- المتزوجين اذ بين ان هذه الهرمونات تمتلك مستقبلات على الخلايا الميلانية تساهم في تطور الإصابة بالمرض إضافة الى الإصابة بأمراض مناعية أخرى. أشارت دراسة Hamilton وآخرون (2008) الى ان الكورتيزول يرتفع بشكل ملحوظ لدى النساء المتزوجات مقارنة مع النساء غير المتزوجات . كما وجد ان الكورتيزول يزداد لدى المتزوجين المرضى والبعض قد فسّر هذا الارتفاع لدى النساء الحوامل قد يعود الى أسباب متعلقة بالحمل اذ يزداد كون الأجنة أثناء الحمل تقوم بإنتاج الكورتيزول خاصة في المراحل المتقدمة من الحمل فتزداد مستوياته لدى النساء الحوامل (Hoehn and Marieb, 2010) .

8.2.4. الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً لمدة الإصابة بمرض البهاق

أتضحنت النتائج المدونة في جدول (4-23) بعد تقسيم مدة الإصابة بمرض البهاق الى فئات اعتماداً على الأشهر اذ لوحظ تباين مستويات SOD-1 على أختلاف تلك الفترات اذ بلغ متوسطه لدى الفترة من (1-80) شهر (49.09±602.36) (pg/ml) ثم ارتفعت مستوياته في المصل ليبلغ (63.02±821.18) (pg/ml) لدى الفئة من (81-160) شهر ثم عاد لينخفض لدى المجموعة من (241-320) شهر ليصل الى

(400-321) لدى المجموعة من (pg/ml) (51.42±763.92) في حين بلغ (pg/ml) (55.35±724.27) شهر، اما TNF- α فقد سُجلت أعلى نسبة لدى المجموعة من شهر(161-240) اذ بلغ المتوسط (pg/ml) (3.17±17.07) يليه المجموعة الثانية من (400-321) شهر ليصل (pg/ml) (2.87±16.58) ثم الفئة المتراوحة شهر(241-300) (pg/ml) (4.26±15.70) واخيراً سجل انخفاض (1.69±9.46) (pg/ml) لدى الفئة من (80-1) شهر ، سجلت النتائج ارتفاعاً في المتوسطات للحركي الخلوي الثاني لدى فئات الإصابة من (300-241) شهر و (400-321) شهر ليبلغ (77.87±700.07) ، (65.75±661.91) (pg/ml) على التوالي في حين سجل انخفاضات لدى المجاميع من (240-161) شهر (57.62±578.49) و (64.03±488.42) (pg/ml) (160-81) شهر وادناها في فئة (80-1) شهر (4.06±13.17) . اما الهرمونات فقد سجل السيروتونين ارتفاعاً معنوياً في المجموعة المتراوحة بين (80-1) شهر ليبلغ متوسط الارتفاع (67.36±672.58) (ng/ml) في حين تباينت المعدلات الاخرى على اختلاف المجاميع الأخرى فقد ظهرت على النحو التالي (0.25±0.78) (0.48±1.39) (0.28±0.92) (0.37±1.09) (ng/ml) مرتبة على الفئات التالية (160-81) شهر ، (240-161) شهر، (320-241) شهر، (400-321) شهر على التوالي . في حين كانت أعلى النسب للكورتيزول للمجاميع التالية (240-161) شهر و (400-321) شهر اذ بلغ (11.69±78.12)(10.78±78.06) (μ g/ml) وأقلها عند المجاميع التالية (80-1) شهر، (160-81) شهر، (240-161) شهر وبلغ (23.99±64.71)، (17.11±44.51) (17.71±55.64) (μ g/ml) على التوالي .

جدول (4-23) يوضح متوسطات المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً لمدة الإصابة بالمرض

Sig	SD±Mean	العينة	
0.00	49.09 ± 602.36	شهر 80-1	SOD-1(pg/ml)
	64.84 ± 710.82	شهر 160-81	

	63.02 ± 821.18	شهر 240-161	
	55.35 ± 724.27	شهر 320-241	
	51.42 ± 763.92	شهر 400-321	
0.00	1.69 ± 9.46	شهر 80-1	TNF-α(Pg/ml)
	2.01 ± 11.66	شهر 160-81	
	3.17 ± 17.07	شهر 240-161	
	4.26 ± 15.70	شهر 320-241	
	2.87 ± 16.58	شهر 400-321	
0.00	4.06 ± 13.17	شهر 80-1	IL-2(Pg/ml)
	64.03 ± 488.42	شهر 160-81	
	57.62 ± 578.49	شهر 240-161	
	77.87 ± 700.07	شهر 320-241	
	65.75 ± 661.91	شهر 400-321	
	67.36 ± 672.58	شهر 80-1	Serotonin(ng/ml)
	0.25 ± 0.78	شهر 160-81	
	0.48 ± 1.39	شهر 240-161	
	0.28 ± 0.92	شهر 320-241	
	0.37 ± 1.09	شهر 400-321	
0.00	17.11 ± 44.51	شهر 80-1	Cortisol(μg/dl)
	17.71 ± 55.64	شهر 160-81	
	11.69 ± 78.12	شهر 240-161	
	23.99 ± 64.71	شهر 320-241	
	10.78 ± 78.06	شهر 400-321	

تفسير النتائج بشكل عام تبعاً لمدة الإصابة يلاحظ ان هناك ارتفاع تدريجي في المستويات بشكل عام لكن هذا الارتفاع قد يكون فيه نوع من التباين اعتماداً على فترات الإصابة ويفسر ذلك على ان تلك المعايير قد لا تتأثر بتاريخ الإصابة لكن بشكل عام تعتبر مدة الإصابة شأنها شأن العمر لها تأثير كبير على تطور مرض البهاق وانتشاره في الجسم .

أشارت المصادر الى وجود ارتباط وثيق بين أنماط مرض البهاق وبين مدة الإصابة اذ وجد الكثير من التصنيفات لمرض البهاق اعتماداً على انتشار وموقع الإصابة للبقع فقد قسم الى ثلاث أنواع (Localized vitiligo) ، (Generilized vitiligo) و (Universal vitiligo) بينما قسمه الآخر الى (Segmental vitiligo) هذا النوع يشكل دائماً نسبة قليلة لاتزداد عن 30% وهذا النوع سرعان مايتوقف ولاينتشر بعد سنة او

سنتين من مدة ظهور البقع اما النوع الآخر (Non segmental vitiligo) هذا النوع يستمر بالانتشار والتوسع مع زيادة مدة الإصابة ، كما قسمه البعض الآخر على أساس الوقت الذي يستغرقه المرض على الانتشار وفقاً لهذا التقسيم فقد قسم مرض البهاق الى البهاق التقدمي (Prognosis vitiligo) هذا النوع يتصف بسرعة أنتشاره الى مناطق أخرى بتقادم الإصابة اذ يتميز بظهور بقع جديدة إضافة الى البقع القديمة كما قد تتوسع البقع القديمة اما النوع الثاني فهو البهاق الساكن (Quiescent vitiligo) يتميز هذا النوع ببطئ تقدمه مع تقادم الإصابة وسرعان ما يتوقف كما تتميز بقعه القديمة بعدم توسعها وفي بعض الأحيان تصغر تلك البقع وقد تختفي (Sehgal, 2007). تناول Cucchi وآخرون (2003) دراسة تأثير المرض على تطور مرض البهاق وزيادة شدته وقد أشارت النتائج ان زيادة مدة الإصابة سوف يزداد معها شدة المرض لدى غالبية مرضى البهاق وأشار الى ان البهاق نوع المتقطع (Segmental vitiligo) لا يتأثر كثيراً بمدّة الإصابة و نادراً ما ينتشر ويتحول الى نوع آخر وهو (Mixed vitiligo) اما النوع الآخر وهو (Generalized vitiligo) فإن هذا النوع يتأثر كثيراً بتقدم مدة الإصابة كونه قد يتطور الى أنواع أخرى .

برهن Al-Gamdi وآخرون (2012) ارتفاع مستويات TNF- α لدى مرضى البهاق نوع Generilized كما بين Shi وآخرون (2013) ارتفاع مستويات IL-2 في المصل لنفس المجموعة مع زيادة مستوياته ولكن هذا الارتفاع يكون عكسياً مع مدة الإصابة فمع تقادم الإصابة تقل مستوياته وقد فسر انخفاض TNF- α و IL-2 تدريجياً مع التقدم بالأصابة دلالة على أنهما معيارين بايولوجيين غير مهمين . بين Cucchi وآخرون (2003) ارتفاع مستويات الكاتيكول أمين (Caticolamins) والذي يمكن ان تسبب فقدان التصبغ نتيجة الأجهاد كأستجابة له وهذه النواقل تحفز إطلاق الكورتيزول الذي يقوم بدوره بتحريك الكلوكوز والأحماض الدهنية الحرة لرفع مستوياتها وهنا يتأثر هرمون الأنسولين والذي يحفز الدماغ لتحفيز أستهلاك (Tryptophan) الذي يعد البادرة لبناء السيروتونين لذلك ترتفع مستوياته وهذا بدوره قد يتحول الى الميلانين (Melanin) والذي له دور كبير في مرض البهاق .

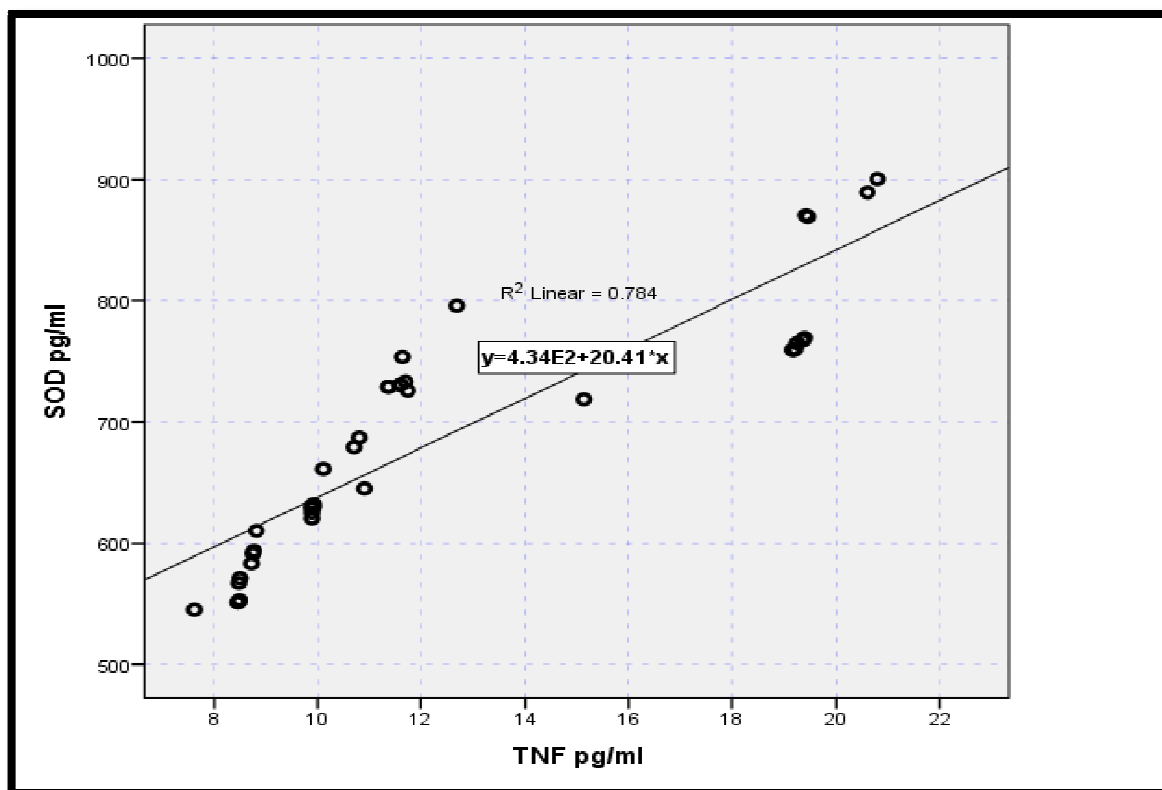
فسرت النتائج انخفاض السيروتونين خلال مدة الإصابة من خلال وجود فرضية بينت ان انخفاض مستويات السيروتونين وتثبيط مستقبلاتها أثناء الإصابة ناتجة عن زيادة إنتاج السايبتوكينات مثل الحركي الخلوي الثاني IL-2 والأنترفيرون (Interferon) وعامل التنخر الورمي نوع الفا TNF- α جميع هذه السايبتوكينات تنشيط أستهلاك جزئ التربتوفان tryptophan والذي يعد بادرة بناء السيروتونين وذلك من خلال تنشيط إنزيم (Indoleamine 2,3-dioxygenase) IDO الذي يعمل على أستهلاك جزئ التربتوفان (Tryptophan)

ويبني (Quiolinic acid) اذ يدخل هذا الحامض الأميني في بناء الكلوتامين في حين يحول الترتوفان الى مستقبلات سطحية لجزيئة الكلوتامين لذلك تنخفض مستويات السيروتونين وترتفع مستويات الكلوتامين في حالة الإصابة بالمرض. لكن في حالة الأصحاء يلاحظ ان هناك توازن بين السيروتونين والكلوتامين ينظم بتغذيات راجعة اما في حالة الأمراض يفقد هذا التوازن اي ان تقادم الإصابة يزيد من الألتهابات والمركبات الألتهابية ويثبط من مستويات السيروتين لذلك يلاحظ أستمرار تحطم الخلايا الميلانية ولذلك لعدم توفر الحماية الكافية لها من المواد الألتهابية (Muller and Schwarz, 2007).

بينما تناقض مع ما أشار إليه Shahin وآخرون (2013) ان مستويات السيروتونين ترتفع مع قدم الأصابة وهذا الأرتفاع قد يكون أحد الأسباب التي تساهم في الإمراضية وذلك لأن المستويات المرتفعة للسيروتونين مع قدم الأصابة سوف تزيد من التقلص للأوعية الدموية و بالتالي يسبب نقص تجهيز الأوكسجين للخلايا الميلانية (Hypoxia) مع زيادة تراكم الجذور الحرة في الخلايا الميلانية ويسبب تحطماها. لاحظت بعض الدراسات ترتفع مستويات الكورتيزول بتقدم العمر والأصابة اذ يزداد لدى كبار السن مقارنة بالصغار والبالغين وذلك بسبب وظيفة الكورتيزول على تثبيط فعالية الجهاز المناعي وكبح فعاليته الزائدة وكذلك مقاومة الأجهاد ، وبما ان تقادم الأصابة والعمر يزيد من أنتاج الجذور الحرة (Free radicals) في الجلد لذلك تزداد مستوياته (Larsson et al., 2009).

9.2.4. الأرتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق بشكل عام

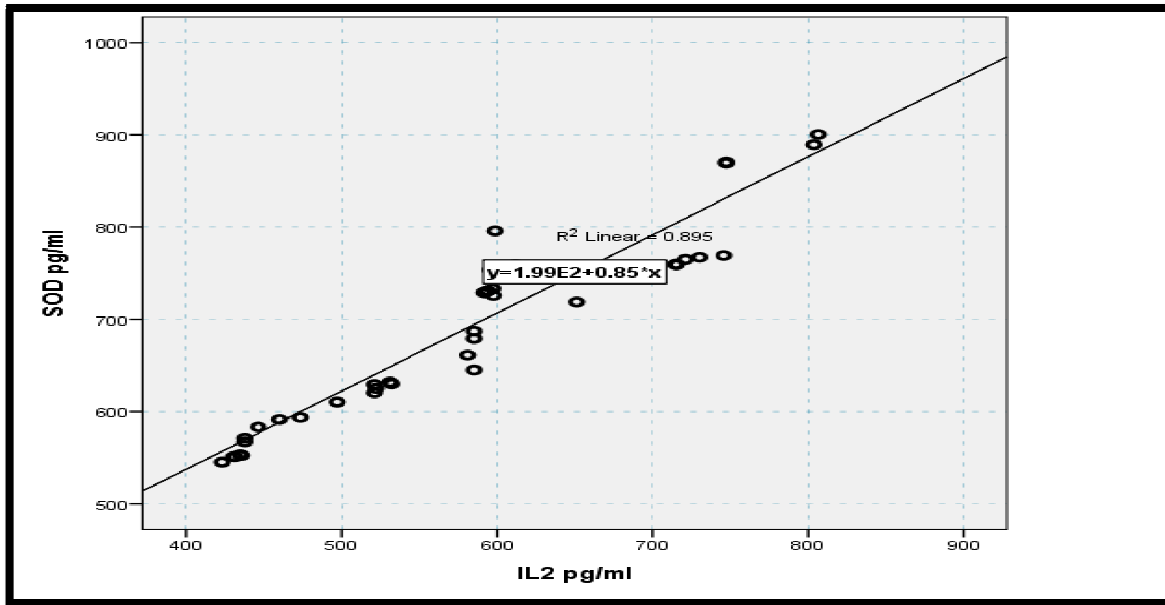
أظهرت نتائج البحث وجود أرتباط معنوي موجب عند مستوى الدلالة الأحصائي ($P \leq 0.05$) بين المعايير المناعية قيد الدراسة ، اذ ظهر أرتباط معنوي بين SOD-1 و TNF- α بلغ (0.886) كما ظهر أرتباط معنوي بين SOD-1 و IL-2 وبلغ (0.946) كما ظهر أرتباط معنوي بين SOD-1 وبين السيروتونين اذ بلغ (0.964) وبينه وبين الكورتيزول اذ بلغت القيمة (0.749) كما سجل ظهور أرتباط معنوي بين TNF- α وبين IL-2 اذ بلغت قيمة الارتباط (0.956) كما كان هناك أرتباط معنوي بين TNF- α وبين السيروتونين والتي بلغت (0.924) وبين TNF- α والكورتيزول اذ ظهرت قيمة الارتباط (0.749) في الوقت ذاته كان هناك أرتباط معنوي بين IL-2 وبين السيروتونين وقد بلغ (0.965) كما كان هناك أرتباط بين IL-2 والكورتيزول وقد بلغ (0.749) وأخيراً ظهر أرتباط معنوي بين السيروتونين والكورتيزول لتبلغ قيمة الارتباط (0.714) كما في الجدول الملحق رقم (4-24) والأشكال الظاهرة رقم (15-4)(16-4)(17-4)(18-4)(19-4)(20-4)(21-4)(12-4)(13-4)(14-4).4.



*. Correlation is significant at the 0.05 level

*.n= 50 samples

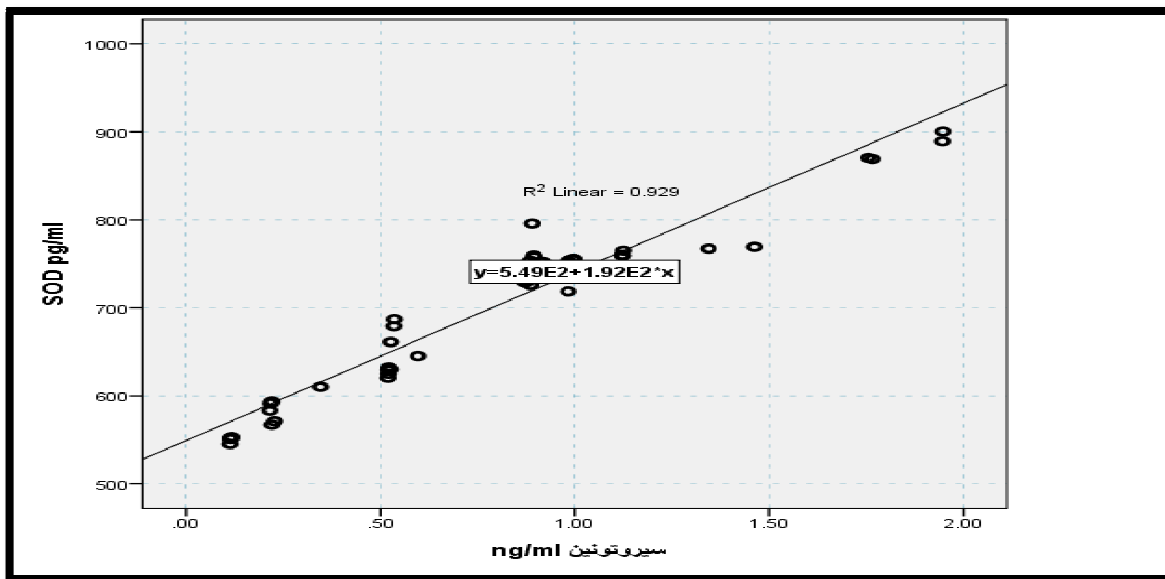
شكل (12-4) العلاقة الخطية الموجبة بين (pg/ml) SOD-1 و (pg/ml) TNF- α



*. Correlation is significant at the 0.05 level

*.n= 50 samples

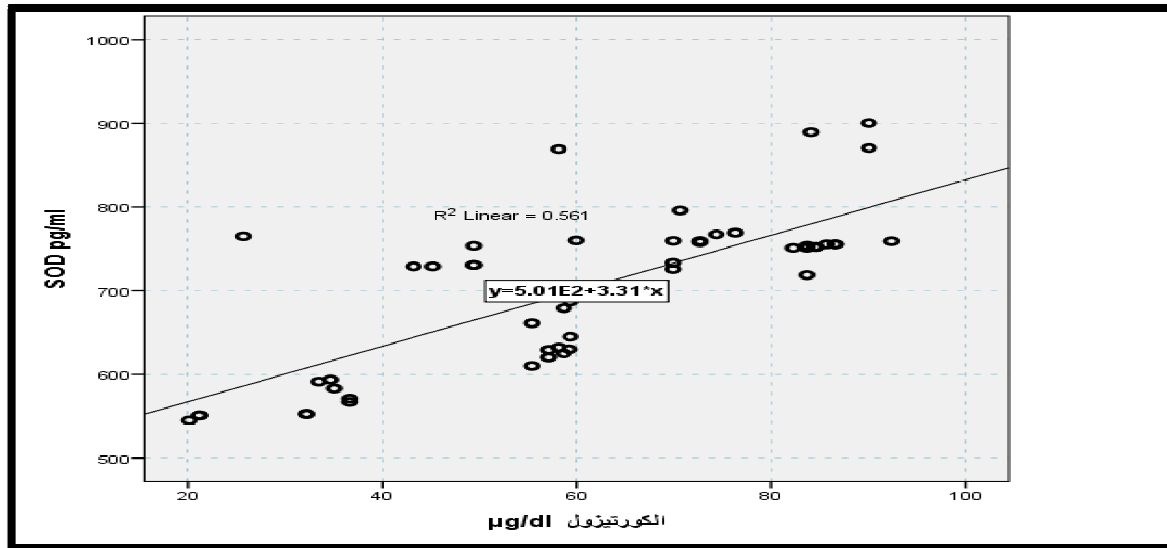
شكل (13-4) العلاقة الخطية الموجبة بين SOD-1 (pg/ml) و IL-2 (pg/ml)



*. Correlation is significant at the 0.05 level

*.n= 50 samples

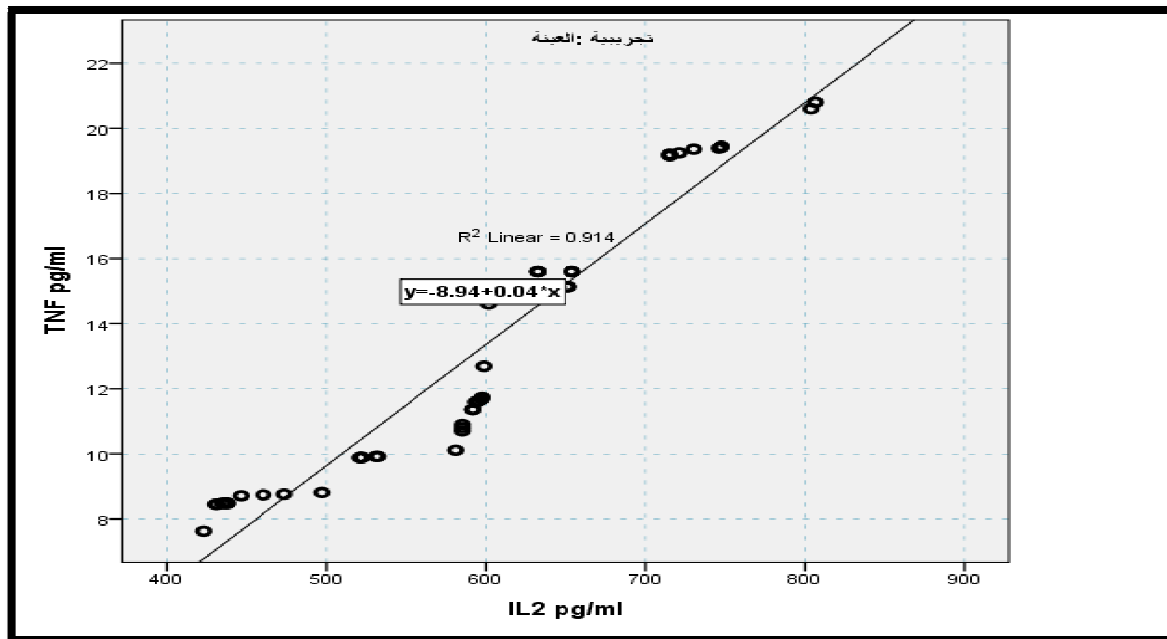
شكل (14-4) العلاقة الخطية الموجبة بين SOD-1 (pg/ml) وبين السيروتونين (ng/ml)



*. Correlation is significant at the 0.05 level

*.n= 50 samples

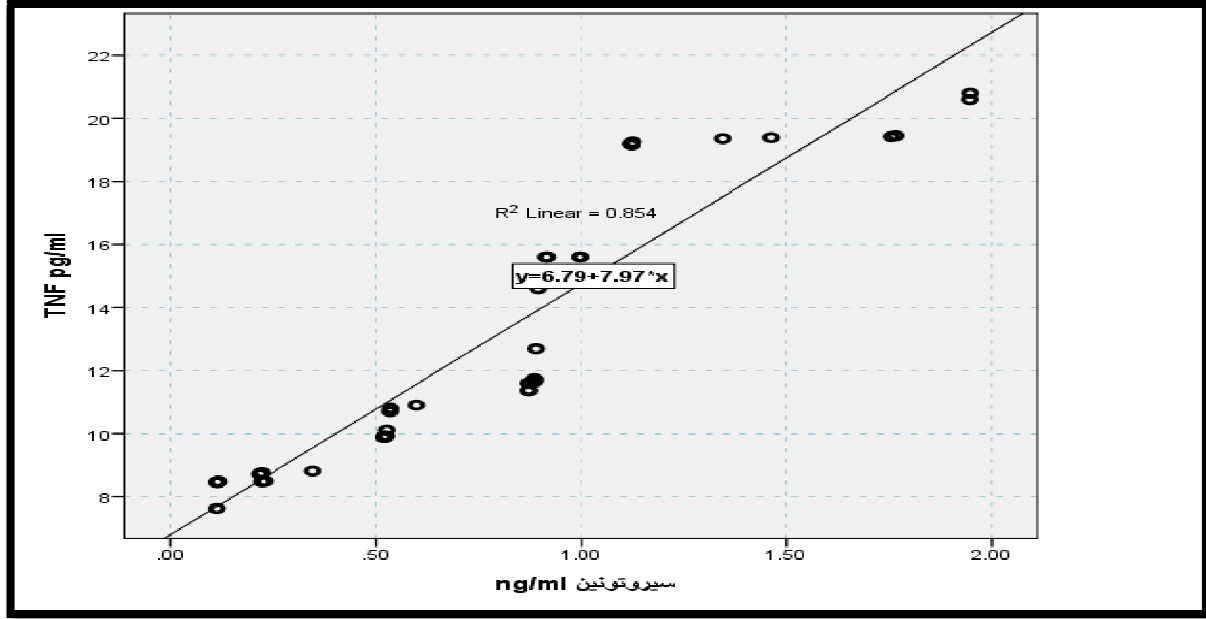
شكل (15-4) العلاقة الخطية الموجبة بين SOD-1 (pg/ml) وبين الكورتيزول (µg/ml)



*. Correlation is significant at the 0.05 level

*.n= 50 samples

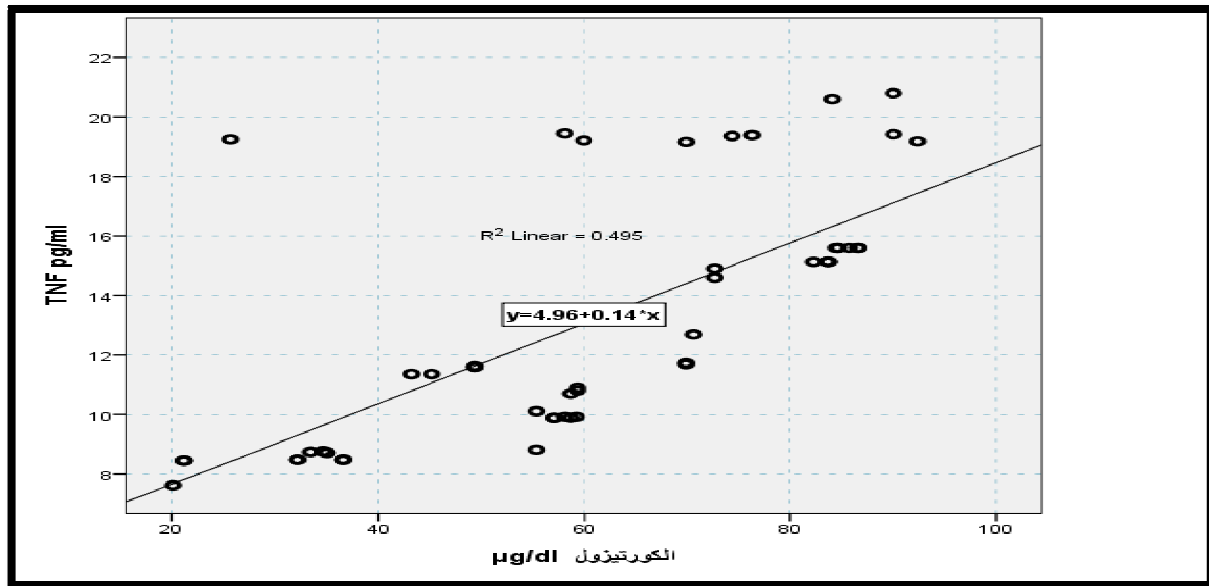
شكل (16-4) العلاقة الخطية الموجبة بين (pg/ml) TNF- α و (pg/ml) IL-2



*. Correlation is significant at the 0.05 level

*.n= 50 samples

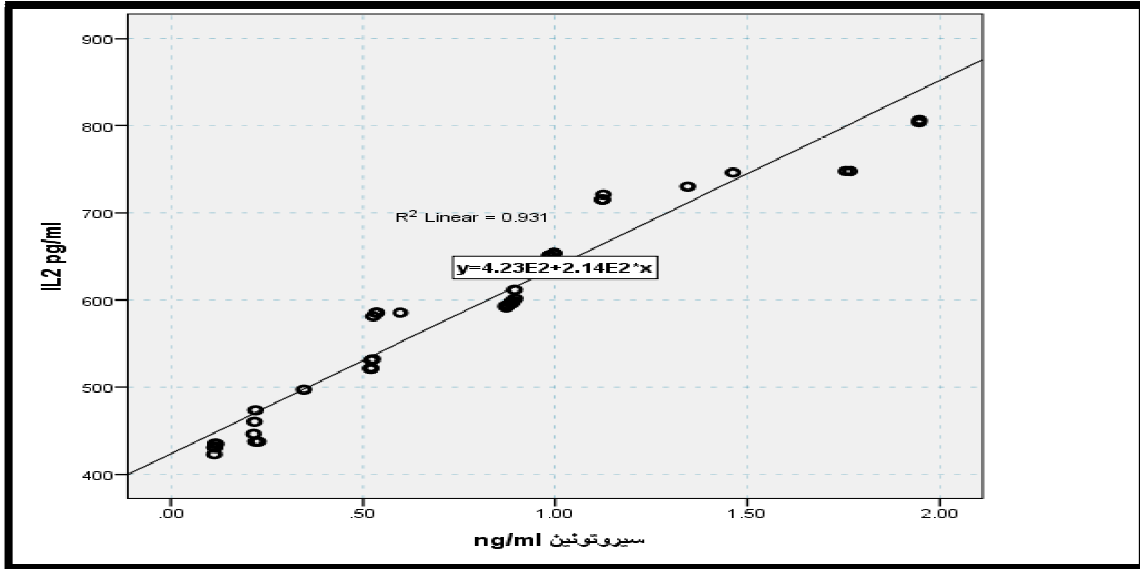
شكل (17-4) العلاقة الخطية الموجبة بين (pg/ml) TNF- α و (ng/ml) السيروتونين



*. Correlation is significant at the 0.05 level

*.n= 50 samples

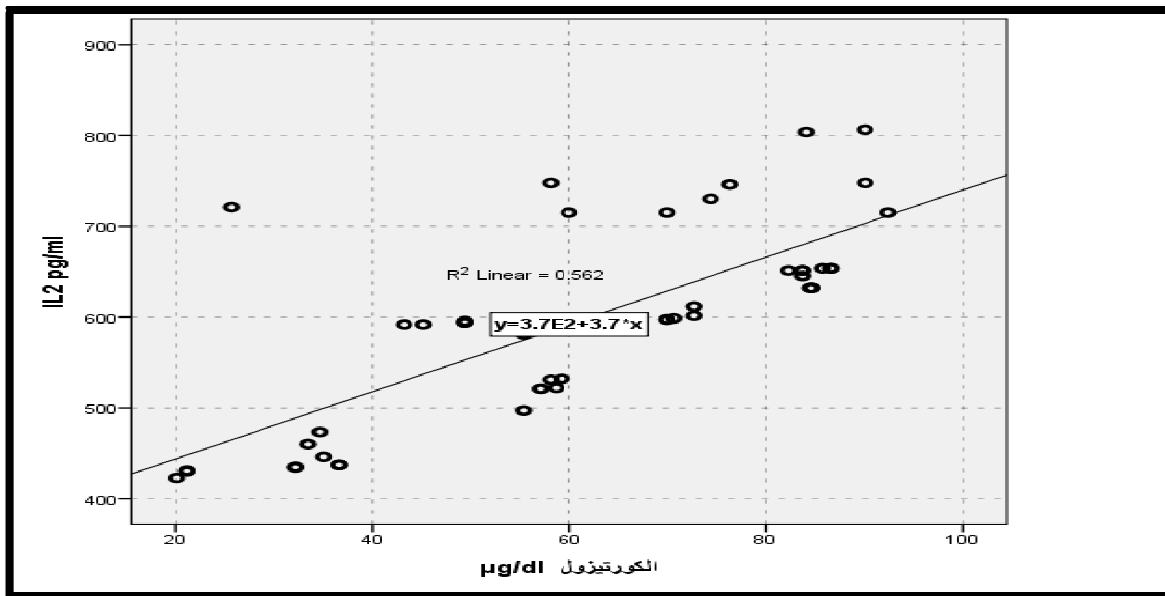
شكل (18-4) العلاقة الخطية الموجبة بين TNF- α (pg/ml) و الكورتيزول ($\mu\text{g/ml}$)



*. Correlation is significant at the 0.05 level

*.n= 50 samples

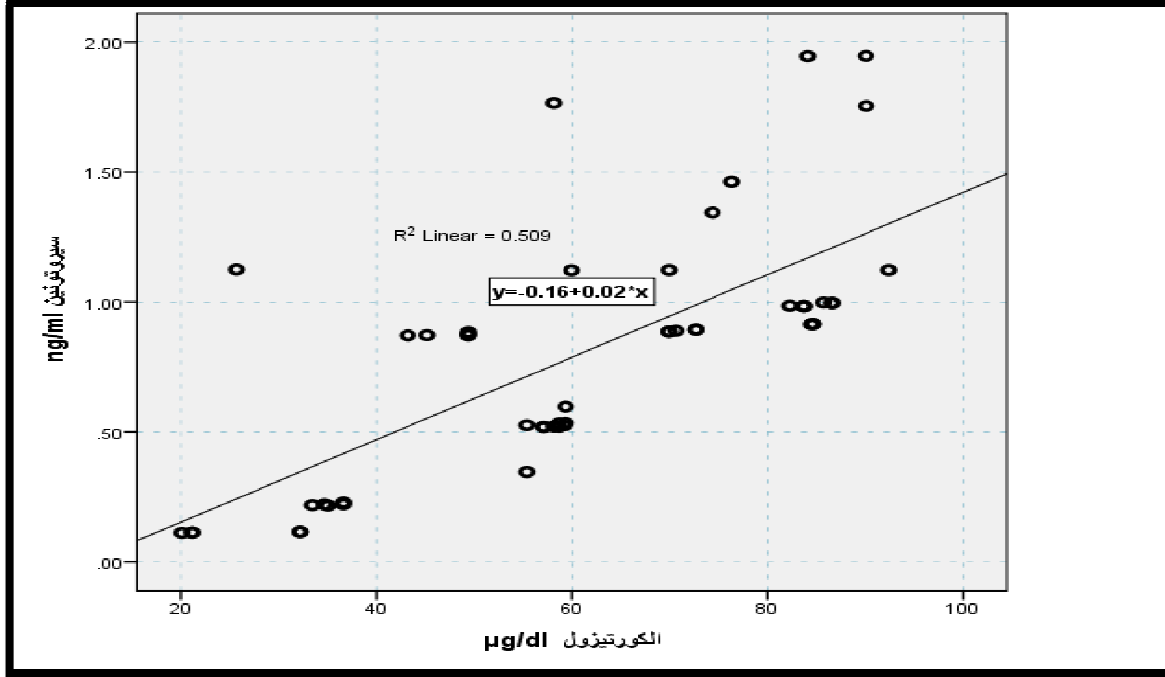
شكل (19-4) العلاقة الخطية الموجبة بين IL-2 (pg/ml) والسيروتونين (ng/ml)



*. Correlation is significant at the 0.05 level

*.n= 50 samples

شكل (20-4) الارتباط بين IL-2 (pg/ml) والكورتيزول ($\mu\text{g/ml}$)



*. Correlation is significant at the 0.05 level

*.n= 50 samples

شكل (21-4) العلاقة الخطية الموجبة بين السيروتونين (ng/ml) والكورتيزول ($\mu\text{g/ml}$)

10.2.4. الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً للعمر

أظهرت نتائج الدراسة المدونة في جدول (25-4) وجود ارتباطات بين المعايير المناعية تبعاً للعمر إذ ظهر وجود ارتباط معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) بين SOD-1 وبين عامل TNF- α للفئة العمرية من (10-19) سنة إذ بلغت قيمة الارتباط (0.725^*) في حين كان الارتباط معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) بين SOD-1 وبين IL-2 وبين SOD-1 وبين السيروتونين وبينه وبين الكورتيزول لتبلغ قيم الارتباط (0.940^{**}), (0.925^{**}) ، (0.818^*) على التوالي . كما شهد ظهور ارتباط معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) بين TNF- α وبين بقية المعايير المناعية والهرمونات إذ بلغت قيمة الارتباط مع IL-2 (0.681^*) ومع السيروتونين (0.595^*) ومع الكورتيزول (0.634^*) ، في حين كان الارتباط معنويًا عند

مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) بين IL-2 وبين الهرمونات لتبلغ قيمة الارتباط (0.853^{**})، (0.821^{**}) مع السيروتونين والكورتيزول على التوالي . اما الارتباط بين الهرمونات فقد كان معنوياً عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) ليبلغ (0.901^{**}).

جدول (25-4) يوضح الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق للفئة العمرية الأولى

العينة	الارتباطات	SOD-1 (Pg/ml)	TNF- α (Pg/ml)	IL-2 (Pg/ml)	Serotonin (ng/ml)
TNF- α (Pg/ml)	Correlation	.725*			
	Sig.	.012			
IL-2(Pg/ml)	Correlation	.940**	.681*		
	Sig.	.000	.021		
Serotonin(ng/ml)	Correlation	.925**	.595*	.853**	
	Sig.	.000	.053	.001	
Cortisol(μ g/dl)	Correlation	.818**	.634*	.821**	.901**
	Sig.	.002	.036	.002	.000

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

بينت نتائج الارتباطات المدونة في جدول (4-26) للفئة العمرية المتراوحة بين (20-29) سنة وجود ارتباطات معنوية موجبة عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) بين SOD-1 وبين جميع المعايير المناعية والهرمونات -TNF، IL-2، السيروتونين وقد بلغت قيم الارتباط (0.912^{**})، (0.838^{**})، (0.846^{**})، على التوالي بينما لوحظ وجود ارتباط عكسي بين SOD-1 وبين الكورتيزول عند مستوى معنوية ($P \leq 0.05$) لتبلغ قيمة الارتباط (0.799^{**}) جاءت النتائج متشابهة بين عامل TNF-2 وبين IL-2 والسيروتونين من خلال وجود ارتباطات معنوية موجبة عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) اذ بلغت النتائج (0.880^{**})، (0.828^{**})، بينما ظهر ارتباط عكسي بين TNF- α وبين الكورتيزول لتبلغ قيمته (0.673^*)، في حين لوحظ وجود ارتباط غير معنوي بين IL-2 وبين السيروتونين اذ بلغت قيمة الارتباط (0.578) بينما كان الارتباط عكسي غير معنوي بين IL-2 وبين الكورتيزول ليبلغ (-0.465)، ثم ظهر ارتباط معنوي عكسي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) بين السيروتونين والكورتيزول لتبلغ قيمة الارتباط العكسي (-0.947**).

جدول (4-26) يوضح الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق للفئة العمرية الثانية

Serotonin (ng/ml)	IL-2 (Pg/ml)	TNF- α (Pg/ml)	SOD-1 (Pg/ml)	الارتباطات	العينة
			.912**	Correlation	TNF- α (Pg/ml)
			.000	Sig.	
		.880**	.838**	Correlation	IL-2(Pg/ml)
		.000	.001	Sig.	
	.578	.828**	.846**	Correlation	Serotonin(ng/ml)
	.062	.002	.001	Sig.	
-.947**	-.465	-.673*	-.799**	Correlation	Cortisol(μ g/dl)
.000	.150	.023	.003	Sig.	

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

أظهرت النتائج المدونة في جدول (4-27) ان الارتباطات بين المعايير المناعية بدأت تفقد معنويتها تدريجياً بتقدم العمر اذ ظهرت نتائج الارتباطات بين SOD-1 وبين TNF- α فاقدة لمعنويتها للفئة العمرية (39-30) سنة اذ بلغت قيمة الارتباط (0.486) كما كان الارتباط غير معنوي بين SOD-1 و IL-2 اذ كانت قيمة الارتباط 0.389. عند مستوى دلالة ($P \leq 0.05$) أيضاً كان الارتباط غير معنوي بين SOD-1 وبين السيروتونين والكورتيزول لتبلغ (0.577) ، (0.382) على التوالي ، اما الارتباطات بين TNF- α وبقيّة المعايير فقد تبين بينما كان الارتباط محتفظ بمعنويته الموجبة بين IL-2 ليبلغ (0.888^{**}) عند مستوى دلالة ($P \leq 0.05$) كما كان الارتباط معنوي بين TNF- α والسيروتونين لكن عند مستوى دلالة ($P \leq 0.01$) لتبلغ قيمته (0.766^{*}) اما الارتباط بينه وبين الكورتيزول فقد كان فاقداً للمعنوية (0.636) ، اما الارتباط بين IL-2 والسيروتونين فقد كان معنوي موجب (0.754^{*}) لكن عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) اما الارتباط بين IL-2 والكورتيزول فقد كان فاقداً للمعنوية اذ بلغ (0.676) وأخيراً ظهر ارتباط معنوي موجب عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) بين السيروتونين وبين الكورتيزول ليبلغ (0.846^{**})

جدول (4-27) يوضح الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق للفئة العمرية الثالثة

Serotonin (ng/ml)	IL-2 (Pg/ml)	TNF- α (Pg/ml)	SOD-1 (Pg/ml)	الارتباطات	العينة
			.486	Correlation	TNF- α (Pg/ml)
			.222	Sig.	
		.888**	.389	Correlation	IL-2(Pg/ml)
		.003	.341	Sig.	
	.754*	.766*	.577	Correlation	Serotonin(ng/ml)
	.031	.027	.134	Sig.	
.846**	.676	.636	.382	Correlation	Cortisol(μ g/dl)
.008	.066	.090	.350	Sig.	

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

أوضحت النتائج للفئة العمرية (40-49) سنة عن فقدان الارتباطات لمعنوياتها بين SOD-1 وبين بقية المعايير الأخرى إذ بلغت القيم كالتالي (0.461)،(0.365)،(0.345)، على التوالي مع TNF- α ، IL-2 ، والسيروتونين عدا الارتباط مع الكورتيزول والتي كان الارتباط غير معنوي وسليبي ليبلغ (-.196) ، أما الارتباطات بين TNF- α وبين IL-2 ومعه ومع السيروتونين فقد كانت معنوية موجبة عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) لتبلغ (0.945^{**}) و (0.879^{**}) على التوالي في حين ظهر ارتباط سلبي غير معنوي بينه وبين الكورتيزول ليبلغ (-0.539) ، أما الارتباط بين IL-2 وبين السيروتونين فقد كان (0.984^{**}) ايضاً ارتباط موجب معنوي عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) أما ارتباطه مع الكورتيزول فقد كان غير معنوي سلبي ليبلغ (-0.530) كما ظهر ارتباط سلبي غير معنوي بين السيروتونين والكورتيزول ليبلغ (-0.493) كما في جدول (4-28).

جدول (4-28) يوضح الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى الربو للفئة العمرية الرابعة

Serotonin (ng/ml)	IL-2 (Pg/ml)	TNF- α (Pg/ml)	SOD-1 (Pg/ml)	الارتباطات	العينة
			.461	Correlation	TNF- α (Pg/ml)
			.113	Sig.	
		.945**	.365	Correlation	IL-2(Pg/ml)
		.000	.220	Sig.	
	.984**	.879**	.345	Correlation	Serotonin(ng/ml)
	.000	.000	.248	Sig.	
-.493	-.530	-.539	-.196	Correlation	Cortisol(μ g/dl)
.087	.063	.057	.522	Sig.	

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

بينت الارتباطات لدى الفئة الأخيرة والمتراوحة بين (50-59) سنة ظهور التباين بين القيم الارتباطية لـ SOD-1 وبين بقية المعايير الأخرى إذ لم يلاحظ ارتباط معنوي بينه وبين TNF- α إذ لوحظت القيمة (0.727) في حين ظهرت معنوية بشكل موجب لكن عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) إذ ظهرت القيمة (0.800^*) ثم تدرجت قيمة الارتباط لتظهر بشكل معنوي موجب عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) مع السيروتونين ليبلغ (0.950^{**}) ثم عاد الارتباط ليفقد معنويته بينه وبين الكورتيزول 0.556. بينما لوحظ ان TNF- α بدأ بارتباط معنوي موجب مع IL-2 عند مستوى دلالة ($P \leq 0.05$) (0.975^{**}) كما لوحظ وجود ارتباط معنوي موجب لكن عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) مع السيروتونين (0.763^*) ثم فقد معنويته مع الكورتيزول 0.535. كذلك كان هناك ارتباط بين IL-2 والسيروتونين 0.866^* وبينه وبين الكورتيزول (0.636)، كما كان الارتباط بين السيروتونين والكورتيزول غير معنوي (0.732) كما في جدول (4-29).

جدول (4-29) يوضح الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق للفئة العمرية الخامسة

Serotonin (ng/ml)	IL-2 (Pg/ml)	TNF- α (Pg/ml)	SOD-1 (Pg/ml)	الارتباطات	العينة
			.727	Correlation	TNF- α (Pg/ml)
			.064	Sig.	
		.975**	.800*	Correlation	IL-2(Pg/ml)
		.000	.031	Sig.	
	.866*	.763*	.950**	Correlation	Serotonin(ng/ml)
	.012	.046	.001	Sig.	
.732	.636	.535	.556	Correlation	Cortisol(μ g/dl)
.061	.125	.216	.195	Sig.	

*. Correlation is significant at the 0.05 level

**. Correlation is significant at the 0.01 level

تعد أسباب مرض البهاق كثيرة وغير محددة بشكل دقيق لكن تبين في السنوات الأخيرة من خلال الأبحاث والدراسات الواسعة حول مرض البهاق ان من بين مسببات المرض هي أسباب عصبية كيميائية وأسباب مناعية وأخرى أسباب تأكسدية اذ عزت الأسباب التأكسدية آلية حدوث مرض البهاق الى زيادة أفرز بعض المركبات الوسطية العصبية مثل (Caticolamin) ومنها (Norepinephrine) من نهايات الأعصاب وتراكمها بشكل كبير في الخلايا الميلانينية ويؤدي الى زيادة موت الخلايا الميلانينية اذ لوحظت مستويات عالية من تلك المركبات في البلازما واليوريا للأشخاص المصابين بمرض البهاق (Cucchi et al., 2003).

فيما بين Schallreuter وآخرون (1994) ان التراكيز العالية من (Norepinephrin) ناتج عن زيادة فعالية (Tyrosin hydroxidase) وهذا الإنزيم يلعب دوراً أساسياً في إنتاج مركب يدعى L-dopa السام في

البشرة وكما يؤدي مركب (Nonepinephrin) عبر سلسلة من المسارات المعقدة الى زيادة تراكم بيروكسيد الهيدروجين السام في الخلايا الميلانية وبالتالي تبدأ عملية فقدان التصبغ في الخلايا الميلانية. جاءت هذه النتائج متوافقة مع Shajil وآخرون (2005) والذي بين ان الخلايا الميلانية التي سبقت وان تعرضت لأجهاد تأكسدي ترتفع لديها مستويات الأجسام المضادة للخلايا الميلانية خاصة الأجسام المضادة من نوع IgG ، اما (Huang *et al.*, 2002) فقد أشار من خلال الدراسات النسجية والمصلية الى ارتفاع مستويات IL-2 وزيادة مستقبلاته IL-2R إضافة الى زيادة مستويات عامل التنخر الورمي نوع الفا TNF- α من خلال زيادة تعبير الخلايا التائية T-cells المترشحة بشكل كبير في منطقة الاصابة بالمرض لتلك المركبات البروتينية مما يسبب زيادة تراكم تلك المركبات في الخلايا الميلانية وبالتالي تحفز زيادة الموت المبرمج للخلايا الميلانية مما يضعف توازن وديمومة وبقاء تلك الخلايا الميلانية وبدء عملية فقدان التصبغ .

بينت نتائج الدراسة التي قدمت من قبل (Taieb and Picardo, 2009) أنه على الرغم من كون الأسباب الدقيقة وراء مرض البهاق غير معروفة بشكل دقيق لكنه أشار الى دور كل من المناعة الذاتية وترافقها مع الاجهاد التأكسدي والأسباب الوراثية وراء حدوث المرض اذ تسبب جميع هذه العوامل ضرراً للخلايا الميلانية وتسبب تحطيمها وفقدان ظهور الصبغة بشكل متدرج من البشرة المتضررة . تبرز الفرضية السمية دورها من خلال تراكم المركبات السمية في الخلايا الميلانية وتترافق مع ذلك دور المكونات المناعية للجهاز المناعي وتصبح الطفرات الوراثية مكملة في تغيير النظام الخلوي وبالتالي تضعف هجرة الخلايا الميلانية مما يعد سبب آخر للأمراضية (Le Poole *et al.*, 1996). برهنت الدراسات الى ان الاجهاد التأكسدي من أهم الأسباب التي تؤدي الى تحطيم الخلايا الميلانية من خلال زيادة انتاج بيروكسيد الهيدروجين H₂O₂ إضافة الى زيادة تراكم ROS أخرى اذ ان زيادة تراكم تلك المركبات يؤدي الى تحطيم الماييتوكونديريا وحدث ضرر DNA في الخلية وأكسدة الدهون والبروتينات للخلايا الميلانية (Giovannelli *et al.*, 2004 ; Salem *et al.*, 2009).

بينما أشار Cervantes وآخرون (2001) الى ان زيادة مستويات H₂O₂ و ROS الأخرى في الخلايا الميلانية يحفز موتها المبرمج وذلك لان وجود تلك المركبات المؤكسدة سوف يحفز الخلايا الميلانية على إطلاق مواد بروتينية من نوع خاص .تميز هذه البروتينات كمستضدات من قبل مكونات الجهاز المناعي بما في ذلك الحركي الخلوي الثاني IL-2 وعامل التنخر الورمي TNF- α لذلك يلاحظ زيادة مستويات كل من IL-2 و TNF- α أثناء عمليات بناء صبغة الميلانين (Melanogenesis) في الأشخاص المصابين بالبهاق لان تلك الخلايا الميلانية سرعان ماتتحتطم في المناطق المصابة . أشارت الدراسات الى ان الجلد بحكم موقعه الهام في

الجسم فهو يعد الحاجز الخارجي الحيوي الذي يحمي الجسم والأعضاء الداخلية ويحقق التوازن الداخلي لها من الأجهادات والظروف والعوامل الخارجية مثل الحرارة واشعة الشمس والأشعاعات والضغط والمركبات الخارجية والاحتكاك المباشر والمستمر مع العوامل الممرضة الخارجية (Slominski *et al.*, 2000) جميع تلك العوامل تسبب للجلد العديد من الأمراض والأضطرابات الجلدية لذلك هيئ الجلد العديد من الوسائل الدفاعية لذلك فقد فسرت تلك الدراسات اسباب وجود الترابط في العمل بين السيروتونين والكورتيزول من خلال دورهم الهام كوسائل دفاعية في كبح عوامل الاجهاد وحفظ التوازن الداخلي وكذلك كبح فعالية الجهاز المناعي ضد الخلايا الميلانية في الجسم (Mockus and Vrana, 1998).

يحتاج الجلد الى وسائل وقاية ومقاومة للبشرة ضد مرض البهاق وضد الأضطرابات الأخرى للجلد لذلك فقد هيئ الجلد تضافر مجموعة من الفعاليات لعدة أنظمة مثل فعالية الجهاز المناعي وفعالية الجهاز العصبي والتي تعد كخطوط دفاعية في الجسم ومن تلك المكونات التي تعود الى تلك الأنظمة هي السيروتونين/الميلاتونين فقد برهنت الدراسات وجود علاقة بين السيروتونين ومضادات الأوكسدة ومنها نوع SOD-1 وذلك من خلال دور السيروتونين بحماية الخلايا الميلانية والحفاظ على عملية التصبغ والنظام الداخل لتلك الخلايا ضد الأجهادات والألتهابات وضد مرض البهاق وذلك من خلال تعبير تلك الخلايا وزيادة أنتاج السيروتونين والذي بدوره يتحول الى الميلاتونين في الجلد عبر إنزيمات مختلفة وهنا يقوم الميلاتونين بدور مضاد للألتهابات من خلال تعزيز أنتاج مضادات الأوكسدة مثل SOD-1 والكلوتاثيون Glutathion في الجلد ضد الأجهادات ومرض البهاق (Slominski *et al.*, 2005).

أكتشفت فعالية السيروتونين ودوره الهام مع الجهاز المناعي بين 1984-1985 فقد أشارت الدراسات الجزيئية من خلال استخدام تقنية PCR الى دور السيروتونين مع الجهاز المناعي وأرتباطه مع أرتفاع مستويات السايوتوكينات يتبلور من خلال أملاك السيروتونين مستقبلات توجد على أسطح العديد من الخلايا المناعية ففي حالة الأصابة بمرض البهاق وتحت ظروف فسيولوجية ومرضية ألتهايبية ترتفع مستويات السيروتونين وهذا الأرتفاع يؤدي الى توسع الأوعية الدموية لمرور أكبر عدد من الخلايا المناعية مثل الخلايا التائية والبلاعم الكبيرة الى المنطقة المصابة كما يرتبط مع تلك الخلايا عبر مستقبلاته ليزيد تنشيطها وزيادة أطلاقها للسايوتوكينات الألتهايبية (Mossner and Lesch, 1998). كما فسرت الدراسات المختبرية العلاقة الأرتباطية بين الكورتيزول والسيروتونين التي ظهرت في بعض النتائج وذلك من خلال استخدام طرائق وتقنيات مختلفة لأثبات وجود تلك العلاقة الأرتباطية فقد اثبتت تلك الدراسات ان مستويات الكورتيزول ترتفع بأرتفاع مستويات

السيروتونين من الغدة الكظرية تأثراً بالأصابات او الأجهادات فقد أستخدمت تقنية الأشعاع المناعي المتخصص (Specific radioimmunoassay) بأستخدام السيروتونين المعلم بالأشعاع وبرهنت تلك الدراسة على وجود خلايا اشبه بالخلايا البدينة توجد في أنسجة الغدة الكظرية تعمل هذه الخلايا على إطلاق السيروتونين في حالة الأصابات المرضية والتعرض للأجهادات فترتفع مستويات السيروتونين في المصل وهذا الأرتفاع بدوره يحفز على إطلاق الكورتيزول وأرتفاع معدلاته ايضاً في المصل وذلك لأن السيروتونين يعمل على cAMP لخلايا التي تطلق الكورتيزول. وقد توصلت الدراسات المختبرية الى ان تثبيط أنتاج السيروتونين يصاحبه تثبيط لأطلاق الكورتيزول (Lefebvre et al., 1992).

أثبتت الدراسات وجود علاقة طردية بين تحفيز السايوتوكينات وبين إطلاق الكورتيزول بفعل الأصابة بالمرض هذا المسار يسيطر عليه بواسطة الدماغ ويسمى هذا المحور بـ (Stress- sensory axis) اذ ترتفع مستويات IL-2 في المصل ويصاحب هذا الأرتفاع تحفيز للغدة تحت المهاد لأطلاق هرمون CRH والذي بدوره يصل الى الغدة الصنوبرية ويحفزها على إطلاق ACRH ليصل الى الغدة الكظرية ويرتبط مع مستقبلات توجد على أسطح الكظرية ويحفز إطلاق الكورتيزول وأرتفاع مستوياته والذي يقوم بدور مثبط للجهاز المناعي (Lefebvre et al., 1992; Slominski et al., 2000; Chen and Lyga, 2014).

وفي دراسة أخرى أثبتت وجود ترابط بين السايوتوكينات ومنها الحركي الخلوي الثاني IL-2 وعامل التنخر الورمي TNF- α وفسر هذا الترابط من خلال مايقوم به الكورتيزول أثناء الأصابة اذ يزداد تركيز الكورتيزول في المصل وهذه الزيادة تحافظ على أستمرارية مايسمى بمحور (Hypothalamus –adrenal gland axis) تحت تأثير المرض ان تحفيز هذا المسار سوف ينشط العديد من الخلايا المناعية منها الخلايا الشجرية والخلايا اللمفاوية للوصول الى المنطقة الألتهايبية في الجلد وتحفيز اطلاق العديد من السايوتوكينات والمركبات الألتهايبية لذلك يلاحظ أزدیاد مستوياتها كما ينخفض أنتاج الجذور الحرة من خلال زيادة أنتاج مضادات الأكسدة مثل SOD-1 في الوقت نفسه يحفز الكورتيزول إطلاق بعض المواد من الخلايا البدينة مثل السيروتونين (Chen and Lyga,2014).

11.2.4. الأرتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق تبعاً لمدة الاصابة

كشفت نتائج البحث عن وجود أرتباطات مع مدة الأصابة وظهر هذا الأرتباط بشكل معنوي موجب لكافة المعايير المناعية مع مدة الأصابة المتراوحة من (1-80) شهر وعند مستوى أحتتمالية اذ كانت قيمة

الأرتباط للـSOD-1 مع TNF- α (0.890^{**}) بينما بلغت قيمة أرتباطه مع IL-2 (0.988^{**}) اما قيم أرتباطه مع السيروتونين والكورتيزول فقد بلغت (0.948^{**}) و(0.929^{**}) على التوالي ، كما أظهر معيار TNF- α أرتباطات معنوية موجبة مع كل المعايير والهرمونات اذ بلغت تلك القيم (0.923^{**})، (0.928^{**})، (0.847^{**}) مع كل من IL-2 ، السيروتونين والكورتيزول كما وأظهرت النتائج أرتباط IL-2 أرتباط معنوي موجب مع السيروتونين اذ بلغ (0.966^{**}) ومع الكورتيزول اذ بلغ (0.940^{**}) كما أرتبط السيروتونين مع الكورتيزول معنوياً ($P \leq 0.01$) عند قيمة ارتباط (0.967^{**}) كما في جدول (4-30).

جدول (4-30) يوضح الأرتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق لفترة الإصابة بين (1-80) شهر

العينة	الارتباطات	SOD-1 (Pg/ml)	TNF- α (Pg/ml)	IL-2 (Pg/ml)	Serotonin (ng/ml)
TNF- α (Pg/ml)	Correlation	.890 ^{**}			
	Sig.	.000			
IL-2(Pg/ml)	Correlation	.988 ^{**}	.923 ^{**}		
	Sig.	.000	.000		
Serotonin(ng/ml)	Correlation	.948 ^{**}	.928 ^{**}	.966 ^{**}	
	Sig.	.000	.000	.000	
Cortisol(μ g/dl)	Correlation	.929 ^{**}	.847 ^{**}	.940 ^{**}	.967 ^{**}
	Sig.	.000	.000	.000	.000

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

أظهرت نتائج الأرتباط لدى المجموعة الثانية من مدة الإصابة والتي تراوحت بين (81-160) شهر وجود أرتباطات معنوية موجبة عند مستوى احتمالية بين كل المعايير المناعية والهرمونات ماعدا الأرتباط بين السيروتونين والكورتيزول اذ كان الأرتباط موجب لكن عند مستوى احتمالية فقد برزت النتائج كما يلي أرتبط SOD-1 مع TNF- α عند قيمة (0.834^{**}) بينما ارتبط SOD-1 مع IL-2 بقيمة (0.964^{**}) بينما كان أرتباطه مع السيروتونين (0.986^{**}) ومع (0.627^*) بينما سجلت نتائج الأرتباط للـ TNF- α مع بقية المعايير كما يلي شهد قيمة الأرتباط مع IL-2 (0.866^{**}) وظهرت قيمة أرتباطه مع السيروتونين (0.818^{**}) ومع

الكورتيزول (0.828^{**}) هذا وكانت القيم الارتباطية لـ IL-2 مع السيروتونين (0.987^{**}) ومع الكورتيزول (0.742^{**}) بلغت القيمة الارتباطية (0.664^*) بين السيروتونين والكورتيزول كما في جدول (4-31)

جدول (4-31) يوضح الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق لفترة الإصابة بين (160-81) شهر

العينة	الارتباطات	SOD-1 (Pg/ml)	TNF- α (Pg/ml)	IL-2 (Pg/ml)	Serotonin (ng/ml)
TNF- α (Pg/ml)	Correlation	.834 ^{**}			
	Sig.	.001			
IL-2(Pg/ml)	Correlation	.964 ^{**}	.866 ^{**}		
	Sig.	.000	.001		
Serotonin(ng/ml)	Correlation	.986 ^{**}	.818 ^{**}	.987 ^{**}	
	Sig.	.000	.002	.000	
Cortisol(μ g/dl)	Correlation	.627 [*]	.828 ^{**}	.742 ^{**}	.664 [*]
	Sig.	.039	.002	.009	.026

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

تباينت قيم الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات وتدرج مستوى الاحتمالية للمجموعة المتراوحة من (161-240) شهر فقد أشارت النتائج الى ان ارتباط SOD-1 مع TNF- α كانت معنوية عند مستوى احتمالية وكانت قد بلغت قيمة الارتباط (0.854^*) كما هو الحال بالنسبة لارتباط SOD-1 مع IL-2 فقد كانت قيمة الارتباط (0.860^*) بينما احتفظ ارتباط SOD-1 بمعنويته عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$) مع السيروتونين ليبلغ قيمة (0.944^{**}) بينما فقد ارتباط SOD-1 بمعنويته وبشكل سلبي مع الكورتيزول ليبلغ مقدار

الأرتباط (-0.125) ، بينما كشفت نتائج الأختبار الخاصة بعامل TNF- α الى الأحتفاظ بمعنويته عند مستوى أحتتمالية ($P \leq 0.05$) مع IL-2 و السيروتونين لتبلغ قيم الارتباط (0.991^{**}) و (0.978^{**}) على التوالي اما أرتباطه مع الكورتيزول فقد كانت فاقد لمعنويته (0.083) هذا وأرتبط IL-2 مع السيروتونين معنوياً عند مستوى أحتتمالية ليلبغ (0.976^{**}) وفقد معنويته مع الكورتيزول (0.113) فقد الأرتباط بين السيروتين والكورتيزول معنويته بشكل سلبي ليلبغ (-0.002) كما في جدول (4-32).

جدول (4-32) يوضح الأرتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق لفترة الأصابة بين (161-240) شهر

العينة	الارتباطات	SOD-1 (Pg/ml)	TNF- α (Pg/ml)	IL-2 (Pg/ml)	Serotonin (ng/ml)
TNF- α (Pg/ml)	Correlation	.854*			
	Sig.	.031			
IL-2(Pg/ml)	Correlation	.860*	.991**		
	Sig.	.028	.000		
Serotonin(ng/ml)	Correlation	.944**	.978**	.976**	
	Sig.	.005	.001	.001	
Cortisol(μ g/dl)	Correlation	-.125	.083	.113	-.002
	Sig.	.814	.876	.831	.996

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

أشارت نتائج الدراسة عن الأرتباطات بين المعايير المناعية تبعاً لمدة الأصابة بالمرض للمجموعة التي تراوحت مدة الأصابة لها من (241-320) شهر اذ ظهرت الأرتباطات المعنوية الموجبة عند مستوى أحتتمالية بين SOD-1 وبين TNF- α وكانت القيمة الارتباطية (0.946^{**}) وكذلك بين SOD-1 IL-2 وكانت (0.936^{**}) كما ظهر أرتباط معنوي بين SOD-1 وبين السيروتونين لتصل قيمة الأرتباط (0.975^{**}) بينما أرتباط SOD-1 مع الكورتيزول فلم يكن معنوي (0.184). كما شهد TNF- α أرتباط معنوي مع IL-2 عند قيمة (0.998^{**}) وبين السيروتونين أيضاً (0.987^{**}) اما أرتباطه مع الكورتيزول فلم يكن معنوي (0.101) بينما

اظهر IL-2 معنوية في الارتباط مع السيروتونين (0.976^{**}) ولم يظهر معنوية مع الكورتيزول (0.055) كما فقد الارتباط معنويته بين هرموني السيروتونين والكورتيزول ليصل الى (0.171) كما في جدول (33-4)

جدول (33-4) يوضح الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق لفترة الإصابة بين (241-320) شهر

العينة	الارتباطات	SOD-1 (Pg/ml)	TNF- α (Pg/ml)	IL-2 (Pg/ml)	Serotonin (ng/ml)
TNF- α (Pg/ml)	Correlation	.946**			
	Sig.	.004			
IL-2(Pg/ml)	Correlation	.936**	.998**		
	Sig.	.006	.000		
Serotonin(ng/ml)	Correlation	.975**	.987**	.976**	
	Sig.	.001	.000	.001	
Cortisol(μ g/dl)	Correlation	.184	.101	.055	.171
	Sig.	.727	.849	.918	.746

*. Correlation is significant at the 0.05 level

**.. Correlation is significant at the 0.01 level

تبين ان المجموعة التي تراوحت مدة الإصابة لها من (321-400) ظهور المعنوية في الارتباطات بين SOD-1 وبين TNF- α اذ بلغت قيمة الارتباط (0.963^{**}) كما ظهرت معنوية الارتباط بين SOD-1 وبين السيروتونين اذ كانت قيمة الارتباط (0.792^{**}) وبينه وبين الكورتيزول اذ كانت القيمة (0.502^{**}) ، كما ظهرت الارتباطات المعنوية بين TNF- α وبين السيروتونين اذ بلغت قيمة الارتباط المعنوي (0.894^{**}) وكذلك بينه وبين الكورتيزول اذ كانت قيمة الارتباط (0.394^{**}) كما ظهر ارتباط معنوي لكن عند مستوى

أحتمالية بين السيروتونين والكورتيزول وظهرت قيمة الارتباط (0.278^*) اما بقية الارتباطات فقد كانت غير معنوية ومتباينة فقد كان الارتباط بين SOD-1 و IL-2 (0.012^-) بينما كان الارتباط بين IL-2 والسيروتونين فاقد للارتباط بشكل موجب (0.059^-) كما في جدول (34-4)

جدول (34-4) يوضح الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق لفترة الإصابة بين (321-400) شهر

العينة	الارتباطات	SOD-1 (Pg/ml)	TNF- α (Pg/ml)	IL-2 (Pg/ml)	Serotonin (ng/ml)
TNF- α (Pg/ml)	Correlation	.963**			
	Sig.	.000			
IL-2(Pg/ml)	Correlation	-.012	.007		
	Sig.	.930	.955		
Serotonin(ng/ml)	Correlation	.792**	.894**	.011	
	Sig.	.000	.000	.933	
Cortisol(μ g/dl)	Correlation	.502**	.394**	-.059	.278*
	Sig.	.000	.002	.652	.030

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

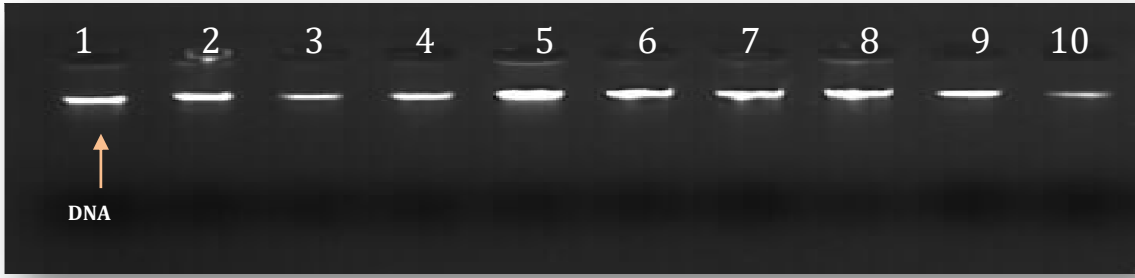
بين كل من (Muller and Schwarz, 2007) ان فقدان الارتباط بين السيروتونين والسايبتوكينات يعود الى زيادة إنتاج السايبتوكينات مثل IL-2 والأنترفيرون (Interferon) و TNF- α اذ تعمل هذه

السايتوكينات على زيادة أستهلاك التربتوفان (L-Tryptophan) والذي يعتبر البادئة لبناء السيروتونين نتيجة لزيادة تحويل التربتوفان الى مستقبلات سطحية لجزيئة الكلوتامين لذلك تنخفض مستويات السيروتونين وترتفع مستويات الكلوتامين. كما أشير لوجود ارتباط بين الكورتيزول وبين السايتوكينات من خلال الدراسة التي قام بها Larsson وآخرون (2009) والذي عزي فيها ارتفاع مستويات الكورتيزول بتقدم العمر والأصابة لدى كبار السن مقارنة بالصغار والبالغين وذلك بسبب وظيفة الكورتيزول على تثبيط فعالية الجهاز المناعي وكبح فعاليته الزائدة من خلال ارتفاع مستويات السايتوكينات وكذلك مقاومة الأجهاد ، وبما ان تقادم الأصابة والعمر يزيد من أنتاج الجذور الحرة (Free radicals) في الجلد لذلك تزداد مستوياته.

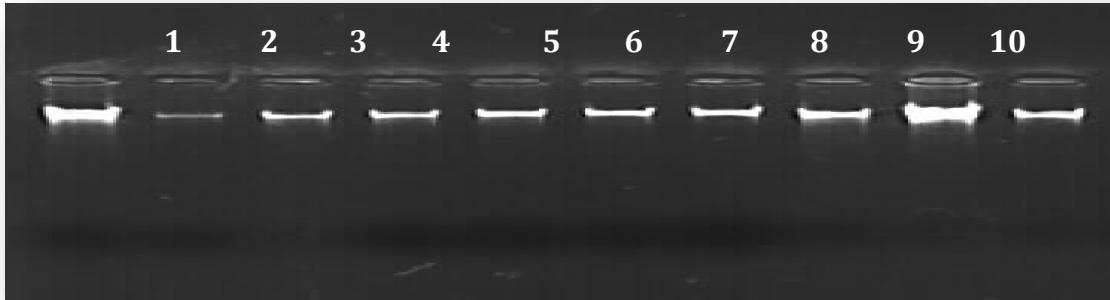
3.4. الدراسة الجزيئية ومرض البهاق

1.3.4. أستخلاص الـ DNA الكرموسومي من الدم

تم أستخلاص الـ DNA من عينات الدم المدروسة والتي بلغت 50 مجموعة تجريبية و50 عينة مثلت مجموعة السيطرة، وتم إجراء الترحيل الكهربائي للتأكد من وجود حزم الـ DNA الكرموسومي على وسط جل الأكاروز بتركيز 0.1 وعند فولتية 70 لمدة نصف ساعة وتمت مشاهدتها تحت جهاز الأشعة فوق البنفسجية بعد صبغها بالإثيديوم برومايد ، إذ أظهرت النتائج وجود حزم الـ DNA الكرموسومي في جميع العينات المدروسة للمجموعة التجريبية ومجموعة السيطرة كما في الشكل (4-22) و(4-23).



شكل (4-22) استخلاص DNA من (1-10) عينة لمرضى على هلام الاكاروز بتركيز 0.1 وعند فولتية 70 ولمدة نصف ساعة

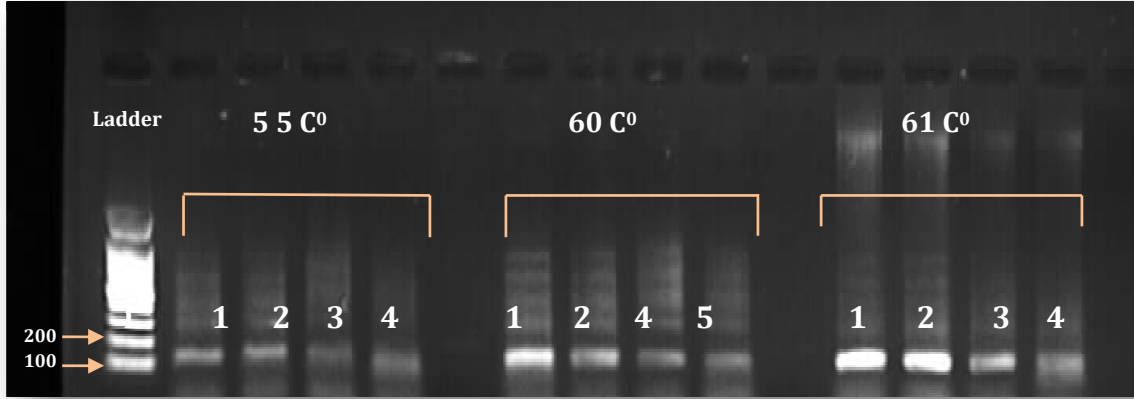


شكل (4-23) استخلاص DNA من (1-10) عينة لمجموعة السيطرة هلام الاكاروز بتركيز 0.1 وعند فولتية 70 ولمدة نصف ساعة

2.3.4. تحديد درجة الحرارة والظروف المثالية لجين IL-2RA بتقنية التدرج البلمرة المتدرجة-PCR Gradient

بعد استخدام تقنية البلمرة المتدرجة لدرجات حرارية مختلفة لتحديد درجة الحرارة المثلى لتضخيم القطع الهدف لجين IL-2RA اذ تراوحت درجات الحرارة ما بين (55-61) درجة مئوية لخطوة الأستطالة aneling step فقد وجد ان أنسب درجة حرارة لتضخيم القطع هي 61 درجة مئوية مع استخدام DNA

Ladder كمؤشر أثناء الترحيل على جل الأكاروز بتركيز 0.6 وعلى فولتية قدرها 70 فولت ولمدة ساعة كاملة وقد ظهرت نتائج البلمرة كما في الشكل التالي :



شكل (4-24) البلمرة المتدرجة للجين IL-2RA على هلام الأكاروز بتركيز 0.1 وعند مستوى فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة

3.3.4. نواتج بلمرة جين IL-2RA بتقنية PCR وتحديد الوزن الجزيئي للجين (PCR products)

تم تضخيم قطع النيوكليوتيد لجين IL-2RA عند درجة حرارة 61 في خطوة الأستطالة والتي تم تحديدها مسبقاً بتقنية التدرج وبأستخدام جهاز Thermo cycler PCR وتحت ظروف معينة اذ تم أستخدام DNA بتركيز $2.5 \mu\text{l}$ اذ تم الحصول على قطع النيوكليوتيدات والتي ظهرت بعد الترحيل على جل الأكاروز بتركيز 0.6 وبفولتية 70 ولمدة ساعة كاملة اذ تم مشاهدات القطع بشكل واضح جميع العينات المدروسة تقريبا (المجموعة التجريبية ومجموعة السيطرة) وبعد المقارنة مع DNA معلوم الوزن الجزيئي وجد ان الوزن الجزيئي للبادئة الواحد لجين IL-2RA قد بلغ اقل من 200pb (180 pb) وكما هو موضح في شكل للمجموعة التجريبية (4-25) ومجموعة السيطرة (4-26) :



شكل (4-25) نواتج عملية البلمرة IL-2RA gene PCR- product للمرضى الترحيل على هلام الاكاروز بتركيز 0.6 وعند فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة

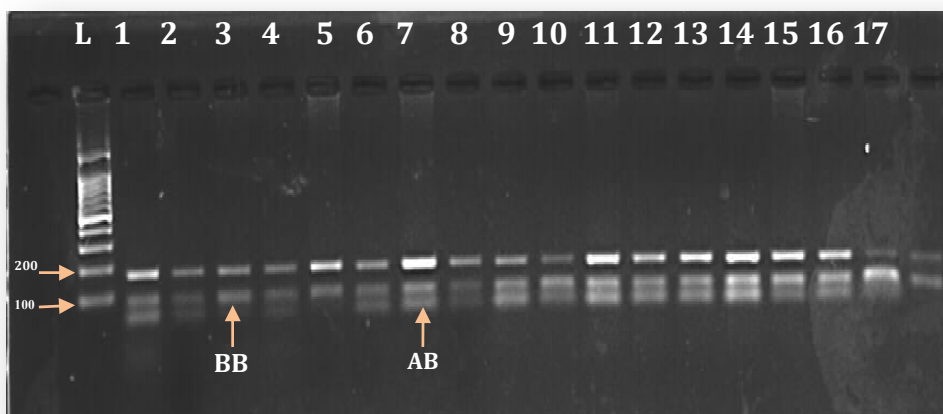
4.3.4. الكشف عن التغيرات الوراثي لجين IL-2RA وتردده بتقنية تحديد التغيرات الوراثي لقطع النكليوتيد باستخدام الانزيم القاطع (IL-2RA genotype polymorphisim with RFLP-PCR)

تم الحصول على نتائج التضخيم من تقنية IL-2RA genotype with RFLP-PCR وقد تبين ظهور مناطق قطع مختلفة التردد كما في الشكل (4-5) و(4-6) اما نتائج التغيرات الجيني فقد ظهرت ان نمط BB الذي يمثل منطقة القطع (rs2104286 SNP) هو الأكثر عدد ونسبة اذ بلغ عدده ونسبته لدى المرضى 37(74%) في حين بلغ عدده ونسبته لدى السيطرة 31(62%) في حين عدد ونسبة النمط AB والذي يمثل منطقة القطع (rs12722489 SNP) هو الاقل اذ بلغ لدى المرضى 13(26%) ولدى السيطرة 18(36%) هذا وقد كانت قيمة مربع كاي للنمط BB (39.417) عند مستوى احتمالية (0.0001) بينما كانت قيمة Odds (1.294) اما قيمة مربع كاي للنمط A (1.114) عند مستوى احتمالية (0.291) وبلغ قيمة Odds (4.643) اما فترة الثقة فقد تراوحت بين (1.198 -10.884) اما مربع كاي للنمط AB فقد بلغت (6.729) عند مستوى احتمالية (0.0095) اما قيمة Odds فقد كانت (987.411) بينما تراوحت فترة الثقة بين (0.880-3.347) كما تبين النتائج الظاهرة في جدول اعلاه ان النمط B هو الاكثر تردد اذ بلغ لدى المرضى (0.89) مقارنة مع النمط A (0.15) كما في جدول (4-35) :

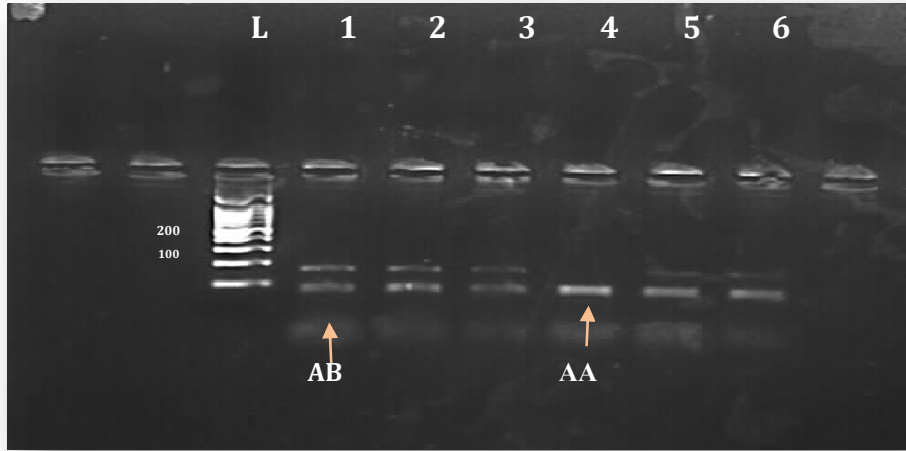
جدول (4-35) يوضح التغيرات الجيني لجين IL-RA باستخدام تقنية PCR- RFLP

C.I 95%	Odds ratio	P vale	X^2	المجموعات		IL-RA genotypes
				السيطرة (%)	المرضى (%)	
3.347 – 0.880	987.411	*0.0095	6.729	(%36)18	(%26)13	AB
1.198 -10.884	4.643	*0.0001	39.417	(%62)31	(%74)37	BB
مجموعة مقارنة				(%2)1	0	AA
Allelic frequency						
				0.67	0.15	A
				0.33	0.89	B

*. Correlation is significant at the 0.05 level



شكل (26-4) IL-2RA PCR- RFLP للمرضى على هلام الاكاروز بتركيز 0.2 وعند فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة



شكل (27-4) IL-2RA PCR- RFLP للسيطرة على هلام الاكاروز بتركيز 0.2 وعند فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة

تعد الوراثة أحد الأسباب المهمة في ظهور مرض البهاق (Shen *et al.*, 2016) فقد توصلت هذه الدراسة الى نتيجة ان الجين IL-2RA شديد الارتباط بمرض البهاق وهو أحد أسباب حدوثه نظراً عن التغيرات الوراثي الذي تم الكشف عنه بتقنية PCR-RFLP في الأليلات الخاصة بهذا المرض وقد تم التوصل الى نتيجة ان هذا الجين يمتلك ثلاث أنماط مختلفة على أساس مناطق القطع التي ظهرت على شكل أليلين متغايرين ووجد ان النمط BB (SNP rs2104286) هو الأكثر تردد ضمن مجموعة المرضى الذين تم اختيارهم مقارنة مع النمط AB (SNP rs12722489) لذلك فقد عُد هو الأليل B المسؤول عن الأمراض اذ له العلاقة بأنتاج وتعبير IL-2 ومستقبلاته على الخلايا التائية وبالتالي يحفز زيادة تمايزها وفعاليتها أتفقت هذه النتائج مع ما أشار اليه Lowe وآخرون (2007) اذ تناول هذه الدراسات نفس النتائج قيد الدراسة وقد برهنت هذه الدراسات ان جين *IL-2RA* قليل الارتباط والتأثير عن الأصابة بمرض السكري وتصلب الشرايين لكنه شديد الارتباط مع أمراض مناعية أخرى مثل البهاق اذ عُد هذا الجين هو أحد الجينات الخطيرة والمسؤولة عن مجموعة من الأمراض المناعية ومنها مرض البهاق ومرض أديسون. يتميز جين *IL-2RA* هو من الجينات شديدة الألفة والارتباط مع الجهاز المناعي والاستجابة المناعية كما يعد هذا الجين من الجينات الحساسة (Susceptible gene) والذي يرتبط بالإمراضية بالعديد من الأمراض المناعية مثل مرض السكري (نوع أول) المناعي (Diabetes mellitus) ومرض تصلب الشرايين Sclerolosis ومرض التيفوئيد Typhoide ومرض الذئبة

الأحمراري وكذلك مرض البهاق (Vitiligo) ويعد جين *IL-2RA* gene بالنسبة الى مرض البهاق من الجينات المرتبطة *candidate gene* اذ هو أحد الأسباب المرتبطة بالأمراضية (Barcellos *et al.*, 2006).

نظراً لأرتباط الجين بمجموعة من الأمراض المناعية لذلك فقد أقتراح ان هذا الجين هو احد الجينات المشتركة *share gene* التي تشترك في مسارات حيوية مختلفة لحدوث مجموعة من الأمراض وهذه الأقتراحات تدعم بواسطة مجموعة من البحوث التي تقوم على أساس وجود جينات ترتبط بأمراضية أكثر من مرض مناعي (Lowe *et al.*, 2007). تناولت البحوث دراسة جين *IL-2RA* gene وقد حددت مجموعة من SNPs (Single nucleotide polymorphisms) لدراسة التغيرات الوراثي واحدة من تلك المناطق هي (rs1570538) الواقعة على جين *IL-2RA* gene وجد ان هذه المنطقة تمتلك تتابع متغاير من النيكلوتيدات لدى مرضى البهاق والسكر نوع أول ومرضى تصلب الشرايين المناعي اذ تم تضخيم ذلك التتابع باستخدام تقنية PCR وبطريقة PCR-RFLP من خلال استخدام الإنزيم القاطع (MWIO enzyme) هذا الإنزيم له القدرة على كشف منطقة التغير وحدث القطع تحت ظروف معينة ، اذ وجد ان التتابع (rs1570538) يقع عند منطقة 3-Untranslated region (3-UTR) لجين *IL-2RA* gene (Alcina *et al.*, 2009). أشار Murayama وآخرون (2006) ان خطورة التغيرات في جين *IL-2RA* gene تكمن في كونه المسؤول عن زيادة التعبير الجيني للحركي الخلوي الثاني IL-2 ومستقبلاته في المصل والأنسجة وبما انه عامل ألتهاهي فله تأثير كبير على تطور المرض وكذلك يمتلك هذا الجين تأثير على الأستجابة المناعية لبعض المكونات المناعية الأخرى مثل تمايز الخلايا التائية (T-cells (Proliferation) وتنظيم عمل الخلايا المساعدة نوع أول (Th-1 regulation).

5.3.4 . تحديد نواتج (PCR products) والوزن الجزيئي لجين (308) *TNF-α* بتقنية ARMS-PCR

تم تضخيم قطع النيوكليوتيد لجين (308) *TNF-α* عند درجة حرارة 72 باستخدام جهاز PCR وتحت ظروف معينة اذ تم استخدام DNA بتركيز μl اذ تم الحصول على قطع النيوكليوتيدات والتي ظهرت بعد الترحيل على جل الأكاروز بتركيز 0.2 وبفولتية 70 ولمدة ساعة كاملة اذ تم مشاهدات القطع بشكل واضح جميع العينات المدروسة (المجموعة التجريبية ومجموعة السيطرة) وبأستخدام DNA معلوم الوزن الجزيئي Ladder اذ يبلغ وزنه الجزيئي (1000)pb حسب الشركة المصنعة له وبعد المقارنة مع DNA معلوم الوزن الجزيئي وجد ان الوزن الجزيئي للبادئة الواحدة لجين (308) *TNF-α* قد بلغ كما هو موضح في جدول (4-36):

جدول (4-36) يوضح الاوزان الجزيئية لجين TNF- α (308)

الحجم	الليل
180bp	Allel A
75bp	Allel G
-	Allel

6.3.4. الكشف عن التغيرات الوراثي لجين TNF- α وتردده بتقنية ARME-PCR (TNF- α genotype polymorphisim with ARMS-PCR)

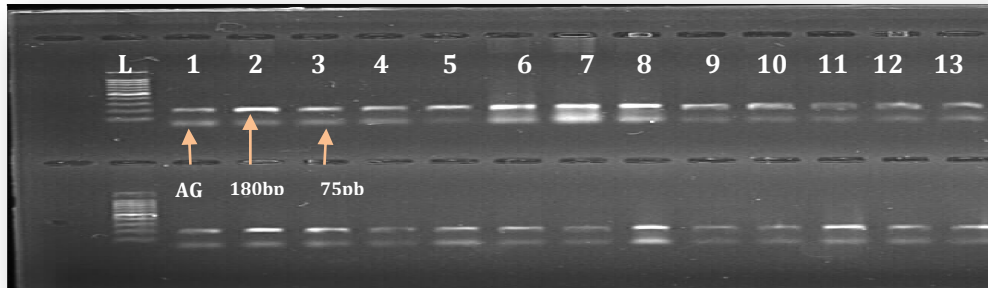
تم الحصول على نتائج التضخيم من تقنية ARMS-PCR with TNF- α (308) genotype كما في الشكل (4-8) اما نتائج التباير الجيني فقد ظهرت ان نمط AG هو الأكثر عدد ونسبة فقد بلغ لدى المرضى 48 (96%) بينما بلغت نسبته لدى السيطرة 47 (94%) هذا وقد بلغت قيمة مربع كاي (1.920) وتحت مستوى احتمالية (0.166) اما قيمة Odds فقد كانت (0.192) وتحت مستوى فترة ثقة كانت قد تراوحت بين (0.009 – 4.1043) بينما بلغ عدد ونسبة نمط GG 2 (4%) هذا وكان الأليل G هو الأكثر تردد لدى المرضى اذ بلغ (0.52) مقارنة مع الليل A والذي بلغ (0.48) كما في جدول (4-37):

جدول (4-37) يوضح التباير الجيني لجين TNF- α باستخدام تقنية ARMS-PCR

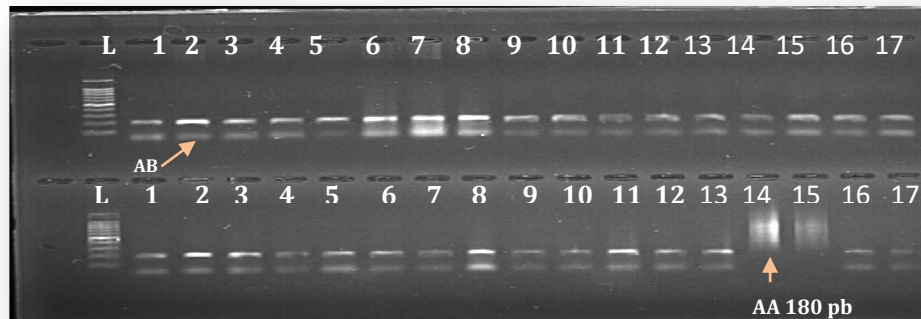
C.I 95%	Odds ratio	P-value	X ²	المجموعة		ARMS TNF- α
				السيطرة (%)	المرضى (%)	
0.009 – 4.1043	0.192	0.166	1.920	47 (94%)	48 (96%)	AG
		0.0848	2.971	0	2 (4%)	GG
				3 (6%)	0	AA

Allelic frequency						
				0.47	0.52	G
				0.53	0.48	A

*. Correlation is significant at the 0.05 level



شكل (28-4) TNF- α (308) gen with PCR-ARMS لمجموعة المرضى على هلام الاكاروز بتركيز 0.1 وعند مستوى فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة



شكل (29-4) TNF- α (308) gen with PCR-ARMS لمجموعة السيطرة على هلام الاكاروز بتركيز 0.1 وعند مستوى فولتية 70 ولمدة 45 دقيقة

7.3.4. الكشف عن التغيرات الوراثي لجين TNF- α بتقنية تبدلات الشريط المفرد ذات التغيرات الوراثي(TNF- α genotype polymorphisim with SSCP-PCR)

من خلال استخدام تقنية SSCP-PCR وبعد الترحيل على وسط الأكريلاميد تم الحصول على النتائج الظاهرة في جدول اذ تبين ان نمط A والذي يمثل الثلاث حزم هو الأكثر تردد في مرضى البهاق اذ بلغ 30(60%) مقارنة مع مجموعة الأصحاء والتي بلغ لديها 35(70%) بينما كان النمط B الذي يمثل الأربع حزم هو الأقل تردد اذ بلغ لدى المرضى 20 (40%) ولدى مجموعة السيطرة 15 (30%) هذا وقد سجل مربع كاي قيمة (1.099) وتحت مستوى احتمالية (0.295) بينما كانت قيمة Odds (1.555) وتحت مستوى ثقة تراوح بين اعلى وادنى قيمة (0. 679 – 3. 561) كما في جدول (4-38).

جدول (4-38) يوضح التغيرات الجيني لجين TNF- α SSCP باستخدام تقنية PCR- SSCP

C.I 95%	Odds ratio	P-value	X ²	المجموعة		TNF- α Pattern
				السيطرة (%)	المرضى (%)	
3. 561 – 0. 679	1.555	0.295	1.099	35(70%)	30(60%)	3 bands (A)
				15(30%)	20 (40%)	4 bands (B)

*. Correlation is significant at the 0.05 level

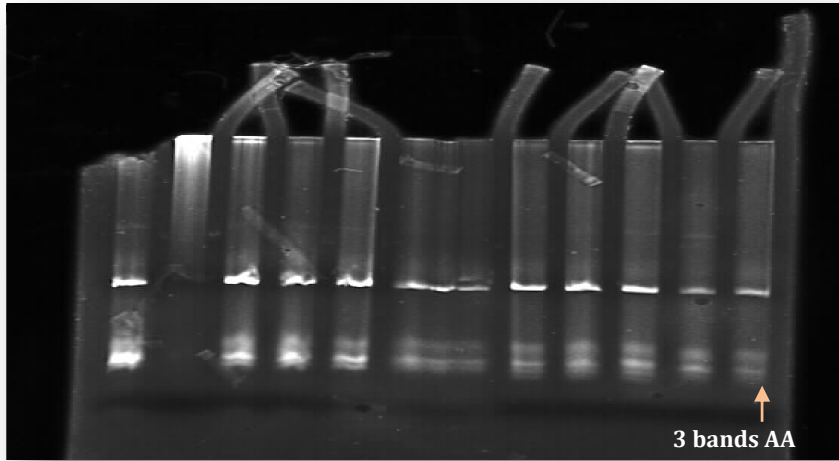
ان هذه التقنية تعتمد على شكل اوحجم الحزم التي ترحل على الأكريلاميد لذلك فقد أشارت النتائج في الجدول أعلاه ان النمط A (عدد الاحزمة 3) هو الأكثر تردد مقارنة مع النمط B (عدد الاحزمة 4) لكن تردده في المرضى اقل من مجموعة السيطرة. تم دراسة جين TNF- α كونه من الجينات المهمة ووثيقة الصلة

بمرض البهاق وقد تم التوصل من خلال نتائج البحث التي تم الحصول عليها لدراسة التغيرات الجينية لجين $TNF-\alpha$ gene من خلال استخدام طريقتين عبر تقنية PCR وهي طريقة (PCR-ARMS) وطريقة (PCR-SSCP) ومن خلال كلا التقنيتين تم الكشف عن وجد تغيرات جينية في الأليلات التابعة لجين $TNF-\alpha$ gene ففي تقنية PCR-ARMS وجد ان نمط AG هو الأكثر وفرة وبشكل معنوي لدى مرضى البهاق مقارنة مع السيطرة كما وجد ان اليل A هو الأكثر تردد في المجتمع قيد الدراسة مقارنة مع اليل G .

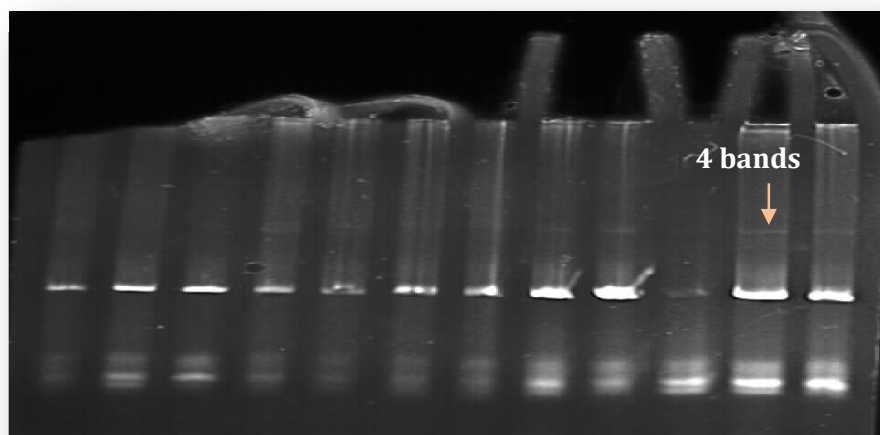
اما استخدام التقنية الأخرى وهي تقنية PCR-SSCP وهي التقنية الأكثر دقة اذ بينت تباين في عدد الأحملة الظاهرة وهذا التباين يكشف عن التغيرات الوراثي لجين $TNF-\alpha$ gene لمرضى البهاق . أتفقت هذه النتائج مع توصل اليه (Al-Harathi *et al.*, 2013) من خلال دراسته على التغيرات الوراثي لمرضى البهاق في السعودية لجين $TNF-\alpha$ وقد كشف عن وجود تغيرات وراثي لهذا الجين وبين ان النمط AG هو الأكثر سيادة وهو المسؤول عن أمراضية مرض البهاق ، بينما أشار Yazici وآخرون (2006) في نتائجه ان جين $TNF-\alpha$ gene له تأثير غير معنوي على المرض . يعد مرض البهاق مرض جلدي مكتسب ويتصف بكونه يعتمد على مجموعة من الجينات الحساسة المختلفة (Susceptible loci and genetic) وعلى الرغم من عدم تحديد الأسباب وراء حدوثه بشكل دقيق لحد الآن لكن تم اقتراح ان واحد من الأسباب التي تكمن وراء حدوثه هو ارتفاع مستويات عامل التنخر الورمي الذي يسبب الموت المبرمج للخلايا الميلانية لذلك تم دراسة الجينات المتعلقة بالتعبير الجيني وزيادة انتاج عامل التنخر الورمي $TNF-\alpha$ لمعرفة التغيرات الوراثي لهذا الجين ومقارنته بين المرضى والأصحاء وباستخدام تقنيات وراثية متنوعة (Al-Harathi *et al.*, 2013).

كشفت الدراسات الوراثية مؤخراً عن تفسير إمراضية البهاق من الناحية الوراثية من خلال وجود تغيرات في تتابع النيوكليوتيدات في بعض المواقع الحساسة (Susceptible loci) لجين $TNF-\alpha$ gene هذه التغيرات مسؤولة عن تغيير الاستجابة المناعية للجهاز المناعي الأولي والمتكيف في الجلد هذا التغيير يثير استجابة مناعية ضد الخلايا الميلانية تتولد من هذه الاستجابات المناعية التهابات تنتهي بفقدان الخلايا الميلانية وفقدان التصبغ في الجلد (Taieb, 2012) واحد من السايبتوكينات المتأثرة بهذه الاستجابة هو $TNF-\alpha$ اذ ترتفع مستوياته بشكل كبير والذي يلعب دوراً هاماً في إزالة التصبغ وظهور مرض البهاق (Moretti *et al.*, 2002). أبرز Taeib (2012) الدور الهام لعامل التنخر الورمي ودوره في حدوث الإمراضية وفقدان التصبغ للخلايا الميلانية ، في حين أشار (Sharma *et al.*, 2008) الى ان الجين المسيطر على إطلاق عامل التنخر الورمي يقع ضمن منطقة (Major histocompatibility) ضمن الكروموسوم السادس ويعد هذا الجين وثيق

الأرتباط من الناحية الوظيفية بجينات أخرى وهي جينات *HLA gene* بصنفها الأول *HLA-1 gene* والثاني *HLA-2 gene* ، كما بين وجود تغيرات في ذلك التابع ضمن منطقة المشغل 308 promoter (rs1800629) . يعد هذا الموقع شديد التأثير والألفة للأرتباط مع عامل الترجمة المحفز للبروتين الثاني (Braun *et al.*, 1996) . هذا التغير يؤدي الى أبراز الأليل A أكثر من الأليل الآخر G كما يؤدي الى زيادة الأطلاق لعامل التنخر الورمي وزيادة مستوياته في المصل وهذه الزيادة ترتبط معها أمراضية العديد من الألتهابات والأمراض المناعية الأخرى (Wilson *et al.*,1997). توصل Al-Harhi وآخرون 2013 الى ان النمط AG هو عامل خطورة شديد الأرتباط والتأثير على مرض البهاق مقارنة مع النمط AA و GG كما يعد أليل A هو الأكثر تردد لذلك عد أليل A هو الأليل المحفز للمرض اما الأليل G هو المقاوم للمرض كما برهن ان الأليل A هو الأكثر تعبيراً لعامل التنخر الورمي مقارنة مع الأليل G لذلك فأن الخطورة تكمن في هذا الأليل لحدوث البهاق وحدوث أمراض مناعية أخرى.



شكل (30-4) TNF- α (308) gen with PCR-SSCP لمجموعة المرضى الترحيل لمدة ساعتين على الاكريلايد عند مستوى فولتية 70



شكل (31-4) TNF- α (308) gen with PCR-SSCP لمجموعة السيطرة السيطرة الترحيل لمدة ساعتين على الاكرليمايد عند مستوى فولتية 70

4.4. العلاقة الارتباطية بين المعايير المناعية وبين الجينات

1.4.4. الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات تبعاً لجين IL-2RA

أرتفع متوسط SOD-1 عند الأليل AB (87.05 ± 735.14) بينما كان متوسطه (92.98 ± 680.99) عند الأليل BB لدى مجموعة المرضى كما أرتفع معدل TNF- α لدى الأليل AB ليبلغ (4.25 ± 14.23) مقارنة بالأليل BB والذي بلغ لديه (3.85 ± 12.47) كما أرتفع معدل IL-2 عند الأليل AB عن BB ليبلغ (100.40 ± 630.97) و (101.94 ± 570.97) على التوالي كما أرتفعت الهرمونات لدى الأليل AB وهي كل من السيروتونين (0.49 ± 1.00) والكورتيزول (15.54 ± 65.85) عن الأليل BB ليبلغ (0.42 ± 0.67) و (23.88 ± 57.43) على التوالي كما في جدول (39-4).

جدول (39-4) يوضح متوسطات المعايير تبعاً لجين IL-2RA لمجموعة المرضى

Sig	SD± Mean	الاليل	المعايير
0.04	87.05±735.14	AB	SOD-1(pg/ml)
	92.98±680.99	BB	
0.14	4.25±14.23	AB	TNF- α (Pg/ml)
	3.85±12.47	BB	
1.05	100.40±630.97	AB	IL-2(Pg/ml)
	101.94±570.97	BB	

0.01	0.49±1.00	AB	Serotonin(ng/ml)
	0.42±0.67	BB	
0.17	15.54±65.85	AB	Cortisol(µg/dl)
	23.88±57.43	BB	

لوحظ انخفاض مستويات جميع المعايير المناعية وهرمون الكورتيزول لدى الأليل AB لدى مجموعة السيطرة إذ بلغ معدل SOD-1 (58.53±230.79) ، TNF-α (1.54±7.29) ، IL-2 (36.68±227.25) ، أما الكورتيزول فقد بلغ (12.70±40.19) مقارنة مع مستوياتها لدى الأليل BB إذ بلغت تلك المتوسطات (68.36±232.44) ، (1.82±7.37) ، (3832.60±876.59) ، (19.86±40.99) عدا السيروتونين الذي لم يلاحظ له أي تغيير جذري بين الأليلين فقد متوسطه لدى الأليل AB (0.10±0.69) ولدى الأليل BB (0.11±0.69) كما في الجدول (40-4)

جدول (40-4) يوضح متوسطات المعايير تبعاً لجين IL-2RA لمجموعة السيطرة

Sig	SD± Mean	الاليل	المعايير
0.94	58.53±230.79	AB	SOD-1(pg/ml)
	68.36±232.44	BB	
0.89	1.54±7.29	AB	TNF-α(Pg/ml)
	1.82±7.37	BB	
0.53	36.68±227.25	AB	IL-2(Pg/ml)
	3832.60±876.59	BB	
0.53	0.10±0.69	AB	Serotonin(ng/ml)
	0.11±0.69	BB	
0.97	12.70±40.19	AB	Cortisol(µg/dl)
	19.86±40.99	BB	

من خلال الجداول أعلاه أتضح ان المعايير المناعية الثلاثة والكورتيزول والسيروتونين والكورتيزول شديدين الارتباط والتأثر بالنمط AB مقارنة مع النمط BB إذ ارتفعت تلك المعايير وبشكل معنوي لدى مجموعة المرضى الحاملين للنمط AB وهذه الزيادة تعكس الدور الوراثي للأليل B في تطور المرض وأنعكاسه على المتغيرات المناعية والهرمونية في الجسم ويظهر هذا التأثير الأنعكاسي من خلال التأثير على الجينات المشفرة

لذلك البروتينات وزيادة إنتاجها في الجسم أتفقت هذه النتائج مع بعض البحوث منها ما أشار إليه كل من (Murayama et al., 2006; Alcina et al., 2009) واللدان بينا وجود تغير في أليات جين *IL-2RA* gene وان الأليل B هو السائد لدى مرضى البهاق وان خطورة التغيرات في جين *IL-2RA* تكمن في كونه المسؤول عن زيادة التعبير الجيني IL-2 ومستقبلاته في المصل والأنسجة وبما انه عامل ألتهابي فله تأثير كبير على تطور المرض وكذلك يمتلك هذا الجين تأثير على الأستجابة المناعية لبعض المكونات المناعية الأخرى.

أظهر Cervantes وآخرون (2001) ان زيادة مستويات H_2O_2 و ROS في الخلايا الميلانية وان وجود تلك المركبات المؤكسدة سوف يحفز الخلايا الميلانية على تشفير الجينات بعض الجينات منها جين *IL-2RA* gene على أطلاق مواد بروتينية منها IL-2 و $TNF-\alpha$ لذلك يلاحظ زيادة مستويات كل منهما في الأشخاص المصابين بالبهاق لان تلك الخلايا الميلانية سرعان ماتتحطم في المناطق المصابة . توصلت بعض الدراسات الى وجود علاقة بين تحفيز السايوتوكينات وبين أطلاق الكورتيزول بفعل الأصابة بالمرض وهذا المسار يسيطر عليه بواسطة الدماغ اذ يحفز IL-2 عالي المستوى بتحفيز الغدة تحت المهاد لأطلاق هرمون CRH وهذا الهرمون سوف يصل الى الغدة الصنوبرية ويحفزها على أطلاق ACRH ليصل الى الغدة الكظرية ويرتبط مع مستقبلات توجد على اسطح الكظرية ليحفز أطلاق الكورتيزول وأرتفاع مستوياته ليقوم بدور الكابح للجهاز المناعي (Lefebvre et al., 1992) . كما يتأثر السيروتونين بالحركي الخلوي الثاني المنتج من قبل جين *IL-2RA* gene (Muller and Schwarz, 2007).

2.4.4. الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات تبعاً لجين ARMS-TNF- α

أظهرت النتائج المدونة في جدول (4-41) أنخفاض متوسط SOD-1 لدى الأليل AA عن متوسطه لدى الأليل AG اذ بلغ لدى الأثنين (76.80±699.47) و (94.98±702.79) على التوالي كما أنخفض متوسط $TNF-\alpha$ بشكل قليل لدى AA اذ بلغ (2.99±13.02) عن متوسطه لدى الأليل AG والذي بلغ لديه (4.13±13.18) بينما كان معدل IL-2 مرتفع لدى الأليل AA عن نظيره الأليل AG ليبلغ (42.46±615.33) و (106.53±594.12) على التوالي كما شهد السيروتونين أنخفاض قليل في معدله لدى الأليل AA مقارنة مع الأليل AG ليبلغ (0.27±0.79) و (0.48±0.80) على التوالي ، بينما عاد الكورتيزول ليرتفع معدله لدى الأليل AA ليبلغ عن الأليل AG ليبلغ (17.23±71.51) و (21.35±60.35) .

جدول (41-4) يوضح متوسطات المعايير تبعاً لجين ARMS-TNF- α لمجموعة المرضى

Sig	SD± Mean	الاليل	المعايير
0.96	76.80±699.47	AA	SOD-1(pg/ml)
	94.98±702.79	AG	
0.96	2.99±13.02	AA	TNF- α (Pg/ml)
	4.13±13.18	AG	
0.78	42.46±615.33	AA	IL-2(Pg/ml)
	106.53±594.12	AG	
0.98	0.27±0.79	AA	Serotonin(ng/ml)
	0.48±0.80	AG	
0.47	17.23±71.51	AA	Cortisol(μ g/dl)
	21.35±60.35	AG	

أشارت النتائج المدونة في جدول (42-4) الى انخفاض جميع مستويات المعايير المناعية لدى الأليل AA عن الأليل AG فقد لوحظ انخفاض مستويات SOD-1 عند الأليل AA اذ بلغت (43.18±220.51) وأرتفاعها عند الأليل AG والتي بلغت (66.59±232.71) كذلك هو الحال مع TNF- α فقد بلغ عند الأليلين AA وAG (1.01±7.23) و(1.78±7.35) على التوالي كما أنخفض كل من معدل السيروتونين والكورتيزول لدى أليل AA لتبلغ تلك المعدلات (0.06±0.68) و(0.11±0.69) على التوالي مقارنة مع الاليل AG اذ بلغت معه تلك المعدلات (0.11±0.69) و (18.49±40.82) على التوالي لمجموعة السيطرة.

جدول (42-4) يوضح متوسطات المعايير تبعاً لجين ARMS-TNF- α لمجموعة السيطرة

Sig	SD± Mean	الاليل	المعايير
0.76	43.18±220.51	AA	SOD-1(pg/ml)
	66.59±232.71	AG	
0.91	1.01±7.23	AA	TNF- α (Pg/ml)
	1.78±7.35	AG	
0.80	20.71±232.84	AA	IL-2(Pg/ml)
	3354.73±724.26	AG	
0.99	0.06±0.68	AA	Serotonin(ng/ml)
	0.11±0.69	AG	

0.94	9.15±40.03	AA	Cortisol(ug/dl)
	18.49±40.82	AG	

أضح من النتائج الظاهرة في الجداول أعلاه ان النمط AG هو نمط شديد التأثير على المعايير المناعية وان الأليل G هو المسيطر على تلك المتغيرات المناعية اذ أتفقت تلك النتائج مع ما أثبتته Al-Harhi وجماعته (2013) والذي بين ان النمط AG هو السائد لدى مرضى البهاق وهو المسؤول عن التشفير وزيادة التعبير الجيني وزيادة إطلاق مركب TNF- α وبالتالي فهو المسؤول عن الإراضية لمرضى البهاق اذ انه يسبب زيادة التحطم الخلوي للخلايا الميلانية عن طريق الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) لتلك الخلايا كما انه يسبب زيادة اطلاق للحركي الخلوي IL-2 كمركب التهابي بتحفيز من TNF- α . بينما أشارت البحوث الى وجود ارتباط بين السايوتوكينات والكورتيزول وبين SOD-1 والسيروتونين اذ تتأثر جميع تلك المعايير بالسايوتوكينات ومنها TNF- α بسبب وظيفة المناعية لكل من الكورتيزول وبقية المتغيرات الاخرى على فعالية الجهاز المناعي بفعل النشاط الزائد لـ TNF- α على الخلايا الميلانية وزيادة أنتاج الجذور الحرة (Free radicals) الناتج من تحطما لدى مرضى البهاق في الجلد (Larsson et al., 2009).

3.4.4. الفروقات بين المعايير المناعية والهرمونات تبعاً لجين SS CP-TNF- α

أظهرت نتائج المقارنة بين المعايير المناعية والهرمونات تبعاً لتغاير عدد الحزم التابعة لجين TNF- α فقد تبين أنخفاض تلك المعايير التابعة للحزمة من نوع CC عن الحزمة من نوع DD عدا هرمون السيروتين الذي أرتفع معدله عند الحزمة نوع DD وأنخفض عند الحزمة نوع CC اما بقية المعايير والتي شملت SOD-1 التي أنخفضت معدلاته لدى النمط نوع CC اذ بلغ (90.49±660.49) بينما كان مرتفع لدى النمط DD وقد بلغ المعدل (55.75±765.89) كذلك أنخفض متوسط TNF- α ليبلغ (3.81±11.53) عند النمط CC عن النمط DD ليبلغ (19.65±52.85) في الوقت نفسه أنخفض معدل IL-2 والكورتيزول ليبلغ (105.91±552.39) و(0.46±0.63) بينما كان لدى النمط (62.77±658.83) و(17.81±72.73) على التوالي كما في جدول (4-43)

جدول (43-4) يوضح متوسطات المعايير تبعاً لجين SS CP-TNF- α لمجموعة المرضى

المعايير	الاليل	SD± Mean	Sig
----------	--------	----------	-----

0.00	90.49±660.49	A	SOD-1(pg/ml)
	55.75±765.89	B	
0.00	3.81±11.53	A	TNF-α(Pg/ml)
	3.15±15.63	B	
0.00	105.91±552.39	A	IL-2(Pg/ml)
	62.77±658.83	B	
0.001	0.46±0.63	A	Serotonin(ng/ml)
	0.37±1.06	B	
0.001	19.65±52.85	A	Cortisol(μg/dl)
	17.81±72.73	B	

جاءت نتائج المقارنة مع المعايير المناعية والهرمونات تبعاً لجين TNF-α لمجموعة السيطرة متشابهة مع مجموعة المرضى إذ شهدت ظهور انخفاضات في كل المعايير عدا السيروتونين بين النمطين CC و DD إذ كان معدل SOD-1 (90.49±660.49) و (55.75±765.89) للنمطين على التوالي كذلك TNF-α فقد بلغ (3.81±11.53) و (3.15±15.63) على التوالي، بلغ IL-2 (105.91±552.39) و (62.77±658.83) ، السيروتونين فقد بلغ (0.46±0.63) و (0.37±1.06) وأخيراً بلغ الكورتيزول (19.65±52.85) و (17.81±72.73) على التوالي كما في جدول (44-4)

جدول (44-4) يوضح متوسطات المعايير تبعاً لجين SSCP-TNF-α لمجموعة السيطرة

Sig	Std. Error	SD± Mean	الاليل	المعايير
0.00	16.52	90.49±660.49	A	SOD-1(pg/ml)
	12.46	55.75±765.89	B	
0.00	0.69	3.81±11.53	A	TNF-α(Pg/ml)
	0.71	3.15±15.63	B	
0.00	19.34	105.91±552.39	A	IL-2(Pg/ml)
	14.04	62.77±658.83	B	
.001	0.08	0.46±0.63	A	Serotonin(ng/ml)
	0.08	0.37±1.06	B	
.001	3.59	19.65±52.85	A	Cortisol(μg/dl)

3.98	17.81±72.73	B
------	-------------	---

يلاحظ من الجدول أعلاه ان المعايير المناعية تتأثر بالنمط B رباعي الحزم أكثر من النمط A ثلاثي الحزم ويظهر التأثير الواضح للنمط B رباعي الحزم من خلال زيادة التعبير الجيني لتلك المتغيرات . لم تشير الدراسات الى استخدام تقنية PCR-SSCP لمعرفة تأثير النمط رباعي الحزم على تطور مرض البهاق . لكن استخدمت تقنيات وراثية أخرى فقد أشار Laddha وآخرون (2012;) الى ان عامل TNF- α يعد كأفراز جانبي (Paracrine inhibitor) للخلايا الميلانية ويلعب دوراً أساسياً في الأمراض المناعية منها مرض البهاق كأستجابة مناعية غير طبيعية ضد الخلايا الميلانية للجلد لمرضى البهاق اذ لوحظ ان TNF- α يمتلك مستويات عالية في المصل وقرح البهاق الظاهرة في الجلد والتي ظهرت بشكل فاقد للتصبغ اذ يلعب التغيرات الوراثي لمنطقة المشغل (Promoter region) للجينات المسؤولة عن تشفير TNF- α دوراً هاماً في تنظيم التعبير الجيني لأطلاق هذا العامل كما تشير الدراسات الحالية الى ان هذا التغيرات الجيني في منطقة المشغل مرتبطة الى زيادة الترجمة والتعبير الجيني لعامل TNF- α وزيادة مستوياته لمرضى البهاق هذا الارتفاع يؤدي الى زيادة تقدم المرض وظهور البقع على الجلد نظراً للدور الذي يقوم به من حدوث الموت الخلوي للخلايا الميلانية كما أشارت هذه الدراسة الى ان التغيرات الوراثي لجينات TNF- α تم دراستها بتقنيات (PCR-REAL TIME) وتقنية (PCR-RFLP) اما مستويات TNF- α في المصل فقد تم قياسها بواسطة تقنية الاليزا اذ كشفت النتائج لتلك التقنيات عن وجود تغير جيني يرافقه زيادة في مستويات TNF- α .

الاستنتاجات والتوصيات

CONCLUSIONS AND
RECOMMENDATIONS

الأستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الأستنتاجات:

وصف المرض تبعاً الى مناطق الأصابة في الجسم وهي المنتشر في كافة أنحاء الجسم والذي شكل النسبة الأكبر من الأصابة والمنتشر في الأطراف وهي النسبة الأقل من المنتشر في أنحاء الجسم تليها البطن والظهر ثم المنتشر في الوجه وهي النسب الأقل .

1. ترتفع مستويات المعايير المناعية SOD-1 ، TNF- α و IL-2 ، السيروتونين والكورتيزول لدى مرضى البهاق تدريجياً مع العمر والحالة الاجتماعية وصلة القرابة بين الوالدين.

2. يوجد تأثير للجنس على المعايير المناعية SOD-1 ، TNF- α و IL-2 السيروتونين والكورتيزول والمرض اذ لوحظ ارتفاع تلك المعايير مع الذكور دون الأناث.

3. وجود تأثير للتدخين على المرض وعلى المعايير المناعية SOD-1 ، TNF- α و IL-2 السيروتونين والكورتيزول.

4. وجود تأثير معنوي لمدة الأصابة على المرض اذ وجد تأثير كبير من خلال كثرة الأصابة بالمرض وعلى المعايير المناعية SOD-1 ، TNF- α و IL-2 السيروتونين والكورتيزول.

5. وجود ترابط بين المعايير المناعية الثلاثة SOD-1 ، TNF- α و IL-2 وبين المرض تبعاً للعمر .

6. وجود ترابط بين المعايير المناعية الثلاثة SOD-1 ، TNF- α و IL-2 وبين المرض تبعاً لمدة الأصابة.

7. وجود تغايرات وراثية لجين IL-2RA لدى مرضى البهاق وذلك من خلال زيادة تكرار نمط BB عند المرضى مقارنة بالسيطرة .

8. وجود تغايرات وراثية لجين TNF- α لدى مرضى البهاق وذلك من خلال زيادة تكرار نمط AG عند المرضى مقارنة مع السيطرة تبعاً لطريقة PCR-ARMS.

9. وجود ترابط بين الجينات وبين المتغيرات المناعية والهرمونات اذ كانت المستويات مرتفعة تبعاً للنمط AB وفقاً لطريقة PCR-RFLP بينما لوحظ ارتفاع تلك المستويات تبعاً للنمط B رباعي الحزم وفقاً لتقنية PCR-SSCP بينما لوحظ اختلاف تلك المستويات باختلاف الأنماط تبعاً لطريقة PCR-ARMS .

التوصيات:

1. قياس مستويات لمعايير مناعية اخرى مثل IL-8، CD4، CD8 بطريقة الأليزا.
2. دراسة عملية البلعمة المناعية في الدم او الجلد للمرضى.
3. دراسة بعض الجينات الاخرى المرتبطة بهذا المرض بطريقة PCR او طريقة REAL TIME
4. قياس مستويات بعض الانزيمات والهرمونات التي لها علاقة بالتسبب بهذا المرض مثل هرمون Melatonin و MSH- α و ACTH.
5. إجراء دراسة مناعية- وراثية على فئات عمرية دون سن العاشرة لمعرفة دور المناعة والوراثة في تقدم ذلك المرض .
6. إجراء دراسات نسجية مناعية ووراثية على الخزع المأخوذة من منطقة الاصابة للجلد في مناطق شتى من الاصابة .
7. إجراء دراسة لوظائف بعض الخلايا المناعية ومنها الخلايا التائية عن طريق تقنية flow cytometry
8. إجراء دراسة لدور الخلايا القاتلة Killer cells ودورها في حدوث الموت المبرمج للخلايا الميلانية.
9. قياس جزيئات miRNA بواسطة الأليزا لدى مرضى البهاق ودراسة الجينات التي تشفر هذه الجزيئات.

المصادر

REFERENCES

المصادر العربية :

الراوي ، خاشع محمود و خلف الله عبد العزيز(1980) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل ، العراق .

المصادر الأجنبية

- Abdel-Nasser, M.B. (1994).** Further evidence for involvement of both cell mediated and humoral immunity in generalized vitiligo. *J.Pigment Cell Research* . 7:1-8.
- Abraham, L.J. and Kroeger, K.M. (1999).** Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *Leukoc J. Biol.* 66: 562-566.
- Alaluf, S.;Atkins, D.;Barrett, K.;Blount, M. and Carter, N. (2002).** Heath A. Ethnic variation in melanin content and composition in photoexposed .and photoprotected human skin. *J.Pigment Cell Research*.15(2): 112-118.
- Alcina, A.;Fedetz, M.;Ndagire, D.; ndez, O. F.;Leyva, L.;Guerrero, M.; Abad-Grau, M.M.; Arnal, C.;Delgado, C.;Lucas, M.;Izquierdo, G. and Matesanz, F.(2009).** IL2RA/CD25 Gene Polymorphisms: Uneven Association with Multiple Sclerosis (MS) and Type 1 Diabetes (T1D) . *PLoS ONE* . 4 (1): 4137.
- Al-Gamdi , K.M. ;Kurrum , H. ; Taeib, A. and Ezzedin , K. (2012).** Treatment of generalized vitiligo with anti-TNF- α Agents . *J. of drugs in dermatology*. 11(4):534-9 .
- Al-Harthi, F.; Zouman, A.; Arfin, M.; Tariq, M. and Al-Asmari, A. (2013).** Tumor necrosis factor- α and - β genetic polymorphisms as a risk factor in Saudi patients with vitiligo. *Genetics and Molecular Research*. 12(3): 2196-2204 .
- Alikhan, A. ;Felsten, L.M. and Daly, M. (2011).** Petronic-Rosic V. Vitiligo: a comprehensive overview. Part I. Introduction, epidemiology, quality of

life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J Am Acad Dermatol* . 65: 473–491.

Alkhateeb, A.; Fain, PR.; Thody, A.; Bennett, DC. and Spritz, R.A. (2003). Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in cucasian pro nand and their families .*pigment Cell Res* . 16: 208-14.

Alkhateeb, A.; Stetler, G.L.; Old, W.; Talbert, J.; Uhlhorn, C. and Taylor, M. (2002). Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AIS1) to chromosome. *Hum Mol Genet* .11:661–71.

Al-Mashhadni,M. and Al-Mashhadni ,K.(1989). Experimental design and analysis .Baghdad university.p:63.

Alzolibani, A. (2009). Genetic epidemiology and heritability of vitiligo in the Qassim region of Saudi Arabia. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 18(3):119-25.

Antoniou, C.N. and Katsambas, S.A. (2009). Narrowband ultraviolet B phototherapy and 308-nm excimer laser in the treatment vitiligo: Areview. *J. Am Acad Dermatol*. 60:470-7.

Aslanian, F.P.;Filguera, A. and Cuzzi, T. (2010). Histopathology in Vitiligo . *Berlin Heidelberg*. 25–32.

Aune, T.M.;Golden, H.W. and McGrath, K.M. (1994). Inhibitors of serotonin synthesis and antagonists of serotonin 1A receptors inhibit T lymphocyte function in vitro and cell-mediated immunity in vivo. *J. of Immunology* .1.

Babar, ZU.;Alam, M.;Khondker, L.;Siddiqua, A.; Alam, MN. and Imdad T. (2013). Association of other Autoimmune Diseases in Vitiligo Patients. *CBM J*. 2 (2).

Balthasar, N. (2005) . Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *J. Cell* . 123: 493–505 .

- Barcellos, L.F.;Kamdar, B.B.;Ramsay, P.P.; DeLoa, C. and Lincoln, R.R. (2006).** Clustering of autoimmune diseases in families with a high-risk for multiple sclerosis: a descriptive study. *Lancet Neurol* . 5: 924–931.
- Barona, M.I. (1995).** An epidemiological case-control study in a population with vitiligo. *J. Am Acad Dermatol* . 33(4): 621-625.
- Bassiouny, D.A. and Shaker, O. (2011).** Clin Exp Dermatol . 36: 292–297.
- Behl, P.N. ;Aggarwal, A. and Srivasstava, G. (2003).** Vitiligo IN : Behl PN Srivastava G editors . *Practice of Dermatology 9th ed .CBS Publish : New Delhi.* 238-41.
- Behl, P.N. and Bhatia, R.K. (1971).** 400 case of vitiligo –A clinic therapeutic analysis . *Indian J. Dermatol* . 17:51-4.
- Bellet, J.S. and Prose, N.S. (2005).** Vitiligo in children: a review of classification, hypotheses of pathogenesis and treatment*. *An Bras Dermatol.* 80(6):633-7.
- Bilal, A. and Anwar I. (2014).** Guidelines for the management of vitiligo. *J. of Pakistan Association of Dermatologists.* 24 (1):68-78.
- Birlea, S.A. ;Ahmad, F.J. and Uddin, R.M. (2013).** *J. Invest Dermatol.* 10:1038-501.
- Bleehen, S.S. (1968).** Depigmentation of skin with 4- isopropyl catechol, mercaptoamines, and other compounds. *J. Invest Dermatol* . 50: 103-117.
- Braun, N.;Michel, U.;Ernst, B.P. and Metzner, R. (1996).** Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factoralpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and it's influence on the regulation of TNF-alpha production. *Neurosci. Lett.* 215: 75-78.
- Brenner, M. and Hearing, V.J. (2008).** The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology.* 84(3) : 539-549.
- Burns-Cox, C.J. and Pearson, J.E. (1972).** Addison's disease, vitiligo and multiple autoantibodies. *J. Postgraduate Medical* 48: 115-117.

-
- Bystryn, J.C. and Naughton, G.K. (1985).** The significance of vitiligo antibodies. *J. Dermatol* . 12:1-9.
- Cervantes, C.; Esparza M.M. and Perez,C. (2001).** *J Cell Sci* . 114: 2335–2344.
- Charaka, S. (1949).** Editor With translation by the Shree Gulab kunverba society. *Chikitsa Sthana Jamnagar India* . 4.
- Chen, I.T. and Jimbow, K. (1994).** Comparison in expression of tyrosinase, TRP-1, and c-Kit between normal human melanocytes and “vitiligo”melanocytes. *Pigment cell Research* . 24 (3).
- Chen, Y. and Lyga, J. (2014).** Brain-Skin Connection: Stress, Inflammation and Skin Aging. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 13(3): 177–190.
- Corporaal, S. ; Bijl, M. and Kallenberg, C.G. (2002).** Familial occurrence of autoimmune diseases and autoantibodies in a Caucasian population of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* . 21: 108–113.
- Costin, G.E. and Hearing, VJ. (2007).** Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*. 21(4) : 976-994.
- Cucchi, M.L.;Frattini, P.;Santagostino, G.;Preda, S. and Orecchia, G. (2003).** Catecholamines increase in the urine of non-segmental vitiligo especially during its phase .*pigment Cell Res*. 16: 111.
- Daneshpazhooh, M.; Mostofizadeh, G.M.; Behjati, J.; Akhyani, M. and Robati , R.M. (2006).** Antithyroid peroxidase antibody and vitiligo: a controlled study. *BMC Dermatol*. 10:1-5.
- Delatorre, G.;Oliveira, C.A. Chaves, T.P. Linsingen R.F. and Castro, C.C. (2013).** A study of the prognosis of vitiligo during pregnancy *Surg Cosmet Dermatol* .5(1):37-9.
- Delijewski, M. ;Beberok, A. ;Otręba, M. ;Wrześniok, D. ;Rok, J. and Buszman, E. (2014).** Effect of nicotine on melanogenesis and antioxidant status in HEMn-LP melanocytes. *Environ Res*. 134:309-14.
-

- Denat, L. ;Kadekaro, A.L. ;Marrot, L. ;Leachman, S.A. and Abdel-Malek, Z.A. (2014).** Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. *J. of Investigative Dermatology advance online publication*.27 (65).
- Denman, C.J. ;McCracken, J. ;Hariharan, V. ;Klarquist, J. ;Oyarbide-Valencia, K. ;GuevaraPatiño, J.A. and Le Poole, I.C. (2008).** HSP70i accelerates depigmentation in a mouse model of autoimmune vitiligo. *J Invest Dermatol*.128: 2041-2048.
- Deo, S.S ; Bahgat, A.R. and Shah R.N. (2011).** Genetic variation in NALP1 mRNA expression in human vitiligo . *Indian J. Dermatology* . 56(3):266-271.
- Dideberg, V. ;Kristjansdottir, G.;Milani, L.;Libioulle, C. and Sigurdsson, S. (2007).** An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. *Hum Mol Genet* .16: 3008–3016.
- Dorazio, J. A. (2006)** . Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV-induced tanning. *Nature J*. 443: 340–344.
- Elethawi, A. M. (2013).** Herpes Simplex Labialis Virus is A Risk Factor for Vitiligo (Post- Herpes Simplex Labialis Vitiligo). *the iraqi postgraduate medical J*. 12(3):401-403.
- Elgendy, A. ; Alshawadfy, E. ;Ali, E. Wadea, N. ;Khalil, K. ;Alkady, O. and Elsaidi, A. (2016).** Association of HLA Class I and II Antigens with Vitiligo in Egyptian Population. *J. Molecular Enzymology and Drug Targets* .2 (1): 8.
- Eser, G.A. ; Sözmen, Y. ; Kanit, L. ; Menteş, G. ; Ersöz, B. Kutay, F. Z. (1998).** Age-Related Alterations in Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Rat Brain . *Tr. J. of Medical Sciences* 28 : 491-494.
- Everts, R.E., Rothuizen, J. and van Oost, B.A. (2000).** Identification of a premature stop codon in the melanocyte-stimulating hormone receptor gene (MC1R) in labrador and golden retrievers with yellow coat colour. *Anim. Genet*. 31: 194–199 .

-
- Fawzy, N. and Rashed, L. (2012).** Study of Oxidative Stress in Vitiligo and Use of Narrow Band UVB-311 as a Method of Treatment. *J. Rad. Res. Appl. Sci.* 5(5): 937 - 954 .
- Fleg, J. ; Hamp, R. ; Cernochova, D. ; Preiss, M. ; Bicikova, M. ; Sieger, L. Priplatova, L. ; Kankova, S. and Klose, J. (2012).** The relation of cortisol and sex hormone levels to results of psychological, performance, IQ and memory tests in military men and women. *Neuro Endocrinol Lett.* .33(2):224-35.
- Gauthier, Y.;Cario-Andre, M.;Lepreux, S.; Pain, C. and Taieb, A. (2003).** Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo . *Br J. Dermatol.* 148: 95-101.
- Gawkrodger, D.J.; Ormerod, A.D. and Shaw, L. (2008).** Guideline for the diagnosis and management of vitiligo. *Br J. Dermatol.* 159:105176.
- Gendreau, I. Angers, L. Jean J. and Pouliot R.(2013).** Pigmented Skin Models: Understand the Mechanisms of Melanocytes. *Regenerative Medicine and Tissue Engineerin.*759-786.
- Giovannelli, L. ; Bellandi, S. and Pitozzi, V. (2004).** *Mutat Res.* 556: 101–106.
- Glassman, S.J. (2011).** Vitiligo, reactive oxygen species and T-cells. *Clinical Science (Lond).*120(3) 99-120.
- Hamilton, L.D. ; Rellini, A.H. and Meston, C.M. (2008) .** Cortisol, Sexual Arousal, and Affect in Response to Sexual Stimuli *J. Sex Med.* 5(9): 2111–2118.
- Hann, S.K. and Lee H.J. (1996).** Segmental vitiligo: clinical findings in 208 patients. *J. Am Acad Dermatol.* 35:671-4.
- Hann, S.K. and Nordlund, J.J. (2000).** Definition of vitiligo. In: Hann SK, Nordlund JJ, editors. *Vitiligo. A monograph of the basic and clinical science.* Oxford: Blackwell Science Ltd. 3-5.
- Hann, S.K.; Chang, J.H.; Lee, H.S. and Kim, S.M. (2000).** The classification of segmental vitiligo on the face. *Yonsei Med J.* 41:209-12.
-

-
- Harman, D. (1993).** Free radical involvement in aging: Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs and aging* . 3: 6080.
- Harning, R. ;Cui, J. and Bystry, J.C. (1991).** Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo. *J. Invest Dermatol* .97:1078-1080.
- Hazneci, E. ; Karabulut, A.B. Ozturk, C. Batcioglu, K.; Dogan, G. and Karaca, S. (2005).** A comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities and nitrate levels of vitiligo patients. *Int J. Dermatol* .44:636-40.
- Hoehn, K. and Marieb, E.N. (2010).** Human Anatomy & Physiology. *San Francisco: Benjamin Cummings*. 1-17.
- Huang , C.L.;Nordlund, J.J. ;Boissy, R. and Am, J. (2002).** Vitiligo: a manifestation of apoptosis. *Clin Dermatol* . 3: 301–308.
- Hwang, J.H. ;Ahn, J.S. ;Kim, S.D. ;Lim, J.G. ;Kim, Y.G. ;Kim, K.H. and Park , K.C. (1999).** The changes of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 after systemic steroid treatment in vitiligo. *J. Dermatol Sci*. 22(1):11-6.
- Ignatowicz, E. ;WoŹniak, A. ;Kulza, M. ;SenczukPrzyb, M. (2013).** Exposure to alcohol and tobacco smoke causes oxidative stress in rats. *Pharmacological Reports* . 65:906-913.
- Jain, A. ;Mal, J. ;Mehndiratta, V. ;Chander, R. and Kumar, S. (2011) .** Patra Study of Oxidative Stress in Vitiligo. *Ind J. Clin Biochem* 26(1):78–81.
- James, W.D.;Berger, T.G. and Elston, D.M. (2006).** Disturbance of pigmented ;In Andrews Disease of the skin ,Clinical Dermatology . 10th edition; *W.B. Saunders Elsevier Company ,Canada*. 860-862.
- Jiao, L. ; Gan, D. and Fang, Y. (1998).** Effects of smoking on interleukin-2 and its receptor system in human peripheral blood . *Wei Sheng Yan J*. 27(6):385-8.
-

- Jin , Y. ;Mailloux , C.M. ;Gowan , K. and Riccardi , S.L. (2007).** NALP1 in vitiligo-association multiple autoimmune disease . *Engl J. Med* .356:1216-25.
- Johansson ,O. ;Liu, P.Y. and Bondesson , L. (2015).** A Serotonin – like Immunoreactivity in human Cutaneous M elanocytes. *J. of investigative Dermatology* .111(6):1010-4.
- Jorgensen, K.T.;Pedersen, B.V. ;Nielsen, N.M.;Jacobsen, S. and Frisch, M. (2012).** Childbirths and risk of female predominant and other autoimmune diseases in a population-based Danish cohort. *J. Autoimmun.* .38(2-3): 81-7.
- Kasakura, S. and Lowenstein, L. (1965).** A factor stimulating DNA synthesis derived from the medium of leukocyte culture. *Nature* . 208:794-795.
- Kemp, E.H. ;Gavalas, N.G. ;Gawkrodger D.J. and Weetman, A.P. (2001).** Autoantibody responses to melanocytes in depigmented skin disease vitiligo. *Autimmun Rev.* 23:1 –22.
- Kemp, E.H. ;Gavalas, N.G. ;Gawkrodger, D.J. and Weetman, A.P. (2007).** Autoantibody responses to melanocyte in the depigmentation skin disease vitiligo . *Autoimmune Rev.* 6: 138-142.
- Kemp, E.H. ;Emhemad, S. ;Akhtar, S. ;Watson, P.F. ;Gawkrodger, D.J. and Weetman, A.P. (2011).** Autoantibodies against tyrosine hydroxylase in patients with non-segmental (generalised) vitiligo. *Exp Dermatol.*20: 35-40.
- Khan, R. ;Satyam, A. ;Gupta, S. ;Sharma, V.K. and Sharma, A. (2009).** Circulatory levels of antioxidants and lipid peroxidation in Indian patients with generalized and localized vitiligo. *Arch. Dermatol. Res.* 301, 731–737.
- Kim, J.H.;Lee, S.M.;Myung, C.H.;Lee, K.R.;Hyun, S.M.;Lee, J.E.;Park, Y.S.; Jeon, S.R.;Park, J.I.;Chang, S.E. (2015).** Melanogenesis inhibition of β -lapachone, a natural product from *Tabebuia avellanedae*, with effective in vivo lightening potency. *Arch. Dermatol. Res.* 307: 229–238.

- Klarquist, J.;Denman, C.J. ;Hernandez, C. ;Wainwright, D.A. ; Strickland, F.M. and Overbeck, A. (2010).** Reduced skin homing by functional Treg in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23: 276-86.
- Koca, R. ; Armutcu, F. ;Altinyazar, H.C. and Gurel, A. (2004).** Oxidant-Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in generalized vitiligo. *Clin Exp Dermatol* . 29:406-9.
- Kosaka, N. ; Iguchi, H. and Ochiya, T. (2010) .** Cancer . J. Sci . 101: 2087–2092.
- Kostovic ,K. and Pasic, A. (2005).** New treatment modalities for vitiligo: focus on topical immunomodulators. *Drugs* .65(4) 447-459.
- Kotobuki, Y.;Tanemura, A. and Yang, L. (2012).** Pigment Cell . *Melanoma Res* . 25: 219–230.
- Kovacs, S.O. (1998).** Vitiligo. *J. Am Acad Dermatol* .38:647-66.
- Kroll, T.M. ;Bommiasamy, H. ;Boissy, R.E. ;Hernandez, C. ;Nickoloff, B.J. Mestrl, R. and Le Poole, I.C. (2005).** 4-tertiary butyl phenol exposure sensitizes human melanocytes to dendritic cell-mediated killing: relevance to vitiligo. *J Invest Dermatol.*124: 798–806.
- Laddha, N.C. ;Dwivedi, M. ;Begum R. (2012).** Increased Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and Its Promoter Polymorphisms Correlate with Disease Progression and Higher Susceptibility towards Vitiligo . *PLoS One.* 7(12).
- Laddha, N.C. ;Dwivedi, M. ;Mansuri, M. S. ;Amina R. ;Ansarullah G. ;Ramachandran, A. V. ;Dalai, S. and Begum, R. (2013).** Vitiligo : interplay between oxidative stress and immune system. *John Wiley & Sons A/S, Experimental Dermatology* . 1-5.
- Lapeere, H. ; Boone, B. ; Schrapper, S. D. ; Verhaeghe, E. and Naeycart, J. (2008) .** Hypomelanosis and Hypermelanosis. *in Klaus Goldsmith Lowell.* 264-29.

-
- Larsson, C. A. ; Bo, G.; L. Rastam and Lindblad, U. (2009).** Salivary cortisol differs with age and sex and shows inverse associations with WHR in Swedish women: a cross-sectional study. *licensee BioMed Central Ltd* 9-16.
- Le Poole, I. and Luiten R. (2008).** *Curr Dir Autoimmun* . 10: 227–243.
- Le Poole, I. C.; Wijngaard, R.M. and Westerhof, W. (1996).** *Am J Pathol* . 148: 1219– 1228.
- Lee, A.Y. ; Kim, N.H. ; Choi, W.I. and Youm Y.H. (2005).** Less keratinocyte-derived factors related to more keratinocyte apoptosis in depigmented than normally pigmented suction-blistered epidermis may cause passive melanocyte death in vitiligo. *J. of Investigative Dermatology* . 124(5): 976-983.
- Lee, D.Y. ;Kim, C.R. and Park, J.H. (2011).**The incidence of leukotrichia in segmental vitiligo: implication of poor response to medical treatment. *Int J. Dermatol.*50:925-927.
- Lee, J. Taneja, V. and Vassallo, R. (2012).** cigarette smoking and Inflammation: cellular and Molecular Mechanisms . *J . Dent Res* . 91(2):142-149.
- Lefebvre, H. ; Contesse, V. ; Delarue, C. ; Feuilleley, M. ; Hery, F. ; Grise P. Raynaud G. ; Verhofstad, A.A.J. ; Wolf, L.M. and Vaudry H. (1992).** Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin receptor subtype. *Neuroscience* . 47(4) : 999–1007.
- Lerner, A.B. (1959).** Vitiligo *.J.Invest Dermatol* . 32:285-310.
- Lerner, A.B. (1971).** On the etiology of vitiligo and gray hair. *J. Am J Med* . 51: 141-147.
- Levy, C.; Khaled, M. and Fisher, D. E. (2006).** MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* 12: 406–414.

-
- Lewis, S.M. ; Bain, B.J. and Bates, I. (2001)** . Dacie and Lewis practical hematology. 19th ed. *Churchill livingstone*. 1-5.
- Leykon, J.F. and Vays, P.G. (2000)**. The basis of endocrinology Trans. from English. *J. Medicine*. 504 .
- Lili, Y.; Yi, W. and Ji Y. (2012)**. Plos one . 7: e37513.
- Lin, J. Y. and Fisher, D. E. (2007)**. Melanocyte biology and skin pigmentation . *J. Nature* . 445(22):10.1038.
- Lowe, C.E. ; Cooper, J.D. ; Brusko, T. ; Walker, N.M. and Smyth, D.J. (2007)**. Largescale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet* 39: 1074–1082.
- Majumder, P.P.; Nordlund, J.J. and Li, C.C. (1993)**. Pattern of familial aggregation of vitiligo. *Arch Dermatol*. 129:994-998.
- Maresca, V. ; Roccella, M. ; Roccella, F. Camera, E.; Del Porto, G. and Passi, S. (1997)**. Increased sensivity to peroxidative agents as a possible pathogenic factor of melanocyte damage in vitiligo. *J. Invest Dermatol* . 109:310-3.
- Marks, M.S. and Seabra, M.C. (2001)**. The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nature Review Molecular Cell Biology* .2(10) 738-748.
- Mattoo, S.K. ; Handa, S.; Kaur, I.; Gupta, N. and Malhotra, R. (2002)**. Psychiatric morbidity in vitiligo: prevalence and correlates in India. *J. Eur Acad Dermatol Venereol*. 16: 573-8.
- Michelsen, D. (2010)**. Med Hypotheses . 74: 67–70.
- Minet, A.D. and Gaster, M . (2010)**. ATP synthesis is impaired in isolated mitochondria from myotubes established from type 2 diabetic subjects . *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 402 : 70-74.
-

-
- Mockus, S.M., and Vrana, K.E. (1998).** Advances in the molecular characterization of tryptophan hydroxylase. *J. Mol. Neurosci.* 10, 163–179.
- Mohammed, G.F. ;Gomaa, A.H., and Al-Dhubaibi, M.S. (2015).** Highlights in pathogenesis of vitiligo. *World J. Clin. Cases* 3, 221–230.
- Moretti, S. ;Spallanzani, A. and Amato, L. (2002).** New insights into the pathogenesis of vitiligo: imbalance of epidermal cytokines at sites of lesions. *Pigment Cell Res .* 15: 87–92.
- Mossner, R. and Lesch, K.P. (1998).** .Role of Serotonin in the Immune System and in Neuroimmune Interactions. *Regular Article .*12(4) : 249–271.
- Muller, N. and Schwarz, M.J. (2007).** The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol Psychiatry.*12(11):988-1000.
- Murayama, A. ; Sakura, K. ; Nakama, M. ; Yasuzawa-Tanaka, K. and Fujita, E. (2006).** Specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. *EMBO J .*25: 1081–1092.
- Nair, B.K. (1978).** Vitiligo – a retrospect . *Int J. Dermatol.* 17: 755-7.
- Narita, T. ; Oiso, N. ; Fukai, K. ; Kabashima, K. ; Kawada, A. and Suzuki, T. (2011).** Generalized Vitiligo and Associated Autoimmune Diseases in Japanese Patients and Their Families. *Allergology International.* 60(4):505.
- Nath, S.K. ;Majumder, P.P. and Nordlund, J.J. (1994).** Genetic epidemiology of vitiligo: Multilocus recessivity cross-validated. *Am J. Hum Genetic .*55:981-990.
- Nelson, B.H. (1998).** Willerford D. M., *Immunol.* 70, 1.
- Nigam, P.K. ; Patra, P.K. and Khodiar, P.K. (2011).** *Indian J Dermatol Venerol Leprol.* 77: 111.
-

-
- Njoo, M. D. and Westerhof, W. (2001).** Vitiligo : Pathogenesis and treatment ,*A m J. Clin Dermatology* .2 : 167.
- Nordlind, K.; Azmitia, E.C. and Slominski, A. (2008).** The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. *Exp. Dermatol.* 17:301–311.
- Nordlund, J.J. and Majumder, P.P. (1997).** Recent investigations on vitiligo vulgaris: advances in clinical research. *Dermatol Clin.* 15:69-78.
- Norris, D.A. ;Kissinger, R.M. and Naughton, G.M. (1998).** Evidence for immunologic mechanisms in human vitiligo: patients' sera induce damage to human melanocytes in vitro by complement-mediated damage and antibody-dependent cellular toxicity. *J. Invest Dermatol* . 90:783-789.
- Nunes, D. H. and Esser, L. M. (2011).** Vitiligo epidemiological profile and the association with thyroid disease . *An Bras Dermatol.* 86(2):241-8.
- Oh, E.J. ; Park, J. ; Lee, J.E. ; Myung, C.H. ; Kim, S.Y. ; Chang, S.E. and Hwang, J.S. (2016).** ANovel Role of Serotonin Receptor 2B Agonist as an Anti-Melanogenesis Agent *Int. J. Mol. Sci.* 17: 546.
- Orita, M.;Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989).** Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophories as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natd. Acad. Sci. USA.* 86: 2766-2770.
- Ortonne, J.P. ;Bahodoran, P. ; Fitzpatrick, T.B. ;Mosher, D.B. and Hori , Y. (2003).** Hypomelanoses and hypermelanoses. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* 6th ed. New York. 839-47.
- Ortonne, J.P. and Bose, S.K. (1996).** Vitiligo:where do we stand? *Pigment Cell Research* .6: 61-72.
- Passeron, T. ; Ballotti, R. and Ortonne J.P. (2005).** Mélanogénèse. *EMC Dermatologie Cosmétologie.*2 :204-216 .

-
- Petrescu, F.; Cosmin, S. and Silosi I. (2010).** Tumor necrosis factor- α serum levels in healthy smokers and nonsmokers . *Single-blind* .5: 217-222.
- Pichler, R. ; Sfetsos, K. and Badics, B. (2009).** Wien Med Wochenschr . 159: 337–34.
- Poojary, SA. (2011).** Vitiligo and associated autoimmune disorders: Aretrospective hospital-based study in Mumbai, India. *Allergologia Immunopathologia* .39(6):356.
- Qidwai, T. and Khan, F. (2011).** Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand. J. Immunol.* 74: 522-547.
- Rawlings, A.V. (2006).** Ethnic skin types: are there differences in skin structure and function?. *International J. of Cosmetic Science.* 28 (2) : 79-93.
- Rees, J.L. (2003).** Genetics of hair and skin color. *Annu. Rev. Genet.* 37: 67–90.
- Riley, PA. (1970).** Mechanisms of pigment cell toxicity produced by hydroxyanisole. *J. Pathol.*101:163-169.
- Sabek, N.A. ; Eyada, M.M.; Abdel Aziz, S.M. ; Demerdash, S.M. ; Goma, A.I. and Fikry, S. (2015).** Serum Estrogen and Estrogen Receptor Beta Levels in Female and Male Patients with Vitiligo . *American J. of Biomedical Research* .3(3): 53-57.
- Salem, M.M. ; Shalbaf, M. and Gibbons, N.C. (2009).** *FASEB J:* 23: 3790–3807.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001).** Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd edition ,Cold Spring Harbor, NewYork.
- Sambrook,J. ; Fritsch,E.F.; and Maniatis,T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual . 2nd edition, Cold spring harbor laboratory press, cold spring Harbor, New York.
- Schallreuter, K.U. ;Wood, J.M. ; Pittelkow, M.R. ; Gutlich, M. ; Lemke, K.R. ; Rodl, W. ; Swanson, N.N. ;Hitzemann, K. and Ziegler, I.**
-

(1994). Regulation of melanin biosynthesis in human epiderm by tetrahydrobioprotien. *Science* . 263 : 1444.

Schallreuter, K.U. ; Hasse, S. ; Rokos, H. ; Chavan, B. S; halbaf, M. ; Spencer, J.D. and Wood, J.M. (2009). Cholesterol regulates melanogenesis in human epidermal melanocytes and melanoma cells. *Exp Dermatol* . 18:680-688.

Schallreuter, K.U. ; Moor, J. ; Bhrens-Williams, S. Panke, A. and Harari, M. (2002). Rapid irritation of re-pigmentation in vitiligo with dead sea climatotherapy in combination pseudo Catalase .*Int J. Dermatol* .41:482-7.

Scott, E. (2011). "Cortisol and Stress: How to Stay Healthy". Retrieved 11-29.

Sehgal, V.N. (2007). Vitiligo: Compendium of clinic-epidemiology features . *Indian J. Dermatol Venereol Leprol* .73(3):p.149-154.

Semsei, I. ;Rao, G. and Richardson, A. (1991). Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech Ageing Dev* 58: 13-9.

Shahin, Z. ;Leheta, T. M. ;Abdel Hay, R.M. ;Abdel Aal, H.M. and Rashed, L. A. (2013). *Acta Dermatovenerol Croat* .20(1):14-20.

Shajil, E.M. ; Sahani, M. ; Mistry, N. ; Sheril, A. and Begum, R. (2005). *Evaluation of oxidative stress , autoimmune and neurochemical hypothesis in Baroda vitiligo patients. poster presented to the first conference of Asian Sociaty for Pigment Cell Research , New Delhi , India* .1-2 .

Shanafelt, A.B. (2000). *Nat. Biotechnol.* 18: 1197 .

Sharma, R. ; Sharma, C.L. and Mahajan, A. (2008). Biological agents targeting beyond TNF-alpha. *Indian J. Crit. Care Med.*

Sharquie K.E. (2011). common Hypopigmented in Baghdad Teaching hospital . *Iraqi J. Comm. Med* . 24(3). 12: 181-189.

- Shen, C. ; Gao, J. ; Sheng, Y. ; Dou, J. ; Zhou, F. ; Zheng, X. and Ko, R. (2016)** .Genetic Susceptibility to Vitiligo: GWAS Approaches for Identifying Vitiligo Susceptibility Genes and Loci . *General Program of National Natural Science Foundation of China* .7(3):1-11.
- Shi, Y.;Li, K. Hamzavi, I.;Lim H.W. ;Zhou, L. and Mi, Q. (2013)**. Elevated circulating soluble interleukin-2 receptor in patients with non-segmental vitiligo in North American. *J. of dermatological science* 71(3) .
- Simpson and MacDonald. (1981)** . Endocrine physiology of the placenta. *Ann. Rev. Physiol.* 43: 163-188.
- Sliverberg, N.B. (2010)**. Update on childhood vitiligo. *current Opinion in Pediatrics.* 22: 445-452.
- Slominski, A. ; Paul, R. and Bomriski, A. (1989)**. Hypothesis: possible role of melatonin receptors in vitiligo. *J. Soc Med* . 82: 539-541.
- Slominski, A. ;Wortsman, J. ;Luger, T. ;Paus, R., and Salomon, S. (2000)** . Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol. Rev.* 80, 979–1020.
- Slominski, A. ;Wortsman, J. ;Tuckey, R.C., and Paus, R. (2007)**. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Molecular and cellular endocrinology.* 143-149.
- Slominski, A. ;Wortsman, J. and Tobin, D.J. (2005)**. The cutaneous serotonergic/melatonergic system: Securing a place under the sun. *FASEB J.* 19:176–194.
- Slominski, A.T.; Zmijewski, M.A.; Skobowiat, C.; Zbytek, B.; Slominski, R.M. and Steketee, J.D. (2012)**. Sensing the environment: Regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 212: 1–115.
- Sohal, R.S. ;Hung-Hai, K.u. and Agarval, S. (1993)**. Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species. *Biochem Biophys Res Commun* .196: 7-11 .

Spritz ,R.A. (2008). The genetics of generalized vitiligo *Curr Dir Autoimmun* 10: 244-257

Spritz R A. (2010). *Genome Med.* 2: 78.

Spritz, R.A. (2007). The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *Pigment Cell Res* 20:271–8.

Sravani, P. ;Babu, N.K. ;Gopal, K.V. ;Rao A.R. ;Moorthy, B. and Rao T.R (2009). Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and nonvitiliginous skin. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*75, 268-271.

Stamatas, G.N. ; Zmudzka, B.Z. ; Kollias, N. and Beer, J.Z. (2004). Non-invasive measurements of skin pigmentation in situ. *Pigment Cell Research* .17(6) 618-626.

Swope, V.B. Abdel-Malek, Z. ;Kassem, L.M. and Nordlund, J.J. (1991). Interleukin-1 and 6 and tumor necrosis factor- α are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis . *J. Invest. Dermatol.* 96: 180-185.

Taieb, A. and Picardo, M. (2009). Clinical practice. Vitiligo. *N Engl J. Med.* .360:160-9.

Taieb, A. (2012). Vitiligo as an inflammatory skin disorder: a therapeutic perspective. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25: 9-13.

Tappia, P.S. ; Troughton. K.L. ; Langley-Evans S.C. and Grimble, R.F. (2009). Cigarette smoking influences cytokine production and antioxidant defences. *Clin Sci (Lond).* 88(4):485-9.

Tayarani, I. C. and Changeux, J. P. (2007). Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. *J. of Leukocyte Biology* . 81:509-606.

Theze, J.P. and Alzari, J. (1996). Bertoglio, *Immunol. Today* .17: 481.

- Thong, H.J. (2003).** The patterns of melanosome distribution in keratinocytes of human skin as one determining factor of skin colour. *British J.of Dermatology*.149:498-505.
- Trcka, J. ;Moroi, Y. ;Clynes, R.A. ;Goldberg, S.M. ;Bergtold, A. ;Perales, M.A. ; Ma, M. and Ferrone, C.R. (2002).** Redundant and alternative roles for activating Fc receptors and complement in an antibodydependent model of autoimmune vitiligo. *Immunity*.16: 861-868.
- Tue, C.X. ;Fu, H.W. and Lin, X.R. (1999).** Levels of soluble interleukin-2 receptor in the sera and skin tissue fluids of patients with vitiligo. *J. Dermatol Sci*. 21: 59-62.
- Van- den ,J.G. ; Konijnenberg ,D. Dellelijn , T.A. and Bos , J.D. (2009).** Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients .*J. invest Dermatol* .129-32.
- Van den Boorn, J.G. ;Picavet, D.I. ;van Swieten, P.F. ;van Veen, H.A. ;Konijnenberg, D. ;van Veelen, P.A. ;van Capel, T. ;Jong, E.C. and Reits, E.A (2011).** Skin-depigmenting agent monobenzone induces potent T-cell autoimmunity toward pigmented cells by tyrosinase haptentation and melanosome autophagy. *J. Invest Dermatol, in press*.
- Van den, R.M. ;Aten, J. and Scheepmaker, A. (2000).** *Br J Dermatol*: 143: 573–581.
- Vertechy, M. ;Cooper, M.B. ;Ghirardi, O. and Ramacci M.T. (1993).** Antioxidant enzyme activities in heart and skeletal muscle of rats of different ages. *Exp Gerontol* . 24: 211-8.
- Weiland, M. ; Gao, X. H. and Zhou, L. (2012).** *RNA Biol* . 9: 850–859.
- Westendorp, R.G. ; Langermans, J.A. ; Huizinga, T.W. and Elouali, A.H. (1997).** Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* .349: 170-173.
- Whitney, W.D. and Samhita, A.V. (1905).** Harvard Oriental series. Vol 7, Harvard University press : Cambridge.

- Wilson, A.G. ;Symons, J.A. ;McDowell, T.L.and McDevitt, H.O. (1997).** Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 3195-3199.
- Wright, A.F. ; Carothers, A.D. and Pirastu, M. (1999).** Population choice in mapping genes for complex diseases. *Nat Genet* .23:397–404.
- Wu, J. ; Zhou, M. & Wan, Y. (2013).** *Mol Med Report* . 7: 237–241.
- Yaar, M. and Park, HY. (2012).** Melanocytes: a window into the nervous system. *Journal of Investigative Dermatology*.132(3 Pt 2): 835-845.
- Yang, L.; Boldin, M.P. and Yu ,Y . (2012).** *J Exp Med* . 209: 1655–1670.
- Yeo, U.C. ;Yang, Y.S. ;Park, K.B. ;Sung, H.T. ;Jung, S.Y. ;Lee, E.S. and Shin, M.H. (1999).** Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor in vitiligo patients. *J. Dermatol Sci*.19: 182-188.
- Yildirim, M. ; Baysal, V. ; Inaloz, H.S. and Can, M. (2004).** The role of oxidants and antioxidants in generalized vitiligo at tissue level. *J. Eur Acad Dermatol Venereol*.18:683-6.
- Zheng, Q. ; Zhou, L. and Mi, Q.S. (2012) .** *Immunology . J. Immunol* 2012: 188: 2118–2126.
- Zhou, L. ; Park, J.J. and Zheng, Q. (2011).** *Cell Mol Immunol*: 8: 380–387.
- Ziegler, I. (2003).** The pteridine pathway in zebrafish: regulation and specification during the determination of neural crest cell-fate. *Pigment Cell Res*. 16: 172–182.

الملاحق

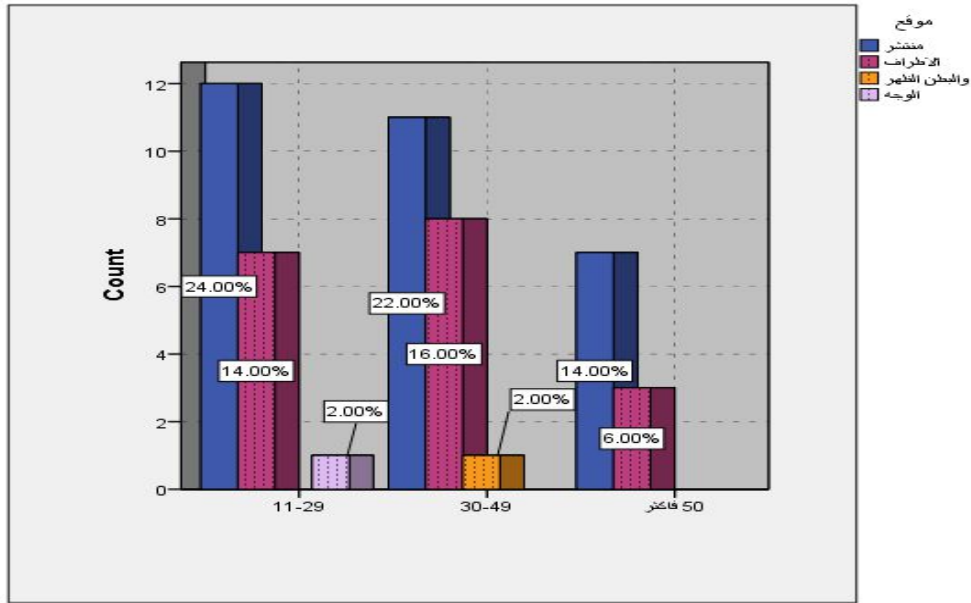
Appendixes

:Data collection جمع البيانات

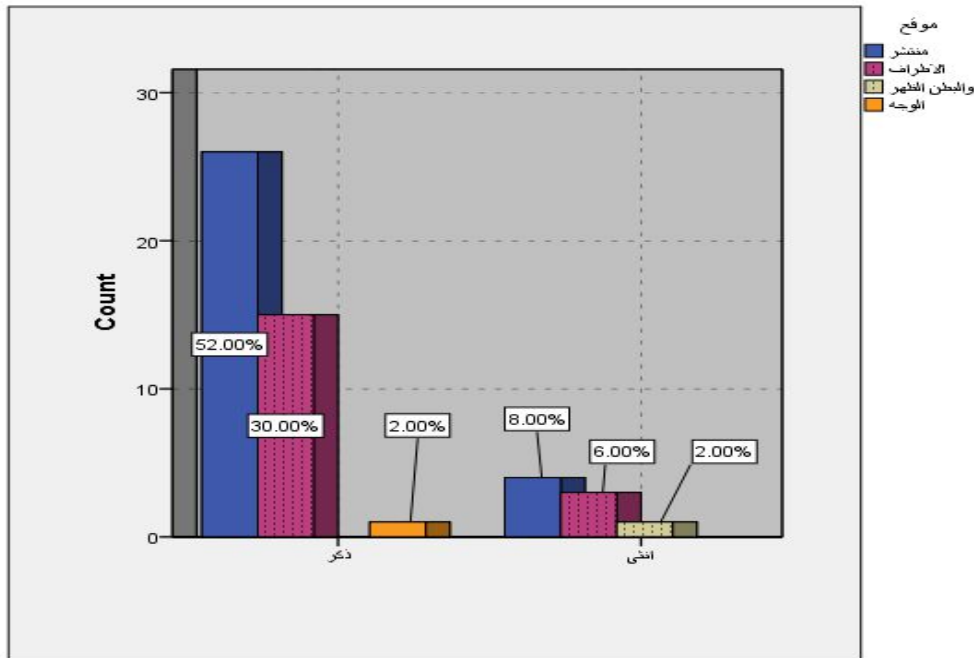
جمعت البيانات التالية من كل شخص وبوبت في جدول ملحق 1:

Sample	العينات
Age	العمر
Sex	الجنس
Smoking	التدخين
Marital status	الحالة الاجتماعية
The degree of kinship between the father and the mother	درجة القرابة بين الاب والام
The presence of relatives of people with the same disease	وجود اقارب مصابين بنفس المرض
Site of injury	موقع الاصابة
duration of the disease	فترة الاصابة بالمرض

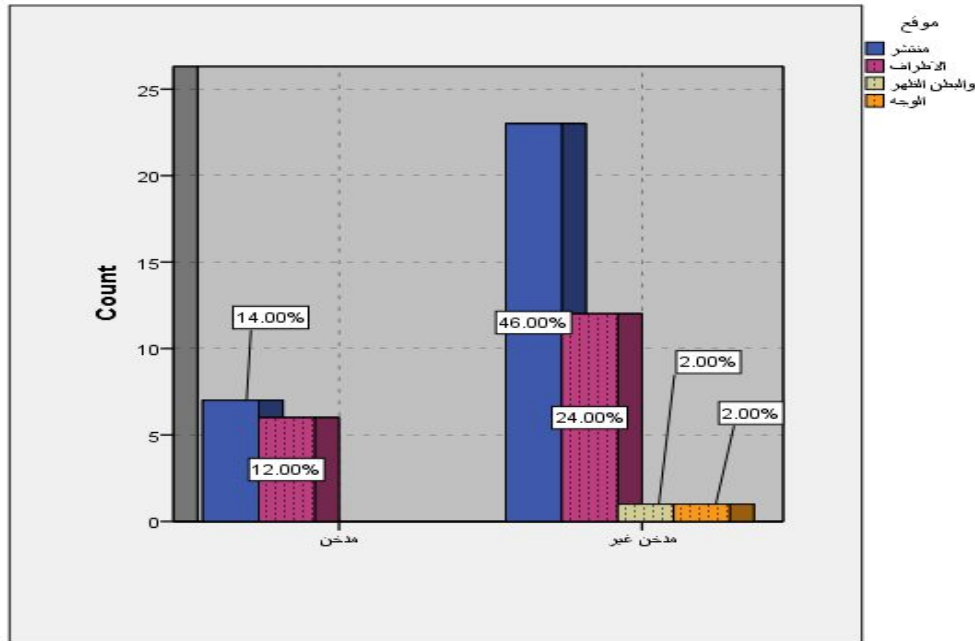
الملاحق



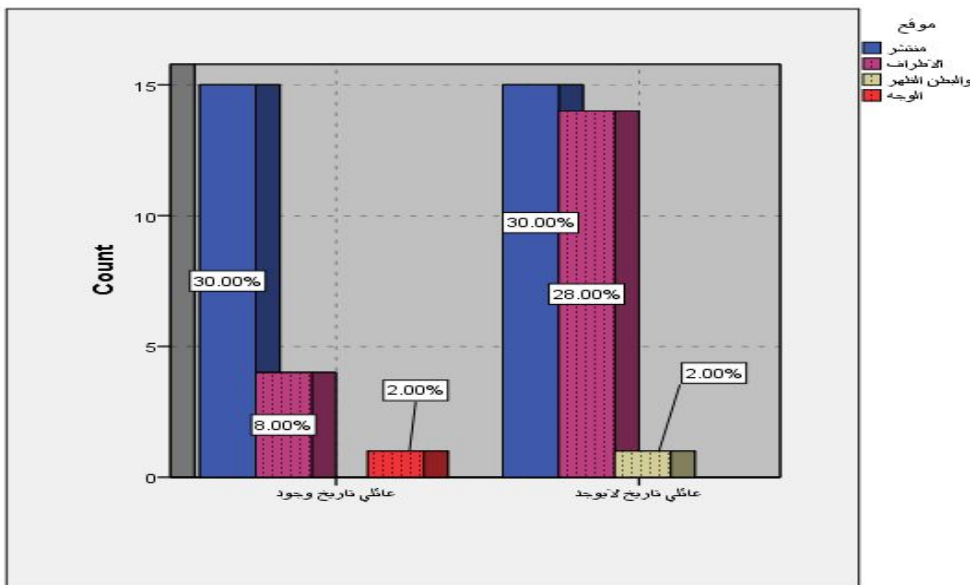
شكل (1-4) وصف للعلاقة بين موقع الإصابة في الجسم وبين الفئات العمرية



شكل (2-4) وصف للعلاقة بين موقع الإصابة في الجسم ونوع الجنس

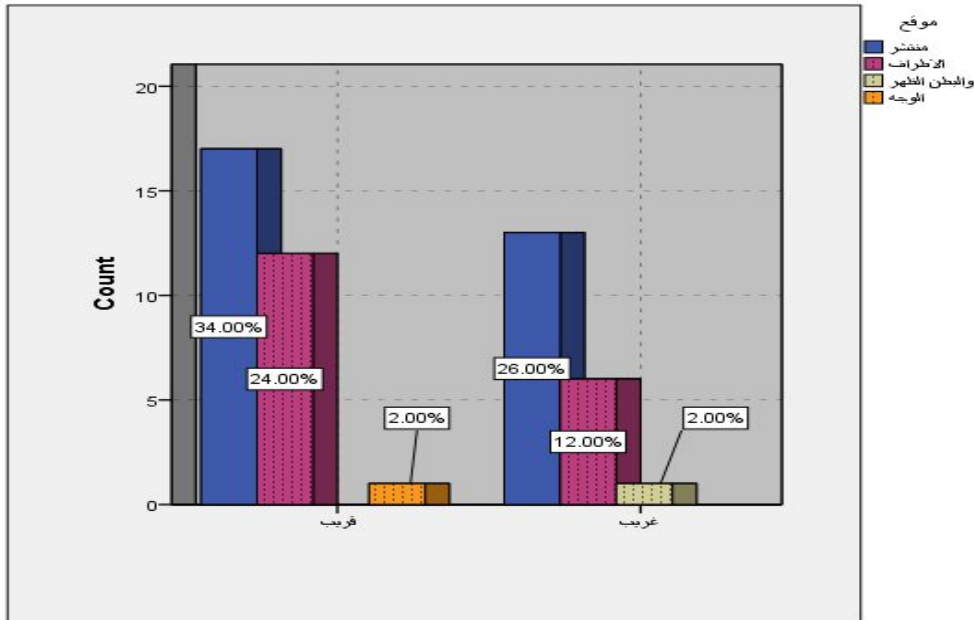


شكل (3-4) وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم والتدخين

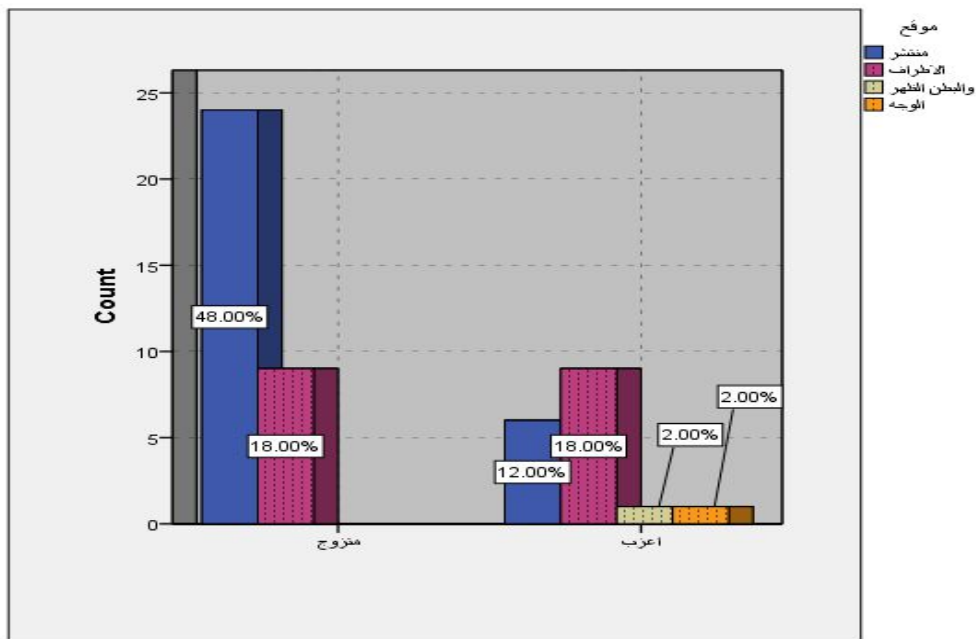


شكل (4-4) وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم والتاريخ العائلي

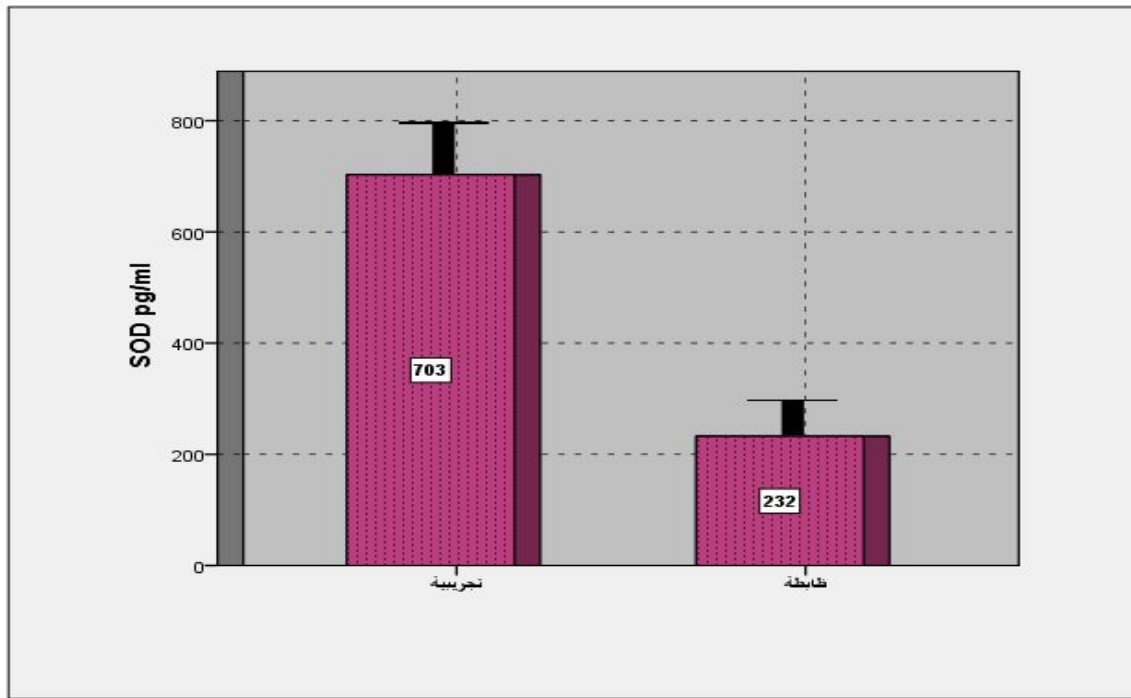
الملاحق



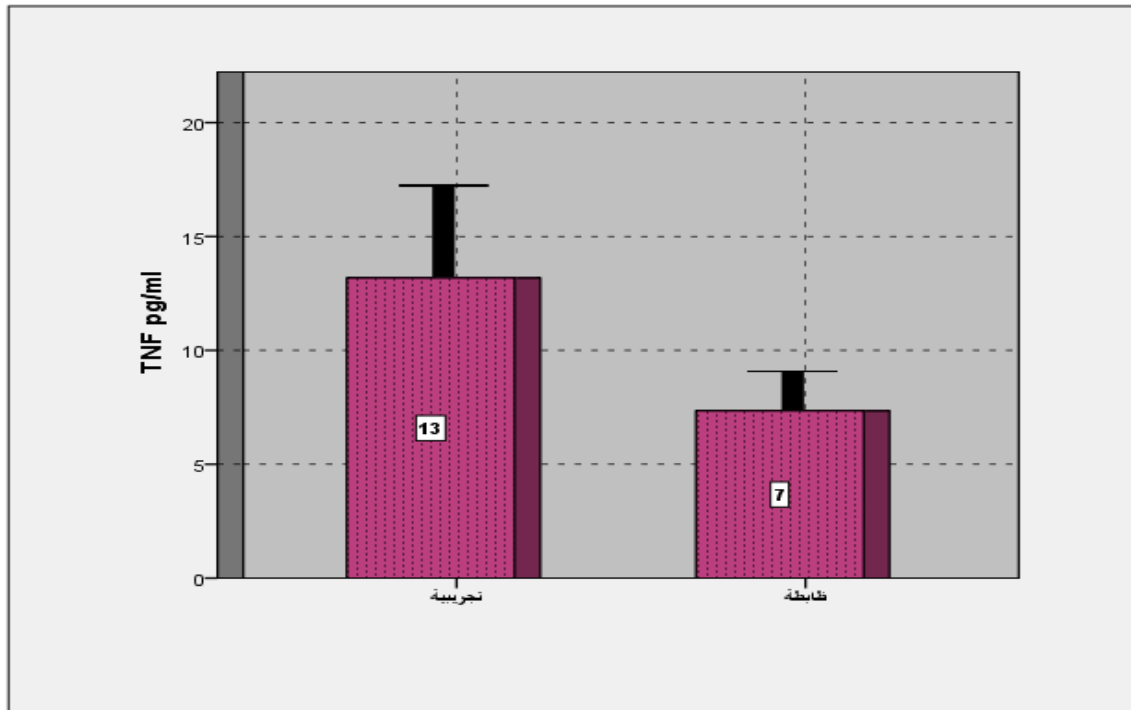
شكل (5-4) وصف للعلاقة بين موقع الاصابة في الجسم ودرجة القرابة بين الوالدين للمرضى



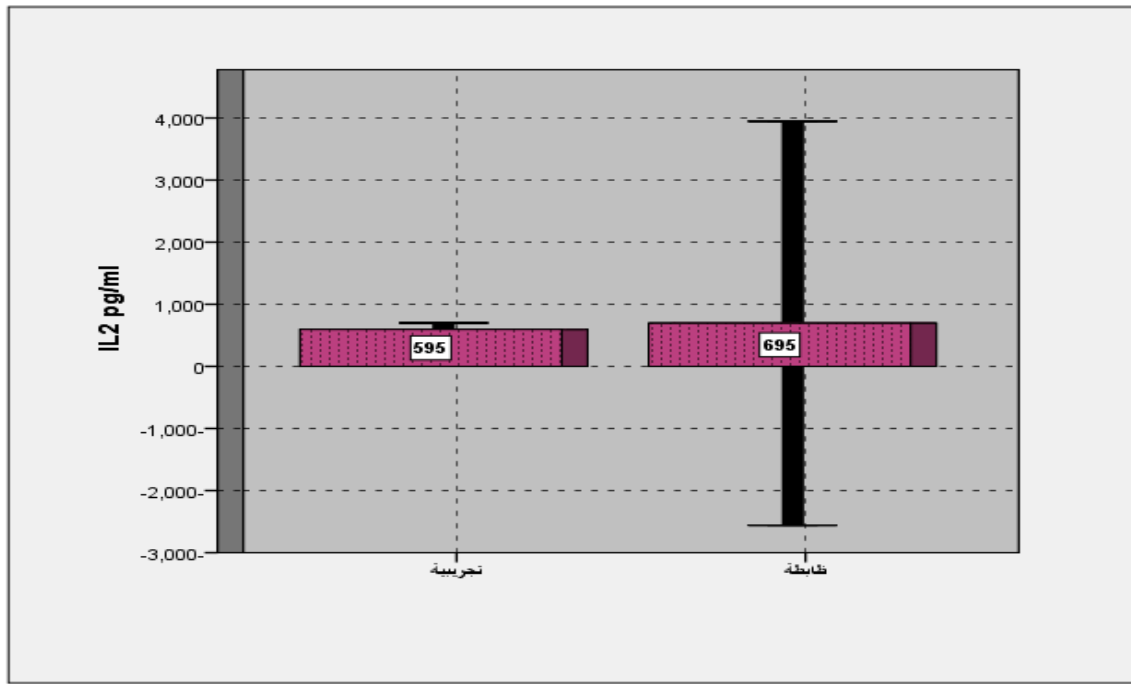
شكل (4-6) وصف للعلاقة بين موقع الإصابة في الجسم والحالة الاجتماعية



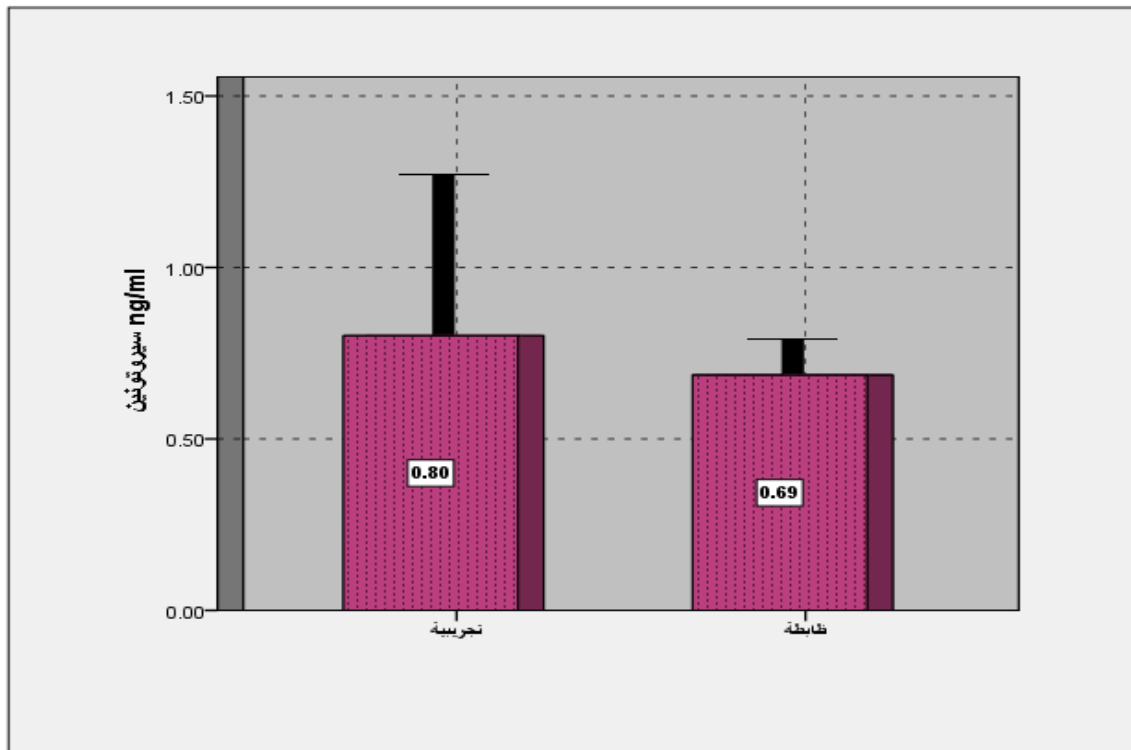
شكل (4-7) متوسط SOD-1 لمرضى الربو



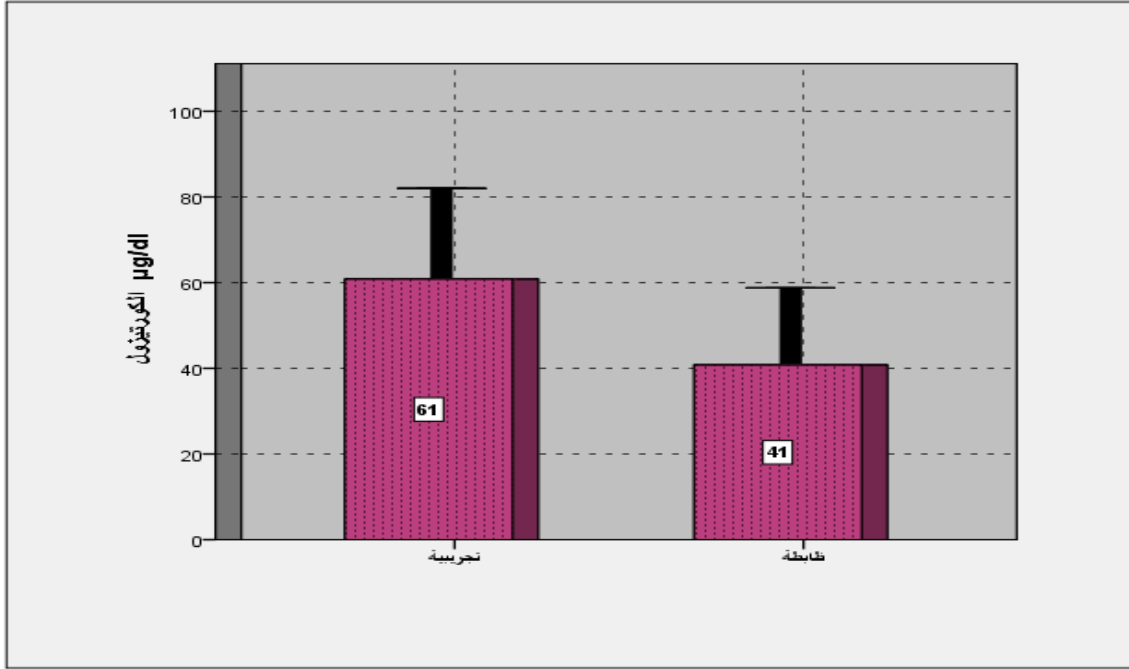
شكل (8-4) متوسط TNF- α لمرضى الربو



شكل (9-4) متوسط IL-2 لمرضى الربو



شكل (4-10) متوسط السيروتونين لمرضى البهاق



شكل (4-11) متوسط الكورتيزول لمرضى البهاق

جدول (4-24) يوضح الارتباطات بين المعايير المناعية والهرمونات لدى مرضى البهاق بشكل عام

العينة	الارتباطات	SOD-1 (Pg/ml)	TNF-α (Pg/ml)	IL-2 (Pg/ml)	Serotonin (ng/ml)
TNF-α(Pg/ml)	Correlation	.886**			
	Sig.	.000			
IL-2(Pg/ml)	Correlation	.946**	.956**		
	Sig.	.000	.000		
Serotonin(ng/ml)	Correlation	.964**	.924**	.965**	
	Sig.	.000	.000	.000	
Cortisol(µg/dl)	Correlation	.749**	.704**	.749**	.714**
	Sig.	.000	.000	.000	.000

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

Summary

The study aimed to shed light on vitiligo, through testing and immune genetic, knowing the change in the levels of certain immune variables, and certain hormones and certain genes using different genetic ways in people with vitiligo, as well as knowledge of the relationship between those standards and the extent of vulnerability of those genes under study, included the current study, 50 people from vitiligo patients, as well as 50 people (apparently healthy) as the control group for the study was collected from Al-Husseini Teaching Hospital in the city of Karbala (unit skin counseling) during the time period from 5/1/2015 until 15/1/2016. All patients sera were checked to assess the immunological criteria levels which each of the SOD-1, TNF- α , IL-2, Serotonin and Cortisol using (ELISA), as well as Immunofluorescence assay technology, has also been studying the genetic variations of IL-2RA gene by using PCR-RFLP as well as the study of the genetic variations of TNF- α gene by using PCR-ARMS and PCR-SSCP the results showed the following:

The Patient samples divided by age into five categories(10-19) (20-29) (30-39) (40-49) (50-59) years and based on this division reached the number and percentage of each category 10 (20.0%) compare with the control, and the search results revealed the vitiligo patients on sex has reached of male patients 42 (84%) and females 8 (16%) have also been patients were divided into groups smokers numbered 13 (26%) and a non-smoking (74%) 37, while the total patient ratios depending on the presence of family history 20 (40.0%) 30 (60.0%) respectively, while the situation is reversed according to the kinship between parents of patients, and the social situation of patients groups were divided into married and non-married rate 33 (66.0%) and 17 (17.0%) respectively, the distribution of patients dependent on the site of injury as follows 30 (60.0%) spread throughout the body, the patient in the extremities 18 (36.0%) the patient abdominal and back (2.0%) 1 and the injured facial 1 (2.0%) Finally, results showed patients ratios based on the duration of the disease, which is divided on the totals of (1-80) month amounted have a percentage 16 (32.0 %), from (81-160) percentage (22.0%), 11, from (161-240) a month, and its percentage (12.0%) 6, from (241-320) a month, which represented 6, (12.0%) from (321-400) showed increase of 11 (22.0%).

Immune aspect of the study of immune parameters recorded increase significantly with age is generally at ($P \leq 0.05$) have emerged and down the age group (10-19) years, with averages showed anti-oxidative stress-type SOD-1 up significantly (0.00) when compared with the control group rose averages values

for each of TNF- α , IL-2 to reach the levels (0.32 ± 8.47), (15.25 ± 440.86) (pg / ml), respectively, and the control (0.33 ± 4.91), (3.00 ± 156.53) (pg/ml) respectively while decreased levels of serotonin and cortisol with the averages of the healthy and the highest rates of those standards is significant (0.00) among the age group (50-59 years) for the aged (20.36 ± 72.08) (0.35 ± 1.47), respectively, compared with the control, rising SOD-rate of 1 in patients in this age group is significant (0.00) for an average (62.15 ± 810.99) also increased the level of TNF- α and IL-2 and serotonin and cortisol increase significantly (0.00) to (0.59 ± 19.58), (34.48 ± 744.82) (pg / ml), (0.35 ± 1.47) (ng / ml), ($\mu\text{g} / \text{dl}$) (20.36 ± 72.08), respectively, compared with the rate control group, which was to have those same standards (0.87 ± 9.77), (158.19 ± 314.06) (pg / ml), (0.07 ± 0.82) (ng / ml), (3.78 ± 17.38) ($\mu\text{g} / \text{dl}$) respectively. There was also an impact on the type of sex on immunological parameters under study here statistical analysis dealt with the study of male patients with compared with the male control group as it appeared that both the SOD-1, TNF- α , serotonin and cortisol has risen significantly (0.00) in patients compared with healthy group except for IL-2, which fell in a significant (0.73) when the male vitiligo patients compared with the control, also conducted a study a comparison between females vitiligo patients and among females control group as the comparison significant increased results showed in all immunological criteria and serotonin and cortisol at ($P \leq 0.05$) for females vitiligo patients when compared to the same standard rates of female control group. Also, it has been studied the negative role of smoking on vitiligo, has divided the patients samples were deviled in to smokers and non-smokers, as the value of SOD-1 and TNF- α risen significantly in smokers patients to reach (71.06 ± 725.06), (pg / ml) (3.09 ± 12.75) compared with the control group (51.58 ± 225.57), (pg / ml) (1.42 ± 7.25), while IL-2 rate show a significant decrease in the levels (70.64 ± 611.58) (pg / ml) compared with the control group (379.18 ± 199.15) (pg / ml) either serotonin and cortisol increased as compared to healthy controls. significant differences between patients who have a family history of the disease , the results showed the increase of immunological criteria levels of hormones .The results showed a decrease in immune parameters and hormone levels in patients who have a kinship between the parents compared to patients who have kinship between parents has been the declining moral at ($P \leq 0.05$), a case study of social status that deal with being married than non-married couples. The duration of the disease after the split of appropriation categories months as observed variation SOD-1 on different months those levels, either TNF- α highest rate was recorded among the group of (161-240) a month as it was (3.17 ± 17.07) (pg / ml) and finally fell to the category of (1-80) a month to (1.69 ± 9.46) (pg / ml), and the results posted gains in the averages IL-2

infection among categories of (300-241) a month (77.87 ± 700.07) (pg / ml), while the rest declined aggregates the serotonin has recorded a significant rise in the group ranging between (1-80) a month (67.36 ± 672.58) (ng / ml), while other rates varied with different other groups, as is the case of cortisol .It showed Find a correlation significant results at ($P \leq 0.05$) between immune parameters under study in general, while the results of the study showed correlations between immunological parameters depending on age and duration of the disease as it appeared a correlation significant at ($P \leq 0.01$) and ($P \leq 0.05$) and then gradually start to lose correlation with aging and progress injury. Results have been found amplification of IL -2RA gene RFLP-PCR was found that the molecular weight of the gene IL-2RA is 180pb The results of the genetic variation it has emerged that the pattern B is the most frequency also found that type B is the most frequency compared with type A but the reluctance to less than the control in mental patients. Magnified cut nucleotide gene (308) ARMS-PCR and by using SSCP-PCR technique and after migration to central acrylamide been getting the results it is found that 3AA pattern which represents the three packages is the most frequency in patients with vitiligo while 4BB style that represents the four packages It is the lowest frequency in patients. In light of the demonstrated by the results infer the existence of a direct correlation to the age of the immune standards and levels of hormones as well as having the effect of each sex, smoking and kinship between the boys and the duration of infection is on those standards as well as the presence of hereditary genes, which include all of the IL-2RA and Jane TNF- α for vitiligo patients.

**Ministry of Higher Education & Scientific Research
University of Karbala – College of Education
For Pure Sciences
Department of Biology**



Immunological And Molecular Study of Vitiligo Patients in Karbalaa Province

A Thesis

Submitted to The College of Education For Pure Sciences of
University of Karbala as a Partial Fulfillment of The Requirements
for The Degree of Philosophy of Doctor in Biology – Zoology

By

Alyaa – Aziz AL-mossawei

master Biology / 2011

Supervised By

Asist Prof Dr. Hiyame Abdul Ridha AL-awade

Prof. Dr. Ali Hmood Al-Saadi

2016 A.D.

1438 A.H.