تحديد التباين الوراثي للجينات GSTM1, GSTT1 باستخدام تقنية الـ Multiplex-PCR لدى مدخني السكائر والأركيلة

عدنان فاضل نصيف العزاوي رافع زيدان مخلف السكماني معن حسن صالح الياسين

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة تكريت

(أستلم 2018/5/9 ؛ قُبل 2018/11/1)

الملخص

استخدمت في هذا الدراسة تقنية الـ Multiplex-PCR وذلك للكشف عن الفقد الذي يحصل لجينات GSTT1, GSTM1 لمدخني الأركيلة والسكائر في محافظة صلاح الدين و تأثيرها في نسبة الـ Hb للمدخنين. جمعت (103) عينة دم من المدخنين من مدينة تكريت، و (70) عينة دم من اشخاص غير مدخنين كمجموعة سيطرة، وتبين ان اغلب المدخنين تراوحت اعمارهم ما بين (20-27)، ثم أجريت الفحوصات (P.C.V, Hb) وأظهرت النتائج ارتفاعاً كبيراً في الـ P.C.V, Hb مقارنة بالأشخاص غير المدخنين، وتم تحديد التباين الوراثي للجينات (GSTM1 GSTT1) في جميع العينات مع السيطرة باستخدام تقنية الـ Multiplex-PCR، وقد بينت النتائج المتعلقة بفئة المدخنين تسجيلها اعلى نسبة للطراز الفاقدين الجينين GSTM1, GSTT1 للمدخنين بمقدار (55%)، يليها بنسبة (23%) للطراز الفاقدين لجين GSTM1 وللطراز الفاقدين لجين GSTT1 بنسبة (15%) أما الطراز الطبيعي الحاوي على الجينين فقد بلغ اقل نسبة بمقدار (7%). اما فئة غير المدخنين فكانت اعلى نسبة للطراز الطبيعي اذ بلغت (35.71 %) يليها الطراز الفاقدين لجين GSTT1 بمقدار (25.71%)، ومن ثم الطراز الفاقدين لجين GSTM1 واقل نسبة كانت (7%) من نصيب الطراز الفاقدين للجينين GSTT1, STM1. ومن نتائج توزيع فقد الجينات على انواع المدخنين ظهور اعلى نسبة للطراز الفاقدين الجينين GSTM1, GSTT1 لمدخني السكائر والاركيلة بمقدار (75%)، يليها الطراز الفاقدين للجين GSTT1 فكان اعلى نسبة في مدخني السكائر بلغت (20%)، اما بالنسبة للطراز الفاقدين للجين GSTM1 فكان اعلى نسبة في مدخني السكائر اذ بلغت (30%)، ومن النتائج يتبين ان الطرز الفاقدة لأحدى الجينات او كلاهما له تأثير كبير على صحة الإنسان، وفقدانها قد يسبب زيادة في خطر الاصابة ببعض الأمراض واهمها امراض القلب بسبب فقدان الانزيمات التي تشفر لها تلك الجينات.

الكلمات الدالة: التباين الوراثي، Multiplex-PCR، السكائر، GSTM1، GSTT1.

Detection the Genetic Variation for GSTM1, GSTT1 Genes in Smokers by Multiplex-PCR Technique

Adnan F. Al-Azawi

Rafea Z. Al-Sugmiany

Maan H. Alyassine

Department of Biology/ College of Science /University of Tikrit

ABSTRACT

In this study, Multiplex-PCR technique were used to detect the loss of GSTT1, GSTM1, and the effect of some of the Hb level on smokers. A total of 103 blood samples were collected from smokers in Tikrit and 70 from non-smokers as control groups. The results showed a significant increase in PCV, Hb compared with non-smokers, and the presence or absence of genes (GSTT1, GSTM1) was detected. In all samples compared with control using Multiplex-PCR markers, The

highest percentage genotype that lost the two genes GSTM1, GSTT1 was (55%), Followed by 23% for the genotype lost of the gene GSTM1, and the genotype lost of the gene GSTT1 (15%). The natural genotype the genes was the lowest (7%). The non-smokers group was the highest proportion of the natural genotype (35.71%), followed by the genotype lost of the gene GSTT1 (25.71%), the genotype lost of the gene GSTM1 (7%) and the genotype lost of the gene GSTT1 GSTM1. One of the results of the distribution of gene loss in smokers was the highest percentage of the genotype lost GSTM1, GSTT1 For smokers of cigarettes and Argile reached 75%, respectively, followed by GSTT1, the highest percentage of smokers (20%). The GSTM1 was the highest (30%). The results indicate that the genotypes missing of one or both genes have a significant impact on human health and loss, which may cause an increase in the risk of some diseases, the most important of which is heart disease due to the loss of enzymes that coding those genes.

Keywords: Genetic Variation , Multiplex-PCR, Cigarette, genes GSTT1, GSTM1

المقدمة

يعد التدخين احدى المسببات الرئيسية للوفاة في العالم، كما أشارت إليه إحصائيا منظمة الصحة العالمية WHO (World Health Organization)، اذ يؤدي إلى وفاة شخص واحد كل 5 الى 6 ثواني، فهو يقتل أكثر من 5 ملايين شخص سنويا ويتوقع ارتفاع العدد بحلول العام 2020 إلى أكثر من 8 ملايين شخص (هدى و تمارة، 2013). وقد بينت الدراسات أن التدخين يزيد من مخاطر الإصابة بسبعة عشر نوعاً من الأورام السرطانية في الإنسان وفي مقدمتها (سرطان الرئة، الفم، البلعوم، المريء، المعدة، الكبد، البنكرياس، المثانة) اذ يعد سرطان الرئة من الأورام الأكثر شيوعاً على الصعيد العالمي مع ارتفاع عدد الوفيات مما يهدد صحة الإنسان (He, 2015).

يحتوي دخان السجائر على 3500 مادة كيميائية مشخصة على الأقل، وللعديد منها خصائص سمية مسرطنة (فمن الثابت أن 40 منها مواد مسرطنة) (Hecht, 1997). وبلغت نسبة المدخنين في العالم حوالي (0.2) من عدد سكانه، ويتسبب تدخين السجائر طويل الأمد بحصول 20% من مجموع الوفيات في الدول المتقدمة في المقام الاول لما يسببه من أمراض الأوعية الدموية والسرطان (Peto et al., 1994). والتدخين يزيد كمية الأحماض الدهنية في الدم وإن ذلك يعد عنصراً هاماً في العلاقة بين مرض الشرايين التاجية اذ يزيد التدخين من العبء على القلب بالنقص الحاصل في تنبيه الجهاز العصبي، فضلاً عن تأثيرات الجذور الحرة (FREE radicals) لدى المدخنين في تولد مادة القطران (Zhu et al., 1994). ويقلل دخان السجائر من نشاط النظام المضاد للأكسدة الأمر الذي يؤدي إلى اختلال التوازن بين المؤكسد- المضاد للأكسدة مما يجعل من التدخين أحد اخطر العوامل التي تقود إلى العديد من الأمراض (Ross, 1996).

واكتسبت الاركييلة شعبية واسعة بين شباب الشرق الأوسط الذين تتراوح أعمارهم بين (18-28) للذكور والإناث اذ كان معدل انتشارها بين 6%- 34% في الشرق الأوسط و 5% - 17% في أميركا، كما أن الاستخدام المتزايد للاركييلة الألكترونية (WP) عند المراهقين يؤدي إلى زيادة خطر الإصابة بأمراض القلب والرئة والسرطان، وفي الآونة الأخيرة هناك زيادة حادة في شعبية أنابيب المياه المستخدمة في معظم الدول العربية والأوروبية (Fromme et al., 2009).

وثمة تباين وراثي في الجينات التي تشفر الإنزيمات المسؤولة عن تغيير المسار الايضي للمركبات المسببة للسرطان بسبب التدخين الذي يؤدي الى تغيير في وظيفتها، وقد ارتبط التباين الوراثي للعديد من الجينات التي تشفر الانزيمات المشتركة بالتحول الحيوي للمواد المسرطنة مع حدوث السرطان وتطوره (Bai and Xiong, 2016). ومن اهم تلك الجينات هي GSTT1 و GSTM1 التي تشفر انزيمات الطور الثاني وتنتمي لعائلة glutathione S-transferases (GSTs) اذ اشارت دراسات عدة

الى صلة تعدد اشكال هذه الجينات بالإصابة بالسرطان، إذ تتفاعل الانزيمات التي تنتجها هذه الجينات مع سموم دخان التبغ المسرطنة التي تتداخل مع التفاعلات الأيضية.

ويتخذ الجين GSTM1 أشكالاً عدة في جسم الانسان، بما في ذلك أليل النشاط الملغي او الفارغ null-activity allele (GSTM1-)، بسبب حذف منطقة رئيسة من ذلك الجين. والامر نفسه بالنسبة للجين GSTT1 من حيث ان له أشكالاً عدة عند الانسان، وقد يكون لها حذف النمط الوراثي الفارغ (Joice *et al.*, 2006). إن الأفراد الذين لديهم واحدة من هذه الأنماط الجينية الفارغة بشكل متماثل التركيب الوراثي homozygosis يمكن تصنيفها على انها النمط الظاهري السلبي، مما يؤدي ذلك الى فقدان كامل لنشاط الانزيم المنتج من ذلك الجين، في حين أن الافراد الذين لديهم على الأقل أليل وظيفي واحد يتم تصنيفهم ضمن النمط الظاهري الإيجابي. (He, 2015).

ويعد انزيم glutathione S-transferase (GST) احدى هذه الانزيمات الذي يؤدي مجموعة واسعة من الوظائف في الخلايا ومنها إزالة أنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS) وتجديد البروتين S-thiolated والاقتران مع الروابط الذاتية في الانسان، مثل العائلة الجينية لجينات glutathione-S-transferases التي تشمل الجينات (GST; EC 2.5.1.18) وتقسم على ثمانية اقسام (GSTA, GSTM, GSTK, GSTO, zeta alpha, mu, kappa, omega, pi, sigma, theta,) التي تشفر من جينات (Regina *et al.*, 2009). ان تعدد اشكال جينات الـ GST يرتبط مع زيادة او نقصان الاستعداد للإصابة بالعديد من الامراض. وفقدان تعدد الأشكال في الجينات GSTM1 و GSTT1 كجينات مهمة في عائلة GST، يؤدي إلى فقدان بروتيني GSTM1 و GSTT1 بشكل كامل. وتبين في الآونة الأخيرة أن النمط الجيني لـ GSTT1 أو كل من الأنماط الجينية GSTT1 و GSTM1 يمكن ان يكون عامل خطر وراثي في اثناء التدخين، فضلاً عن تطور داء السكري من النوع 2 ومضاعفات القلب والأوعية الدموية (Daniel and Denoon, 2010).

ويهدف هذا البحث الى دراسة انتشار ظاهرة تدخين الأركيلة والسيجارة بين الشباب وتأثيرها في بعض الاختبارات الدموية للمدخنين، ثم الكشف عن الفقد الذي يحصل لجينات GSTT1, GSTM1 لمدخني الأركيلة والسكائر باستخدام مؤشرات الـ Multiplex-PCR في محافظة صلاح الدين.

المواد وطرائق العمل

1 - عينات الدراسة : قسمت عينات الدراسة على عدة مجاميع منها

الاولى: مجموعة المدخنين Smokers Group

شملت هذه المجموعة 103 مدخن من فئة الشباب في مناطق متفرقة من مدينة تكريت تراوحت أعمارهم بين (20-30) سنة، صنفوا حسب نوع التدخين الى ثلاثة اقسام على النحو الاتي :

1. مدخني السكائر فقط 43 شخص.
2. مدخني الأركيلة فقط 25 شخص.
3. مدخني السكائر و الأركيلة 35 شخص.

الثانية: مجموعة السيطرة Control group

ضمت هذه المجموعة 70 شخصاً من غير المدخنين بأي نوع من التدخين من الذكور بوصفها مجموعة مقارنة (سيطرة) تم اختيارهم بشكل عشوائي من طلبة جامعة تكريت تراوحت أعمارهم بين (19-28) سنة بعد التأكد من كونهم غير مدخنين وعدم اصابتهن بأية حالة مرضية.

2- جمع نماذج الدم:

تم جمع عينات الدم من المدخنين ومجموعة السيطرة ومن ثم نقله إلى المختبر مع مراعاة حسن حفظ العينات ومنع تلوثها لغرض اجراء قياس الـ Hb واستخلاص الدنا.

3- قياس الـ Hb:

تم قياس الهيموكلوبين لجميع افراد الدراسة مدخنين وعينات السيطرة باستخدام جهاز Heamatograte، ومنها تم حساب مقدار الـ P.C.V (Schalm *et al.*, 1975).

Genomic DNA Isolation From blood

4- عزل الـ DNA الجيني من الدم:

تم عزل الـ DNA الجيني من الدم الكلي المأخوذ من عينات الدراسة وهي مجموعة مدخنين وعددهم 103 عينة، ومجموعة سيطرة (غير مدخنين) وعددهم 70 عينة باستخدام المواد الكيميائية والاجهزة اللازمة بحسب الطريقة التي ذكرها (Joice *et al.*, 2006).

5- قياس تركيز ونقاوة الدنا:

تمت عملية قياس تركيز الدنا المستخلص من عينات الدراسة وتقدير نقاوته باستخدام جهاز (Nano Drop) ثم تخفيف عينات الدنا الى تركيز 25 ng/ µL لاستخدامه في تقنية الـ PCR.

6- الترحيل على هلام الاكاروز Gel Electrophoresis:

استخدمت المواد والمحاليل المنظمة والدوائر المستخدمة في الترحيل الكهربائي، والتي اعدت وفقا (Otávio *et al.*, 2013) وكالاتي: لترحيل الدنا الجيني والكشف عنه تم تحضير هلام الاكاروز بتركيز 1% أما تفاعلات الـ (PCR) فقد حضرت بتركيز مناسب لحجم قطعة الدنا للجينات المدروسة بتركيز 2 %، واستخدمت صبغة الـ Red Save لتصبغ الحزم وقد اضيفت عند تحضير الهلام، وفحص الهلام المصبغ بواسطة جهاز الاشعة فوق البنفسجية U.V ثم اخذت صورة للهلام باستخدام كاميرا الموبايل.

7- تحضير العينات لتقنية Multiplex-PCR :

حدد التباين الوراثي لوجود او عدم وجود الجينين GSTM1, GSTT1 من خلال جينوم العينات المدروسة، أما جين CYP1A1 فاستعمل لغرض التأكد من دقة النتائج عن طريق ظهور الحزمة الخاصة به ذات الحجم الجزيئي 312bp واستخدمت تقنية الـ Multiplex-PCR باستخدام ستة بادئات متخصصة مصممة لهذا الغرض كما في (الجدول 1) وهي تعطي حزماً بأحجام مختلفة. وجهزت البادئات على شكل مسحوق مجفد (Lyophilized) من قبل شركة Bio basic، ثم أذيت بإضافة أحجام مختلفة من الماء المقطر المعقم للحصول على التركيز 100 بيكومول لكل مايكرو لتر من الماء المقطر وتمثل هذه التراكيز المحضرة المحلول المخزن لكل بادئ، وحفظت هذه المحاليل بدرجة -20م°، وخففت تراكيز البادئات حسب التركيز المذكور في (الجدول 2).

الجدول 1: البادئات المستخدمة في تقنية الـ Multiplex-PCR في ضوء الظروف الخاصة بها

ت	اسم البادئ	التتابع	تركيز للبادئ	درجة حرارة ارتباط البادئ Tm	حجم الحزمة (bp)
1	GSTM1	5-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C -3 5-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G- 3	10 بيكومول / مايكرو لتر	58م°	215

480	58 °م	10 بيكومول/ مايكرو لتر	5-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3 5-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3	GSTT1	2
312	58 °م	10 بيكومول/ مايكرو لتر	5-GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT-3 5-CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC-3	CYP1A1	3

وأجريت تفاعلات الـ Multiplex-PCR حسب ما ذكره الباحث (Sumana *et al.*, 2010) باستخدام العدة (GoTaq Green Master Mix) التي وفرتها شركة Promega الأمريكية وحسب التعليمات المرفقة. وتحتوي كل أنبوبة على المكونات الأساسية لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR وإضيف إليها الدنا القالب والبادئات الستة التي تم مزجها في أنبوبة خاصة لتفاعل الـ PCR بالاعتماد على البادئات المحظرة مسبقاً، ثم أكمل حجم التفاعل بالماء المقطر المعقم إلى 20 مايكرو لتر كما مبين في (الجدول 2).

الجدول 2: مكونات التفاعل الرئيسية لتقنية الـ Multiplex-PCR

ت	المكونات	الحجم
1	GoTaq Green Master Mix	10 µL
2	البادئات الستة Forward primer + Reverse primer	3 µL
3	قالب الـ DNA template	3 µL
4	ماء مقطر معقم D.W	4 µL
5	الحجم النهائي للخليط	20 µL

ومزجت مكونات التفاعل جيداً باستخدام الماصة الدقيقة ثم تنبذ لمدة 10 ثوانٍ في جهاز الطرد المركزي الدقيق Microcentrifuge لترسيب قطرات محلول التفاعل الموجودة على جدار الأنبوبة، ووضعت الأنابيب في جهاز المبلر الحراري Thermocycler بعناية لانجاز التفاعل باستعمال البرنامج الآتي:

المرحلة	عدد الدورات	رقم الخطوة	درجة الحرارة °م	المدة الزمنية /دقيقة
أولى	1	1	95	5
ثانية	35	1	94	1
		2	58	1
		3	72	1
ثالثة	1	1	72	10
		2	4	∞

بعد انتهاء وقت التفاعل رفعت الأنابيب من جهاز المبلمر الحراري ثم سحب (5) مايكروليتر من كل انبوبة ووضعت في حفر هلام الاكاروز تركيز (2%) ثم رحلت كهربائيا بمقدار (2 فولت /سم) ولمدة 90 دقيقة. وصبغ الهلام بغمره بصبغة بروميد الإثديوم مدة 45-60 دقيقة مع التحريك وصور باستخدام جهاز كاميرا الموبايل.

8- تحليل النتائج:

اجريت تحاليل النتائج عن بوساطة حساب وجود او عدم وجود الحزمة لجينات GSTM1, GSTT1 ومقارنتها مع مجموعة المدخنين (سكائر واركيلة) ومجموعة السيطرة (غير المدخنين).

النتائج والمناقشة

1- الصفات السريرية والاختبارات الدموية:

بينت نتائج البحث كما موضحة في (الجدول 3) شيوع المدخنين بين الاشخاص في السنين الخمسة الأولى من العقد الثالث من العمر في العراق، وهذا يتفق مع دراسات اخرى اجريت في داخل العراق وخارجه مما يؤكد توجه العديد من الشباب الى هذه الظاهرة غير الصحية. كما لوحظ ان مدة التدخين تمتد لفترات طويلة وصلت الى عدة سنوات كما مبين في الجدول نفسه، ونلاحظ أن أعلى مدة كانت عند مجموعة مدخني السكائر اذ بلغت (7.56) سنة وبعدها مجموعة مدخني السكائر والاركيلة (5) ثم مجموعة مدخني الاركيلة (4.42).

الجدول 3: توزيع المدخنين السكائر والاركيلة عمر المدخن، ونوع تدخينه ومدته

ت	نوع المجموعة	مجموعة الدراسة			
		مجموعة مدخني السكائر	مجموعة مدخني الاركيلة	مجموعة مدخني السكائر والاركيلة	مجموعة السيطرة
1	معدل العمر بالسنين	24.9	23.1	22.4	24.4
2	مدة التدخين بالسنين	7.56	4.42	5.00	0

وربما ظن بعض المدخنين أن المياه في الأركيلة تقوم بفلتر المواد السامة الموجودة في التبغ، إلا أن هذا اعتقاد غير صحيح، إذ تعد مضار التبغ المستخدم بها هي نفس مضار تبغ السجائر، بل ثبت أن مدخني الأركيلة يستشقون كمية دخان أكبر بكثير من مدخني السجائر نظراً لعملية الاستنشاق العميقة وطول فترة الاستخدام. وقد أثبتت دراسة جديدة أن تأثير الأركيلة والسجائر فيما يخص الرئتين والجهاز التنفسي من (ضيق في النفس، والسعال، والصفير) وهذا يتفق مع دراسات سابقة (Abu-Amero, 2006) وقد أكدت مراكز السيطرة والوقاية الصحية في الولايات المتحدة على ان التدخين يعد الخطر الوحيد الذي يمكن الوقاية منه، فضلاً عن كونه احدى أهم أسباب الوفاة المبكرة في أنحاء العالم (WHO, 2005).

أولاً: تركيز الهيموكلوبين وحجم كريات الدم الحمر

يبين (الجدول 4) ارتفاعاً في تركيز الهيموكلوبين (Hb) عند المدخنين بالمقارنة مع الأشخاص غير المدخنين إذ سجل أعلى تركيز عند المدخنين للسكاثر والأركيلة، تليها مجموعة التدخين للاركيعة، ثم مجموعة مدخني السكاثر. كما يبين (الجدول 4) ارتفاعاً في معدل حجم الكريات الحمر (P.C.V) للمدخنين بالمقارنة مع الأشخاص غير المدخنين وكذلك يتصدر تدخين الاركيعة والسكاثر أعلى نسبة، يليه التدخين بالاركيعة، ثم التدخين بالسكاثر.

الجدول 4: تأثير التدخين في بعض المعايير الدموية للمدخنين حسب نوع التدخين ومجموعة السيطرة

ت	معايير الدم	مجموعة الدراسة		
		مجموعة مدخني السكاثر	مجموعة مدخني الاركيعة	مجموعة مدخني السكاثر والاركيعة
1	Hb 100 غم/مل	14.61 g/dl	16.2 g/dl	16.8 g/dl
2	P.C.V %	47.9%	48.2%	48.8%
				39.5%

ومن خلال نتائج البحث تبين ان هناك ارتفاعاً في معدل خضاب الدم (Hb) للمدخنين بالمقارنة مع غير المدخنين، إذ كان التدخين بالاركيعة أعلى نسب للاختبارات الدموية وهذا يتفق مع نتائج كثير من الباحثين الذين أكدوا أن تدخين النرجيلة يسبب مخاطر كثيرة مثل تصلب الشرايين والأوعية الدموية والأمراض السريرية والجينية وامراض الدم وغيرها (Brent-Moore , 2005). كما ان زيادة اول اوكسيد الكربون المنتج من التدخين واتحاده بالهيموكلوبين Carboxyhemoglobin يؤدي بالنتيجة الى اختزال قدرة خضاب الدم للارتباط بالأكسجين وبالتالي ارتفاع مستوى خضاب الدم لتعويض النقص الحاصل في الاوكسجين. ولقد تبين من نتائج دراستنا ارتفاعاً في قيم PCV للمدخنين بالمقارنة مع غير المدخنين، وان زيادة مستوى خضاب الدم تؤدي الى زيادة في اعداد كريات الدم الحمر لتعويض النقص الحاصل في مستوى الاوكسجين عند ارتباط CO الناتج من التدخين مع كريات الدم الحمر وبالتالي زيادة قيمة ال PCV. كما يوضح العديد من الباحثين في امراض القلب، ان هواء الشهيق لغير المدخنين يضم 80% أوكسجين و 29% نيتروجين وأقل من 1% أول و ثاني أكسيد الكربون وبخار الماء، اما عند المدخنين فإن هواء الشهيق المستنشق من الدخان يضم على نسبة كبيرة من غاز أول أوكسيد الكربون، وهو غاز سام الذي يتحد بهيموجلوبين الدم أسرع من الأكسجين في هيموجلوبين كرات الدم الحمراء مكانا لحمل الأكسجين، الامر الذي يسبب نقص الدم المؤكسج الذي ينشط إفراز هورمون إرثروبويتين من الكلى الذي ينشط بدوره نخاع العظام فيزيد نسبة كرات الدم الحمراء وهذا يتفق مع العديد من الدراسات السابقة (El-Nachef and Hammond, 2008 ; محمد، 2013).

2- عزل الـ DNA المجيني:

تم الحصول على كميات مناسبة من الدنا المجيني من الدم وذلك باستخدام طريقة عزل الدنا التي وصفها (Joice et al., 2006) في دراسته، للحصول على الدنا في وقت اقصر مما هو معتاد عليه في جميع طرائق الاستخلاص، بالإضافة إلى تركيز ونقاوة مناسبة ما بين (1.4-1.8) كما موضح في الشكل (1).

الشكل 1: تبين الدنا المجيني الذي تم استخلاصه من العينات التي شملتها الدراسة وتم ترحيلها على هلام الاكاروز بتركيز 1%.

3- نتائج تقنية Multiplex PCR:

بعد ترحيل ناتج تقنية الـ Multiplex PCR لـ (103) عينة دنا الجينومي للمدخنين في الحالات الثلاثة (تدخين سكاثر، تدخين سكاثر وأركيلة، تدخين أركيلة فقط) و (70) عينة دنا جينومي غير المدخنين (مجموعة السيطرة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وتصويره بجهاز Gel-Documentation ظهرت الحزم الناتجة من التضاعف لجميع العينات على هيئة حزم رئيسية (الكنترول) وحجمها الجزيئي 312 زوج قاعدي لجميع العينات وظهرت حزمة بحجم زوج قاعدي 480 خاصة للجين GSTT1 وحزمة بحجم 215 زوج قاعدي خاصة للجين GSTM1.

الشكل 2: يوضح الترحيل الكهربائي لناتج تقنية الـ PCR لتضاعف جينات GSTT1، GSTM1، CYP1A1 المرحلة الى هلام الاكاروز 2%. M تمثل دليل، حزمة بحجم GSTT1 480 bp، حزمة بحجم GSTM1 215 bp، حزمة بحجم CYP1A1 312 bp.

أولاً: أنواع الحزم الظاهرة على هلام الترحيل

- 1- في حالة ظهور ثلاث حزم في العينة الحزمة الرئيسية والحزمتين الاخرتين (312, 480, 215 bp) على التوالي فذلك يعني ان العينة لم يحصل فيها فقدان لأي من جينات (GSTM1, GSTT1).
- 2- اما في حالة ظهور الحزمة الرئيسية ومعها حزمة ذات الحجم الجزيئي (480 bp) وهي الحزمة الخاصة بالجين GSTT1 فتكون في هذه الحالة فاقدة للجين GSTM1.
- 3- اما في حالة ظهور الحزمة الرئيسية ومعها حزمة ذات الحجم الجزيئي (215bp) الحزمة الخاصة بالجين GSTM1 فتكون في هذه الحالة فاقدة للجين GSTT1.
- 4- وفي حالة ظهور الحزمة الرئيسية فقط ذات الحجم الجزيئي (312bp) فهذا يعني فقدان كلا الجينين (GSTM1, GSTT1) لدى الشخص كما في الشكل (2).

ثانياً- الطرز الجينية لعينات المدخنين وغير المدخنين (السيطرة):

بينت نتائج الدراسة الحالية المبينة في الجدول (6) وجود فقدان لجين GSTT1 , GSTM1 لدى مجموعة المدخنين بشكل عام، إذ بلغت أعلى نسبة للفقد عند المدخنين بمقدار (55%) واشتملت على فقد الجينين GSTM1, GSTT1، يليها بنسبة (23%) لفقد جين GSTM1 وبنسبة (15 %) لفقد جين GSTT1 أما الطراز الطبيعي الحاوي على الجينين فقد بلغ الفقد اقل نسبة وهي (7 %). أما مجموعة غير المدخنين فكانت أعلى نسبة للطراز الطبيعي إذ بلغت (35.71 %) يليها فقد الجين GSTT1 بمقدار (25.71%)، ومن ثم الطراز الفاقد لجين GSTM1 واقل نسبة كانت من نصيب الطراز الفاقد للجينين GSTT1, GSTM1.

وكان لجينات GSTM1, GSTT1 نصيب كبير من الدراسة في العالم ضمن العائلة الجينية GSTs، ولا فرق بين حدوث الطفرات مثل والحذف في هذه الجينات من حيث تسببها في أحداث عطب تلك الجينات، مما يؤدي الى غياب الانزيمات التي تشفر لها تلك الجينات (Hayes et al., 2005). وغياب تلك الانزيمات يزيد نسبة الإصابة بالعديد من الامراض الخطرة مثل امراض القلب و تصلب الشرايين وامراض الشرايين التاجية (wang Jun et al., 2010).

الجدول 6: الطرز الجينية لجينات GSTM1, GSTT1 لمجموعة المدخنين والسيطرة

الطرز الجينية	مجموعة غير المدخنين العدد (%)	مجموعة المدخنين العدد (%)
GSTM1, GSTT1+ الطرز وراثي طبيعي	25 (35.71 %)	7 (7 %)
GSTM1, GSTT1- الطرز فاقد للجينين	13 (18.57 %)	55 (55%)
الطرز الفاقد لجين GSTM1 –	14 (20 %)	23 (23%)
الطرز الفاقد لجين GSTT1-	18 (25.71%)	15 (15 %)
المجموع	70	100

وقد يعزى السبب الى ان فقد الجينات يؤدي بالنتيجة الى فقدان الانزيمات المسؤولة عن إزالة سمية المركبات الهيدروكربونية الموجودة في دخان السجائر، مما يؤدي الى زيادة الإصابة بالمرض عند الانسان وترتبط عائلة السمية GSTs بإزالة السموم الناتجة من العمليات الايضية للمواد الكيميائية الموجودة في دخان السجائر (Chaouachi, 2009) وهي تبين العلاقة القوية بين دخان السجائر وخطر الإصابة بمرض احتشاء عضلة القلب. وكان من نتائج دراسة (الركابي والصافي، 2013) وجود ارتباط معنوي بين التدخين وفقد جينات GSTT1 و GSTM1 في زيادة خطر الإصابة باحتشاء عضلة القلب وان خطورة الإصابة بالمرض تكون مرتفعة لدى الإناث مقارنة بالرجال عند فقد جينين GSTT1 و GSTM1 .

5- توزيع الجينات حسب نوع التدخين

أظهرت النتائج من خلال المقارنة بين المدخنين وغير المدخنين المبينة في الجدول (7) وجود اختلافات في وجود وفقدان الجينات المدروسة ضمن مجموعة المدخنين، فكانت أعلى نسبة لفقد الجينين GSTM1, GSTT1 لمدخني السكائر والاركيلة بمقدار (75 %)، وأقلها لمدخني السكائر بنسبة (40 %). أما بالنسبة لفقدان الجين GSTT1 فكان أعلى نسبة في مدخني السكائر بلغت (20 %) وأقلها لمدخني الاركيلة بنسبة (11.11%). أما بالنسبة لفقدان الجين GSTM1 فسجلت أعلى نسبة في مدخني السكائر بلغت (30 %) وأقلها عند مدخني السكائر و الاركيلة بنسبة (11.11%) .

الجدول 7: توزيع الطرز الجينية لجينات GSTM1, GSTT1 حسب نوع التدخين

الطرز الجينية	مجموعة مدخني السكائر العدد (%)	مجموعة مدخني النركيلة العدد (%)	مجموعة مدخني السكائر والنركيلة العدد (%)
GSTM1, GSTT1+ الطرز وراثي طبيعي	4 (10 %)	2 (5.55 %)	1 (4.16 %)
GSTM1, GSTT1- الطرز الفاقد للجينين	16 (40 %)	21 (58.33)	18 (75 %)
الطرز فاقد جين GSTM1 –	12 (30 %)	9 (25%)	2 (8.33 %)
الطرز فاقد جين GSTT1-	8 (20 %)	4 (11.11%)	3 (12.5 %)
المجموع	40	36	24

ويعد فقد الجينين GSTM1, GSTT1 احدهما او كلاهما من العوامل التي تؤدي الى تصلب الشرايين وحصول مضاعفات سريرية بين اولئك الذين يتعرضون الى دخان السجائر (Maziak, 2011؛ علوش وآخرون، 2012). وأن المواد الكيميائية المطفرة الموجودة في دخان سجائر تسبب ضرر الـ DNA في الانسجة وكذلك تؤكسد البروتينات وتعمل على زيادة تصلب الشرايين (Yamaguchi, 2001) ووفقا لدراسة (Butter *et al.*, 2001) فان هناك زيادة واضحة في سمك الشريان عند المدخنين في حالة فقدان جين GSTM1 مقارنة مع اولئك الذين لم يفقدوا الجين.

الاستنتاجات

من خلال النتائج التي توصلت اليها هذه الدراسة ارتفاع قيم الهيموكلوبين والـ PCV في مجموعة المدخنين بالمقارنة مع غير المدخنين. ويمكن من خلال استخدام تقنية الـ Multiplex - PCR الكشف من التباين الوراثي بين الافراد. فهناك تأثير وراثي واضح للتدخين بنوعيه لمجموعة العينات المدروسة.

المصادر العربية

الركابي، حسن ريسان؛ الصافي، مشتاق طالب (2013). دراسة مرض احتشاء عضلة القلب وعلاقته بفقد جينات GSTT1 و GSTM1 وعامل خطورة التدخين لدى المرضى في محافظة ذي قار. مجلة جامعة ذي قار، 8 (5).
العطار، هدى يونس؛ جهاد، تمارة وليد (2013). تأثير التدخين السلبي في بعض المعايير الفسلجية والكيموحيوية في ذكور الفئران البيض السويسرية *Mus musculus*. مجلة علوم الرفادين، 24 (3).
علوش، ذكرى علي؛ فخري، محمود أحمد محمد؛ الداغستاني، محمد أحمد حمزة (2012). دراسة كيموحيوية لإنزيم مابلوبيروكسيداز في الدم وعلاقته بتصلب الشرايين. مجلة علوم الرفادين، 23 (3).
محمد، انتصار رزاق (2013). دراسة تأثير تدخين النرجيلة في بعض المعايير الكيموحيوية والدموية في مصل دم الرجال في محافظة النجف الأشرف. مجلة جامعة بابل/ العلوم الصرفة والتطبيقية، 21 (8).

المصادر الأجنبية

Abu – Amero, K.; Olayan, M.; Al - Boudari1, G.H.; Nduna, D. (2006). T null and M null genotypes of the glutathione S-transferase gene are risk factor for CAD independent of smoking. *BMC Medical Genetics*. 7, 38.
Ankathil, R. (2010). Tobacco, genetic susceptibility and lung cancer. *Tobacco Use Insights*. 3, 1–15.
Bai, H.; Xiong. L. (2016). Association of cyP1A1 gene polymorphism and susceptibility to lung cancers a case control study. *J. Clin. Expmed*. 9(3), 6711- 6765.

- Brent-Moore. (2005). Marijuana associated with of reduced humoral and cell mediated immune responses. Some Respiratory Symptoms as Tobacco. *J. General* .The occurrence of higher eosinophil counts in 4.2% of Internal Med.
- Butter, R.; Morris, A.D.; Struthers, A.D. (2001). lisinopril improves endothelial faction in chronic cigarette smokers. *Clin. Sci.*, (lond), **101**(1), 53 -58.
- Chaouachi, K. (2009). Hookah smoking and environmental tobacco smoke (shisha, narghila) (etc). A critical review of the relevant literature and the public health consequences int. *Environ Res. Public. Health.*; **6**, 798843.
- El-Nachef, W.; Hammond, S. (2008). Exhaled carbon monoxide with water pipe use in US students. *JAMA: J. American Med. Associ.*, **299**(1), 36-38.
- Fromme, H.; Dietrich, S.; Heitmann, D.; Dressel, H.; Diemer, J.; Schalz, T.; Jorres, R.A.; Berlin, K.; Volkel. W. (2009). Indoor air contamination during a water pipe (narghile) smoking session food and chemical toxilogical. *Food and Chem. Toxicol.*, **47**(7), 1636 - 1641.
- Hayes, A.; Kucera, M.; Kallel, N.; Sbaffi, L.; Rohling, E.J. (2005). Glacial Mediterranean sea surface temperatures based on planktonic foraminifera assemblages. *Quaternary Sci. Reviews*, **72**(5), 654-8.
- Hayes, J.D.; Flanagan, J.U.; Jowsey, I.R. (2005). Glutathione transferees annual review of pharmacology and Toxicology. *Annual Review Pharmacol. and Toxicol.*, **45**, 51-88.
- He, X.; Fengs. L. (2015). Role of metabolic enzymes p.450 (cyp) on activating procarcinogen and their polymorphisms on the risk of cancers. *Currp Drug Metab.* **16**, 850-63
- Hecht, S.S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **21**, **91**(14), 1194-210.
- Maziak, W. (2011). The global epidemic of water pipe smoking. *Addict. Behav.*, 361 -5.
- Otávio, A.C.; Marcos, B.; de Carvalho, B.; Rogério, A.D.; Abrão, R.; Gilka, J.F.G. (2013). The influence of gene polymorphisms on tobacco and alcohol-induced oral cancer risk. *J. Cancer Therapy*, **4**, 978-988
- Peto, I.A.D.; Borhman, J.; Thun, M.; Heath, C. (1994). "Mortality from Smoking Developed Countries". 1950 – 2000, indirect estimates from national vital statistics / Richard Peto ... [et al.]. Oxford, England. Oxford University.
- Regina, G.; Asta, D.; Ruta, N.; Jone, V. (2009). Maternal smoking, GSTM1 and GSTT1 polymorphism and susceptibility to adverse pregnancy outcomes. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **6**, 1282-1297.
- Ross, R. (1996). "Atherosclerosis". In : cecil text book of medicine. Wyngarrden, J.B.; Smith, L.H. (eds). 18th ed. W.B. Saunders Pupliching Company. 320p.
- Schalm, O.W.; Jain, N.C.; Carroll, E.J. (1975). "Textbook of Veterinary Haematology". 2nd ed., Published by Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 129-250.
- Sumana, C.; Soujatya, D.; Bani, S.; Ashish, G.; Manas, D.; Sumit, R. (2010). Sila Chakrabarti. Polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 Loci as the genetic predispositions of oral cancers and other oral pathologies: Tobacco and Alcohol as Risk Modifiers. *Ind. J. Clin. Biochem.*, **25**(3), 260-272.
- Wang Jun ; Wu FuAn; Liang Yao; Wang Meng (2010). Process optimization for the enrichment of α -linolenic acid from silkworm pupal oil using response surface methodology. *Afr. J. Biotechnol.*, **9**(20), 2956-2964.
- WHO. World Health Organization. (2005). Tobacco Regulation Advisory Note. Water Pipe Tobacco Smoking: Health Effects, Research Needs and Recommended Actions by Regulators .Geneva: World Health Organization, Tobacco Free Initiative.
- Yamaguchi, S. (2001). "Culture and Control Orientations". In D. Matsumoto (Ed.), The handbook of culture and psychology (New York: Oxford University Press). pp. 223-243.
- Zhu, B.Q.; Sun, Y.P.; Sierers, R.E.; Glantz, S.A.; Parmley, W.W.; Wolfe, C.L. (1994). Exposure to environmental tobacco smoke increases mycocardial infarct size in ruts circulation. *Circulation*. 1994 Mar, **89**, 1282 -1290.