



جامعة الموصل

كلية العلوم

معلوماتية حياتية : تأثير الإصابة بفيروسات الحليمات البشرية

في نمط التعبير الجيني

رسالة تقدمت بها الطالبة

آمنة ذنون حامد الدباغ

إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات

درجة الماجستير / في اختصاص

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الدكتور عبدالرحيم ذنون يونس الغزال

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

((يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ

أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا

تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ))

سورة المجادلة

الآية (11)

## شكر وثناء

انطلاقاً من العرفان بالجميل، فإنه ليسرني ويثلج صدري أن أتقدم بالشكر والامتنان لأستاذي، ومشرفي الدكتور عبدالرحيم ذنون الغزال الذي مدني من منابع علمه بالكثير، والذي ما توانى يوماً عن مد يد المساعدة لي وفي المجالات جميعها ، وحمداً لله بأن يسره في دربي ويسر به أمري وأسأل الله أن يطيل عمره ليبقى نبراساً متألئناً في نور العلم والعلماء .

وأقدم بوافر الشكر لعمادة كلية العلوم ممثلة بعميدها الأستاذ الدكتور عماد عبدالقادر الدبوني ، ورئيس قسم علوم الحياة الأستاذ الدكتور حسين إسماعيل ارتين لكل ما قدموه لي من مساعدة ومساندة مكنتني من المضي بخطى ثابتة في مسيرتي العلمية.

وبكل العرفان والامتنان أتقدم بالشكر لمن كلفه الله بالهبة والوقار وأنا احمل اسمه بل افتخار والذي العزيز والغالي الذي بذل جهداً كبيراً في مساعدتي ومد يد العون لي فهو من حصد الاشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم .

وأتوجه بتقديم جزيل الشكر لرمز الحب والعطاء والدتي الحنونة والغالية فدعائها سر نجاحي .

وانتقدم ايضاً بالشكر الكبير لزوجي الحبيب واولادي الاعزاء لكل ماقدموه لي من اجل مساعدتي ودعومي وإنارة الظلمة التي كانت تقف أحياناً في طريقي .

وأثني ايضاً على اخواتي العزيزات فقد تميزوا بالعطاء والوفاء وكانو معي على طريق النجاح .

كما أشكر اصحاب القلوب الطيبة والنوايا الصادقة والد ووالدة زوجي على وقوفهم بجانبني ودعمهم لي .

وعرفاناً مني بالجميل أتوجه بشكري لأساتذتي أعضاء لجنة المناقشة الموقرين على ما تكبدوه من عناء في قراءة رسالتي المتواضعة وإغنائها بمقترحاتهم القيمة .

وفي النهاية يسرني أن أتقدم بجزيل الشكر لكل من مد لي يد العون في مسيرتي العلمية .

الباحثة

## Abstract الخلاصة

يعد علم المعلوماتية الحياتية حقلاً علمياً مهماً لفهم العلاقة بين علوم الحياة والعلوم الأخرى ذات الصلة ثم ربط هذه العلوم معاً مع علم الحاسوب وشبكة المعلومات الدولية (Internet) للحصول على معلومات ذات معنى بايولوجي (حيوي) هادف نستنتج منه نتائج جديدة غير مسبوقة يمكن تطبيقها بشكل أفضل ويفاد منها للتنبؤ بحلول جديدة غير منظورة سابقاً. إن فايروس الحليمات البشرية يعد من أكثر الفيروسات المنتقل عن طريق الجنس في جميع أنحاء العالم و يعد فايروس الحليمات البشرية من الفايروسات المهمة جداً في المجال الطبي لارتباطها بإصابات مختلفة الشدة تتراوح بين آفات جلدية (الثآليل) حميدة إلى حالات خطيرة متمثلة بسرطان عنق الرحم. إذ تمت دراسة تأثير هذه الفايروسات في نمط التعبير الجيني للجينات المناعية (90 جيناً مناعياً) باستخدام تحليلات تقانية Real Time PCR-Array، ثم بيان تأثير هذه الجينات في المواقع النوعية داخل المسارات المناعية الرئيسية في الإنسان باستخدام برامج التنبؤ الجيني (Gene Ontology). تم جمع ثلاث مجاميع من الجينات المناعية الالتهابية التي يتغير تعبيرها الجيني (بالزيادة أو النقصان) بعد إصابة الإنسان بفايروس الحليمات البشرية في الدراسات السابقة المختلفة. اظهرت النتائج ان انواع فايروسات الحليمات البشرية خاصة السرطانية منها قد سببت زيادة في التعبير الجيني ل 25 جيناً مناعياً التهابياً وتراوح مدى الزيادة في التعبير الجيني بين 6.47 ضعفاً في الجين *CCL18* و 79.22 ضعفاً في الجين *IL1RN*. كما أدت الإصابة إلى نقصان في التعبير الجيني ل 6 جينات مناعية وتراوح معدل هذا النقصان بين 0.16 في الجين *CCL3* و 0.55 في الجين *CCL1*. أما نمط التعبير الجيني المناعي بعد الإصابة بهذه الفايروسات فهو 25 زيادة : 6 نقصان كما أثرت الإصابة بهذه الفايروسات في 9 من أهم المسارات المناعية الرئيسية في الإنسان ، وتم تحديد نوع الجينات والمناطق التي أثرت فيها هذه الجينات ضمن هذه المسارات من خلال برنامج التنبؤ الجيني.

ففي مسار Cytokine- Cytokine Receptor Interaction pathway تأثر بفعل 18 جيناً مناعياً وهم *IL-8 , CXCL9 , CXCL11 , CCL20 , CCL17 , CCL19 , CCL21 , CCL2 , CCL7 , CCR7 , CCL18 , INF-α , IL-10 , IL-10RA , CD40LG , TNF , IL-1A , IL-1B*. أما مسار Chemokine signaling pathway فقد تأثر بفعل جينين وهما chemokine و chemokineR . ومسار Toll-like receptors signaling pathway ظهر فيه تأثير ستة جينات من مجموع 25 جين ويلاحظ هذا التأثير في المراحل الاخيرة من المسار هذه الجينات تتمثل بـ *TNF-α , IL-1B , IL-8 , INF-α , MIG , CXCL11( I-TAG)* .

أما مسار NOD-like receptor signaling pathway تأثر بفعل اربعة جينات أثرت في مواقع مختلفة وهي *IL-1B* , *TNF- α* , *CCL2* , *IL-8* . و بالنسبة لمسار Asthma signaling pathway فقد تأثر بفعل ثلاث جينات مناعية وهي *TNF- α* , *CD10L* , *IL-10* .

ومسار Graft-versus-host disease pathway تأثر بفعل اثنين من الجينات المناعية بمواقع مختلفة في المسار وهذه الجينات هي *TNF- α* , *IL-10* . كما إن مسار Rig-1-like receptor signaling pathway فقد ظهر تأثير جينين من الجينات المناعية في المراحل الاخيرة من هذا المسار وهذه الجينات هي *IL-8* , *INF- α* . و مسار Apoptosis pathway تأثر بفعل جينين هما *IL-10* , *TNF- α* . وأخيرا مسار T-cell receptor signaling pathway فقد ظهر فيه تأثير ثلاث جينات هي *CD40LG* , *IL-10* , *TNF- α* .

## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	الفقرة
3-1	الفصل الأول: المقدمة .	1
14-4	الفصل الثاني: استعراض المراجع.	2
4	المعلومات الحياتية .	1-2
5	مجال المعلومات الحياتية .	1-1-2
5	اهداف المعلومات الحياتية .	2-1-2
6	تطبيقات المعلومات الحياتية .	3-1-2
8	فايروس الحليمات البشرية .	2-2
10	دورة حياة فيروس .	1-2-2
10	تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل .	3-2
11	المصفوفة الدقيقة .	4-2
13	التنبؤ الجيني .	5-2
13	السايتوكينات .	6-2
20-15	الفصل الثالث: مواد العمل وطرائقه .	3
15	جمع عينات الجينات المناعية .	1-3
17	حساب التغير في التضاعف الجيني .	2-3
18	تحليل البيانات الجينية .	3-3
19	الجينات المستخدمة في تقانة RT-PCR array .	4-3
20	التنبؤ الجيني.	5-3
20	التحليل الإحصائي .	6-3
54-21	الفصل الرابع:النتائج والمناقشة .	4
56-55	الاستنتاجات والتوصيات.	5
74-57	المصادر .	6
-	الملحق .	7

## قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
16	العينات الجينية المناعية ومكرراتها ونوع التغير الحاصل في تعبيرها الجيني بعد الإصابة بفيروس الحليمات البشرية.	1-3
17	قيم التعبير الجيني المستخرجة وفق التغير الحاصل بالتعبير الجيني (Fold change).	2-3
33	المعدل العام للتعبير الجيني للجينات التي عانت من زيادة في التعبير الجيني ضمن المجاميع الثلاث.	1-4
34	المعدل العام للتعبير الجيني للجينات التي عانت من نقصان في التعبير الجيني ضمن المجاميع الثلاث.	2-4

## قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1-4	انتشار الجينات الزائدة في التعبير الجيني (دوائر حُمْر) والناقصة في تعبيرها الجيني (دوائر خُضْر).	21
2-4	الجينات التي حصلت فيها زيادة في التعبير الجيني في المجموعة الأولى بعد الإصابة بفايروس HPV مرتبة على وفق عدد تضاعف التعبير الجيني.	22
3-4	الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (أكثر من ضعف) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) والممثلة بأعمدة كل عمود بلون يمثل جيناً محدداً مع بيان اسم كل جين وفق الأعمدة مرتبة من اليسار إلى اليمين.	23
4-4	الجينات (عدد6) التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني (أقل من ضعف) مقارنة بالسيطرة (المجموعة الأولى).	23
5-4	الجينات التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني بأقل من ضعف واحد (المجموعة الأولى) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) ممثلة بأعمدة (كل جين بلون محدد) مع بيان اسم كل جين وفق ترتيب الأعمدة.	24
6-4	تظهر الخريطة الساخنة للجينات ضمن المصفوفة الخاصة بتقانة RT-PCR -Array وتظهر التعبير العام لكل الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (المربع الأحمر) او نقصان (المربع الأخضر).	24
7-4	انتشار الجينات التابعة للمجموعة الثانية التي حصل لها زيادة ( 25 جيناً بلون أحمر) و نقصان ( 6 جينات بلون أخضر) في التعبير الجيني مقارنة مع السيطرة .	25

26	الجينات التي حصل فيها زيادة في التعبير الجيني في المجموعة الثانية بعد الإصابة بفيروس HPV مرتبة على وفق عدد تضاعف التعبير الجيني (بين 6.49 و 90.50 ضعف) ومقارنة ذلك مع السيطرة (اضعف).	8-4
26	الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (أكثر من ضعف) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) ضمن المجموعة الثانية والمثلة بأعمدة كل عمود بلون يمثل جيناً محدداً مع بيان اسم كل جين وفق الأعمدة مرتبة من اليسار إلى اليمين.	9-4
27	الجينات (عدد 6) التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني (أقل من ضعف) مقارنة بالسيطرة والتابعة للمجموعة الثانية.	10-4
28	الجينات التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني بأقل من ضعف واحد (المجموعة الثانية) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) ممثلة بأعمدة (كل جين بلون محدد) مع بيان اسم كل جين وفق ترتيب الأعمدة.	11-4
28	تظهر الخريطة الساخنة للجينات التابعة للمجموعة الثانية ضمن المصفوفة الخاصة بتقانة RT-PCR -Array التعبير العام للجينات كلها التي حصل لها زيادة في التعبير الجيني (المربع الأحمر) أو نقصان (المربع الأخضر).	12-4
29	انتشار الجينات التابعة للمجموعة الثالثة والتي حصل لها زيادة (بلون أحمر) و نقصان (بلون أخضر) في التعبير الجيني مقارنة مع السيطرة.	13-4
30	الجينات التي حصلت فيها زيادة في التعبير الجيني في المجموعة الثالثة بعد الإصابة بفيروس HPV مرتبة على وفق عدد تضاعف التعبير الجيني 2.4623 ضعف في الجين CCL15 و 37.187 ضعف في الجين IL1RN.	14-4

30	الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (أكثر من ضعف) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) ضمن المجموعة الثالثة والممثلة بأعمدة كل عمود بلون يمثل جيناً محدداً مع بيان اسم كل جين على وفق الأعمدة مرتبة من اليسار إلى اليمين.	15-4
31	الجينات التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني (أقل من ضعف) مقارنة بالسيطرة والتابعة للمجموعة الثالثة، كل منحني يمثل جيناً.	16-4
32	الجينات التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني بأقل من ضعف واحد (المجموعة الثالثة) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) ممثلة بأعمدة (كل جين بلون محدد) مع بيان اسم كل جين على وفق ترتيب الأعمدة.	17-4
32	تظهر الخريطة الساخنة للجينات التابعة للمجموعة الثالثة ضمن المصفوفة الخاصة بتقانة RT-PCR - Array التعبير العام للجينات كلها التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (المربع الأحمر) او نقصان (المربع الأخضر).	18-4
42	تأثير الجينات المناعية الالتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفايروس الحليمات البشرية على المسار Cytokine- Cytokine Receptor Interaction pathway	19-4
44	تأثير الجينات المناعية الالتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفايروس الحليمات البشرية في المسار Chemokine signaling Pathway	20-4
45	تأثير الجينات المناعية الالتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفايروس الحليمات البشرية في المسار Toll- like receptors signaling pathways	21-4
47	تأثير الجينات المناعية الالتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفايروس الحليمات البشرية في المسار NOD-like receptor signaling pathways	22-4

48	تأثير الجينات المناعية الالتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحليمات البشرية في المسار Asthma signaling pathway	23-4
50	تأثير الجينات المناعية الالتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحليمات البشرية في المسار Graft- versus-host disease pathway	24-4
51	تأثير الجينات المناعية الالتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحليمات البشرية في المسار Rig-1-like receptor signaling pathway	25-4
53	تأثير الجينات المناعية الالتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحليمات البشرية في المسار Apoptosis pathway	26-4
54	تأثير الجينات المناعية الالتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحليمات البشرية في المسار T-cell receptor signaling pathway	27-4

## قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح الأجنبي
APC	Antigen Presenting Cell
cDNA	Complementary DNA
Ct	Threshold Values
DNA	Deoxyribonucleic Acid
GO	Gene Ontology
HPV	Human Papilloma Virus
ICTV	International Committee On Taxonomy Of Viruses
KEGG	Kyoto Encyclopedia Of Genes And Genomes
LCR	Long Controlled Region
MAPK pathway	Mitogen- activated protein kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NF-KB	Nuclear factor kappa –light chain-enhancer of activated B cells
NLR	NOD-Like Receptors
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSI-BLAST	Position Specific Iterated - Basic Local Alignment Search Tool
RIG-1	Retinoic acid –inducible gene 1
RLRs	Rig-1-Like Receptor
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
STAT	Signal Transducer And Activator Of Transcription
TCR	T-Cell-Receptors
Th	T-Helper Cell
TLR	Toll-Like Receptors
URR	Upstream Regulatory Region

# الفصل الأول

## المقدمة

## Introduction

## 1- المقدمة Introduction

المعلوماتية الحياتية Bioinformatics هو حقل علمي سريع النمو داخل العلوم الحيوية (الحياتية) تطور نتيجة الاحتياج لترتيب كمية كبيرة من المعلومات الجينية والبيانات الكيموحيوية ويعود أصلها لجهود بحوث عالمية سواء كانت حكومية أم فردية أم مؤسساتية . وتعد المعلوماتية الحياتية حقلاً علمياً مهماً لفهم العلاقة بين المعلومات المختلفة من مجالات البحوث مثل الخلية الحيوية وعلم الاحياء الجزيئي والكيمياء الحيوية التركيبية وعلوم الحاسوب وعلم الأنزيمات وعلم الفيزياء وعلم الأمراض. إن المعلوماتية الحياتية تستخدم قدرة الحاسوب على فهرسة المعلومات وتنظيمها وترتيبها في معنى حيوي (حيوي) هادف نستنتج منه أهدافاً جديدة غير مسبوقة ( Tisdall , 2001 ) .

من إحدى التقانات الحديثة في مجال علم الاحياء الجزيئي وضمن المعلوماتية الحياتية التي بدأت توفر ثروة من المعلومات الجديدة هي قياس مقدار التعبير الجيني Measurement of gene expression التي توظف مجموعة من البيانات المميزة بين اثنين أو أكثر من الصفات البايولوجية الحيوية التي تحددها جينات خاصة ، ومن ثمَّ تمكنا من التوصل الى صورة التعبير الجيني gene expression profile ( Polenski and Kimmel , 2007 ). فضلاً عن ذلك فإن النظام الحيوي أفاد بشكل كبير بتقدم علوم الحاسوب المرتبط مع مفهوم اللوغارتم الجيني Genetic algorithms والنظام المناعي الصناعي Synthetic immune system وحوسبة المادة الوراثية DNA computing وتهجين ال DNA باستخدام رقاقة الجين Gene chips التي انتهت بابتكار المصفوفة الجينية الدقيقة Microarray ( Baldi and Brunak , 2001 ).

يعد فايروس الحليمات البشرية Human papilloma virus (HPV) من الفايروسات المهمة جداً في المجال الطبي لارتباطه مع الكثير من الحالات المرضية المختلفة في شدة الإصابة ابتداءً من الإصابات الحميدة التي تنتهي بأفات جلدية (الثآليل) إلى حالات خطيرة متمثلة بسرطان عنق الرحم. ينتمي فايروس الحليمات البشرية إلى عائلة كبيرة وواسعة (Papillomaviridae) وهي فيروسات صغيرة الحجم غير محاطة بغلاف والمادة النووية لها تكون من نوع DNA المزدوج السلسلة (Christensen , 2016). توجد هذه الفايروسات بانواع مختلفة هناك أكثر من 100 نوع من HPV معروفة لحد الآن التي تصيب الحيوانات بضمنها الإنسان إذ إنها تصيب الخلايا الطلائية القاعدية والنسيج المخاطي الطلائي أو الجلد وعنق الرحم والجهاز التناسلي لكلا الجنسين في الانسان.

تعد الإصابة بفايروس الحليمات البشرية من أكثر الأمراض المنتقلة عن طريق الجنس في أنحاء العالم جميعها (Martinez, 2007) وتقسّم أنواعه الى مجموعتين : الأنواع قليلة الخطورة التي غالباً تسبب الثآليل الحميدة مثل نوعي 6 و 11 وكلاهما يسببان نحو 90 % من الثآليل الجنسية وتقريبا مسؤولة عن إصابات الجهاز التنفسي أيضا ( Stanley, 2012 ).

أما الأنواع عالية الخطورة أو الأنواع المسرطنة التناسلية فتتمثل على الأغلب بالنوعين 16 و 18 وتكون سبباً في إحداث سرطان عنق الرحم (Gyongyos *et al.*, 2012), الذي يعد ثاني أبرز سبب لوفيات الإناث المصابين بالسرطان في العالم (Munagala *et al.*, 2011).

إن HPVs تتجنب دفاعات النظام المناعي الطبيعي للمضيف وتتمثل بالخلايا البلعمية Macrophages و Micophages والسايوتوكينات Cytokines والمتمم Complement والحواجز الطلائية، فضلاً عن المناعة المكتسبة Acquired immunity التي تشمل الأجسام المضادة Antibodies والخلايا السمية Cytotoxic cells والخلايا القاتلة الطبيعية (NK) Natural killer cell (Stanley, 2009).

في هذه الدراسة تم التركيز على Cytokines التي تعد بروتينات صغيرة الوزن الجزيئي تفرز من قبل خلية واحدة لتحول أو تغير سلوكها أو سلوك خلية أخرى بإرسال إشارات داخل خلوية من خلال الارتباط بمستقبلات سطح الخلية المتخصصة. على رغم من أن معظمها ذائب إلا أن بعضها ممكن أن يرتبط بالغشاء، ومن خلال موقعه يعمل على حث مسارات مناعية مهمة أثناء الإصابات الميكروبية المختلفة ومنها الإصابات الفايروسية. بعض السايوتوكينات لها قابلية الجذب الكيميائي Chemo attractant activity نحو المناطق الالتهابية المصابة وتسمى Chemokines وتؤدي دوراً مهماً في هجرة كريات الدم البيض وتنتج عن طريق معظم الخلايا (Parkin and Cohen, 2001). إن دراسة التعبير الجيني تعد أحد أهم الطرائق الجزيئية لدراسة عملية قيام الجين بنسخ المعلومات الوراثية على الحامض النووي الرسول mRNA وتحديد عدد هذه النسخ (زيادة عن الحد الطبيعي أو نقصان) بسبب الإصابة بكائن مجهري أو فايروس أو بعد المعاملة بدواء معين أو مواد كيميائية مختلفة. هذه المعلومات تنعكس على البروتينات المنتجة عن ال mRNA وعلى إثرها تتحدد صفات الجينات المتأثرة، لذا فإن تحديد نمط التعبير الجيني بسبب الإصابة بفايروس محدد يعطي أهمية علمية وطبية وعلاجية مهمة جداً في التصدي لمثل هذه الإصابات.

من إحدى الطرائق المهمة لدراسة التعبير الجيني هي طريقة المصفوفة الجينية الدقيقة Microarray التي تتضمن دراسة الآلاف من الجينات في طبعة واحدة أو One finger print أو دراسة كل المحتوى الجيني لكائن معين في طبعة واحدة، وهذا يستلزم بذل جهد كبير في تحليل النتائج وتصنيفها، لذلك تم في هذه الدراسة استخدام طريقة حديثة أخرى تربط بين تقانة Microarray وتقانة تضاعف المادة الوراثية الآني Real-Time PCR للحصول على تقانة جديدة هي Real-Time PCR- Array ومن خلالها يتم التركيز على خط محدد من الجينات مثل خط مجموعة الجينات المناعية الالتهابية ومجموعة جينات انتحار الخلية Apoptic genes ومجموعة جينات تكوين الأوعية Angiogenesis وغيرها كثير من خطوط الجينات المختلفة (Chen *et al.*, 2009; Venkatasubbarao, 2004).

تعد هذه الدراسة الاولى من نوعها على مستوى العراق والتي من خلالها تم دراسة تأثير الإصابة بفيروسات الحليمات البشرية في نمط التعبير الجيني للجينات المناعية المهمة للإنسان ، كما تأتي أهمية هذه الدراسة من خلال ربط تقنيات حديثة مع بعضها والتي تتمثل بتقنية Real Time PCR مع تقنية Microarray اضافة الى ادخال أهمية التنبؤ الجيني Gene Ontology على المسارات الايضية المهمة في الانسان من خلال تحديد مكان هذه الجينات المؤثرة على هذه المسارات. وبشكل أكثر تفصيلاً تهدف الدراسة الى :

### أهداف الدراسة :

- 1- الإفادة من علم المعلوماتية الحياتية بوصفه موضوعاً حديثاً لتحديد نمط التغيرات في التعبير الجيني المناعي الالتهابي للإنسان بعد إصابته بفيروسات الحليمات البشرية ، وباستخدام تحليلات تقانة مصفوفة التضاعف الجيني المتسلسل الآني RealTime -PCR Array . السبب في اختيار هذه التقانة هو أن من خلال هاتين التقنيتين فقط نستطيع تحديد نمط التغيير الحاصل في التعبير الجيني المناعي للإنسان ولأن هذه التقنية تركز على خط محدد من الجينات وليس كل انواع الجينات .
- 2- تحديد وظيفة كل جين ومعرفة مدى تأثير الإصابة بفيروس الحليمات البشرية على الجينات خلال المسارات المناعية الرئيسية من خلال علم التنبؤ الجيني Gene Ontology باستخدام برنامج David Functional Annotation Bioinformatic Microarray Analysis
- 3- تحديد مناطق تأثير هذه الجينات المناعية في المسارات المناعية الرئيسية المهمة ضمن الخريطة الوراثية باستخدام KEGG pathway mapping وبالتالي تحديد مدى تأثيرها الامراضي في هذا المسار ، ومن ثم تحديد مدى تأثير الإصابة في الحالة المرضية والصحية للإنسان .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

**Literatures Review**

## 1- استعراض المراجع Literature Review

### 1-2 المعلوماتية الحياتية Bioinformatics

في السنوات العشر إلى خمس عشرة الأخيرة أصبح الحاسوب مطلباً أساسياً لكل علماء الخلية وعلم الاحياء الجزيئي , ويعد علم المعلوماتية الحياتية فرعاً علمياً يستخدم المعلومات التقانية لتمييز المعلومات الحيوية وتحليلها وتصنيفها للإجابة عن الأسئلة البيولوجية المعقدة . كما يربط علم الاحياء في فروع متعددة من المعرفة , وبالتفصيل يمكن أن يعرف على أنه نقطة مشتركة بين العلوم الحيوية المختلفة الاختصاصات وعلم الحاسوب إذ أنها تتضمن حل المشاكل الحيوية المعقدة باستخدام أدوات وأنظمة الحاسوب . وأيضاً تشمل جميع المعلومات الاساسية لعلوم الاحياء وتنظيمها و تخزينها وإمكانية استرداد المعلومات الحيوية من قواعد البيانات ( Abd-Elsalam , 2003 ) .

لايزال الخلاف قائماً حول تعريف المعلوماتية الحياتية بشكل واسع على أن هذا المصطلح يضم أي تطبيق لطرائق الحاسوب لحل مشاكل علوم الحياة المتعلقة بكل اختصاصات علوم الحياة وصولاً إلى علم المعلوماتية الحياتية الجزيئية والمنبثق من علم الاحياء الجزيئي الحاسوبي Computational molecular biology ( Counsell, 2003 ) .

المعلوماتية الحياتية الجزيئية Molecular bioinformatic هو مفهوم احياي في مصطلح جزيئي مرتبط مع دلالات فيزيائية وكيميائية وتقانة المعلومات التطبيقية المشتقة من فرع مثل تطبيق الرياضيات , وعلوم الحاسوب والإحصاء لفهم وتنظيم المعلومات المرتبطة بهذه الجزيئات بشكل واسع . باختصار المعلوماتية الحياتية هي إدارة أنظمة المعلومات لعلم الاحياء الجزيئي ولها العديد من التطبيقات العلمية ( Luscombe *et al* , 2001 ) كما تتضمن قاعدة بيانات لتقانة المعلومات التطبيقية لخرن كمية كبيرة من البيانات البيولوجية وتنظيمها وتحليلها ( Abd-Elsalam, 2003 ) .

يؤدي حقل المعلوماتية الحياتية دوراً مهماً وكبيراً في دراسة المشكلات الحيوية الأساسية إذ يساعد في ربط نتائج التجارب الصحيحة بالمختبر مع القابلية التحليلية العظيمة للحاسوب للسيطرة على الانفجار الكبير في المعلومات التركيبية والتسلسلات الرقمية للمادة الوراثية Genetic digital sequences لمختلف الكائنات ومنها الإنسان لتكون متوفرة وسهلة المنال للباحثين لحل المشاكل المستعصية خاصة في العلوم الطبية ( Baxevanis and Ouellette, 2001 ) .

## 1-1-2 مجالات المعلوماتية الحياتية Bioinformatics spectrum

إن تطور تقانة المعلوماتية الحياتية سمحت بتوسيع التحليلات البيولوجية في اتجاهين، الاتجاه الأول يتمثل باستخدام هذا العلم كطريقة ممكنة ومحتملة لعملية إنتاج أدوية سليمة ذات هدف غير قابل للخطأ، وذلك من خلال أخذ جين مفرد، ثم تحليله ليفسر بشكل أوسع من خلال ربطه مع البروتين الذي يشفره وبدءاً من تسلسل الجين نستطيع تحديد تسلسل البروتين بشكل غير قابل للخطأ. الاتجاه الثاني في التحليلات البيولوجية هو مقارنة الجين أو منتجاته مع غيرها وبالأصل هناك حساب بسيط يستخدم لمقارنة التسلسلات والتراكيب البروتينية والمرتبطة مع عدد كبير من البروتينات الفيروسية أو البروتينات الأخرى، وباستخدام التحليلات الحسابية المعدلة يمكن استنتاج صيغ التسلسلات والقوالب التركيبية المحتملة التي تعرف بكل عائلة من البروتينات إذ من الممكن استخدام مثل هذه البيانات أيضاً لإنشاء الشجرة الوراثية العرقية لتعقب مسار نشوء البروتينات المختلفة والحصول على المزيد من البيانات من خلال تخزين المعلومات في قاعدة بيانات واسعة يمكن الدخول إليها مباشرة وبسهولة عبر الشبكة العنكبوتية (Luscombe *et al*, 2001).

## 2-1-2 أهداف المعلوماتية الحياتية Aims of Bioinformatics

تتمثل أهداف المعلوماتية الحياتية بشكل عام بثلاثة محاور الأول: تنظيم البيانات بشكل سهل من أجل السماح للباحثين لإدخال المعلومات الموجودة وإخضاعها لإدخالات جديدة كما لو أنها منتجات حديثة مثل بنك الجينات وبنك البروتينات وموقع التراكيب ذات الجزيئات الكبيرة *Macromolecular structures* وتسلسلات النكليوتيدات داخل المحتوى الوراثي لأي كائن، ولهذا فإن الغرض من المعلوماتية الحياتية يمتد لمدى أوسع وأبعد مما يظن العديد من الباحثين في هذا المجال. المحور الثاني، يتمثل في تطوير الأدوات والمصادر التي تساعد في تحليل البيانات. مثلاً، لديك تسلسل بروتين معين، من المهم مقارنته مع تسلسلات مدروسة سابقة وهذا يحتاج تحليلات جديدة وحديثة تعتمد على بحوث وبرامج متقدمة مثل

PSI-BLAST (Position Specific Iterated - Basic Local Alignment Search Tool) إن تطور مثل هذه المصادر يعطي فهماً شاملاً وواسعاً لعلوم الحياة. المحور الثالث، استخدام هذه الأدوات لتحليل البيانات وتفسير النتائج بأسلوب بايولوجي ذي معنى وهدف، إذ أن الشكل التقليدي للدراسات البيولوجية السابقة فحص الأنظمة الفردية بالتفصيل دون ربطها مع المعلومات الأخرى للحصول على تحليلات أكبر بينما في المعلوماتية الحياتية يمكن الآن الاستدلال على التحليلات الشاملة لجميع البيانات

المتوفرة مع هدف الكشف عن المبادئ الشائعة التي تطبق عبر العديد من الأنظمة وإبراز ملامحها الجديدة (Luscombe *et al* , 2001) .

يؤدي حقل المعلوماتية الحياتية دوراً كبيراً وامتزاجاً في دراسة المشاكل الطبية الحيوية الأساسية ومواجهة التحديات التي تواجه علماء الأحياء ، ومستخدمو الحاسوب أسهموا بشكل كبير في اكتشاف الجين وتصميم نماذج جزيئية عالية في الدقة لمواقع فعل الأدوية وتحديد مواقع تأثير الطفرات الوراثية المختلفة وإجراء تجارب لأنواع أخرى التي من المحتمل ان تكشف عن علاقات سابقة غير معروفة مع الحفاظ على تركيب ووظيفة الجينات والبروتينات حيث انه يمكن للطبيب معرفة الدواء الافضل للمريض وتحديد حدة الاستجابة للدواء من خلال فحص المادة الوراثية للشخص ومقارنتها بما هو موجود في قواعد البيانات معرفة الى فئة ينتمي هذا المريض وفي حالة الخطر يمكن تغيير الجرعة بدقة او توجيه المريض لاستخدام دواء اخر وتغيير خطة العلاج بأكملها مما يجنب المريض مخاطر الادوية قبل استعمالها ( Sahu and Kharkar , 2016 ) . هذه التحديات في ضوء الكمية الكبيرة من البيانات تم استغلالها لإنجاز مشروع الجينوم البشري وهو نتيجة لجهود متسلسلة منذ بداية البحث العلمي ولحد اليوم وكذلك ينعكس بالنتيجة على توفير العلاج المناسب للأمراض الإنسان وإسعاد البشرية من خلال الدور الحيوي للمعلوماتية الحياتية في مساعدة البيولوجيين على تجميع البيانات الجينية ومعالجتها لدراسة وظيفة البروتين وكذلك مساعدة الباحثين في مجال الصيدلة لعمل دراسة مفصلة لتركيب البروتينات ليسهل عملية تصنيع الدواء (Baxevanis and Ouellette, 2001) . إن من أهم المهام الأنموذجية التي يمكن التوصل لها من خلال المعلوماتية الحياتية هي استنتاج شكل البروتين ووظيفته من تسلسلات معطاة من الأحماض الأمينية والكشف على الجينات والبروتينات كلها المشفرة في الجينوم الواحد لكل كائن وتحديد مواقع محددة في تركيب البروتينات التي تعد مواقع تأثير جزيئات الدواء التي يمكن أن ترتبط بها (Cohen , 2004) .

### 3-1-2 التطبيقات العملية للمعلوماتية الحياتية Applications of Bioinformatics

إن المعلوماتية الحياتية لها العديد من التطبيقات من أهمها أولاً: إيجاد التشابهات الجزيئية بين الجزيئات الحيوية المختلفة ، إذ أن أحد الأسباب الرئيسة وراء اكتشاف علم المعلوماتية الحياتية هو البحث عن هذه المتشابهات ومن ثم تشخيص البروتينات المتماثلة التي لها بعض التطبيقات العلمية المباشرة ، ومن الأمثلة الأكثر وضوحاً هو نقل المعلومات بين البروتينات المرتبطة مع بعضها البعض بطريقة متكافئة، فضلاً عن توظيف علم الجينات إلى تطبيقات عملية مختلفة، ومن أهمها تلك التي ترتبط بالعلاج الجيني . إن إيجاد الجزيئات المتشابهة يتضمن تحديد مناطق التشفير في تسلسلات

الجينوم وتحديد المعلومات الوظيفية لكل جين، ثم نقل المعلومات بشكل متكرر لتوضح وظائف الجينات المفردة .

ثانياً : صناعة الأدوية المتخصصة هي واحدة من أهم التطبيقات الطبية للمعلوماتية الحياتية حيث ان بعض انواع الادوية ممكن ان تسبب اعراض جانبية او تعمل على شريحة محددة فقط من المرضى لذا فإن المعلوماتية الحياتية تلعب دور في اعادة خطوط انتاج هذه الادوية لكي تخدم المرضى من خلال فحص المادة الوراثية لهم ومقارنتها مع ما هو موجود في قواعد البيانات المتخصصة للتأكد من كونها مناسبة لهم (Buchan *et al.*, 2011) .

ثالثاً : تحديد مواقع بيانات عالمية مركزية تستطيع بفعالية تخزين المعلومات جميعها التي لها علاقة بالجينوم والتراكيب الجزيئية الصغيرة والكبيرة وأنماط التعبير الجيني. وكل هذا مفيد لتكثيف هذه المعلومات كلها في اتجاه مفهوم وحقيقة أن المستخدمين يمكنهم أن يحصلوا ويحلوا المشاكل الحيوية المستعصية كلها بسهولة .

رابعاً : إمكانية دراسة حالات الاستنساخ الجيني (تحويل المعلومات الوراثية من الجينات إلى الحامض النووي الرسول mRNA ) من خلال ربط ذلك بالمعلوماتية الحياتية التي توفر المعلومات التي تربط DNA مع البروتينات التي لها دور رئيس في مجالات النشاط كلها داخل الكائن والمساهمة في العمليات المختلفة مثل الاستنساخ و التضاعف وإعادة الترتيب والإصلاح وغيرها.

خامساً : التوصل إلى نتائج الدراسات التركيبية الرابطة بين الجين والبروتين كما حصل في 2001 إذ تم تحديد 379 تركيباً من معقدات Protein –DNA وتحليل هذه التراكيب يعطي رؤية واضحة حول المبادئ الأساسية في ارتباط هذه المعقدات فضلاً عن معرفة تسلسلات القواعد النيتروجينية وتمييزها وكيفية ارتباطها ضمن تركيب DNA.

سادساً :المساهمة في إعداد الدراسات الجينية Genomic Studies, إذ إن كثرة البيانات البايوكيميائية المتوفرة ضمن المعلوماتية الحياتية تركزت على تشخيص عوامل الاستنساخ في الجينوم وهي بروتينات مهمة جداً من خلال أدائها لوظيفية تطويرية بين الجينات والبروتينات.

سابعاً : المساهمة في دراسات التعبير الجيني Gene Expression Studies التي تركز على ابتكار طرائق لمعرفة أصل التشعبات الجينية من خلال التشابه في التعبير الجيني، وذلك من خلال تحديد البروتينات التي يحصل لها تعبير معا تحت شروط خلوية مختلفة ، ومن ثم يمكن الحصول على مختلف الطرائق الشائعة في ترتيب التشابك الجيني وخرائط التنظيم الذاتي والتعبير الجيني (Luscombe *et al* , 2001) .

إن الدور الرئيس للمعلوماتية الحياتية هو المساعدة في استنساخ وتخمين وظائف للجينات من البيانات الموجودة ضمن المواقع العالمية المختلفة وتغطي كائنات متنوعة وبشكل مستمر يلجأ إلى

مبادئ التطور البايولوجية للتخلص من المعلومات غير المفيدة اعتماداً على توفر البيانات من العلماء المعاصرين التي تؤدي إلى فهم أفضل لوظائف الجينات والتي يمكن تلخيصها بما يأتي : مقارنة التسلسلات لوحدات الحامض النووي و تحديد النشوء التطويري للجينات ومعرفة التشعبات الشجرية للمحتوى الوراثي phylogenetic tree (علم الوراثة العرقي) وتحديد الصيغ المتشابهة والمختلفة في هذه التسلسلات وتحديد التراكيب ثلاثية الأبعاد لهذه التسلسلات وتخمين مدى استنساخ الجينات إلى mRNA التي تدخل في تنظيم الخلية وتحديد وظيفة البروتين والمسار الأيضي (Cohen, 2004).

## 2-2 فايروس الحليمات البشرية Human papilloma virus

جمعت فايروسات الحليمات البشرية سابقاً مع فايروسات *polyomavirus* في عائلة واحدة هي *papoviridae* وكان هذا اعتماداً على عوامل متشابهة بينهم ، وهي أن المحفظة البروتينية غير مغلقة Non-enveloped capsid التي تحوي مادة وراثية مزدوجة السلسلة ودائرية من نوع DNA ولكن فيما بعد فصلت إلى مجموعتين من الفيروسات مختلفة في أحجام الجينوم والترتيب و التنظيم بشكل كامل ، وتم تمييزها بشكل رسمي من قبل اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات (ICTV) International Committee on Taxonomy of Viruses إلى عائلتين منفصلتين هما *polyomaviridae* و *papillomaviridae* (de Villiers et al ., 2004).

إن فايروس الحليمات البشرية HPV صغير نسبياً وله محفظة بروتينية Capsid وهو غير محاط بغلاف قطره 55 نانوميتر وله تناظر عشريني الوجه Icosahedral ويتكون من 72 وحدة تركيب صغيرة Capsomer . إن فايروس الحليمات البشرية يمكن أن يقال إنه مشابه لكرة الكولف عند رؤيته عبر المجهر الإلكتروني والمادة الوراثية له تتكون من جزيئة مفردة من DNA الدائري المزدوج السلسلة تحتوي على ما يقارب 7900 bp مرتبطة مع بروتينات هستونية. (Burd, 2003) . على الرغم من صغر حجمها إلا أن التركيب البايولوجي الجزيئي لها معقد جداً . باختصار إن من أهم الجينات المكونة له هي الجينات السرطانية الثلاثة E5 و E6 و E7 التي تتوسط عملية تضاعف واستنساخ المادة الوراثية للفايروس، فضلاً عن جينين من الجينات التنظيمية E1 و E2 التي تنتج بروتينات تعدل الاستنساخ و التضاعف وجينين من الجينات التي تنتج البروتينات التركيبية L1 و L2 الذي يكون الغطاء البروتيني للفايروس (de Villiers et al ., 2004) .

الجينوم الفيروسي يمكن تقسيمه إلى ثلاث مناطق أولاً : منطقة بداية التنظيم Upstream regulatory region (URR) وتعرف أيضاً بمنطقة Long control region (LCR) وهي مسؤولة بشكل كبير عن تحديد مدى المضيف وتحديد الأنسجة التي ترتبط بها لكل نوع من HPV

فضلاً عن تنظيم التعبير الجيني للفيروس بعد الإصابة . هذه المنطقة تحتوي أيضاً على منطقة أصل التضاعف للفايروس *Viral origin of replication* وأربعة مواقع رابطة لبروتين E2 الفيروسي والعديد من مواقع الارتباط لعوامل الاستساخ الخلوية , أما بقية الجينوم فهو يشمل على ثمانية من أطر القراءة المفتوحة (ORF) *Open reading frames* بين المنطقة المبكرة *Early region* التي تشفر لبروتينات E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 والمنطقة المتأخرة *Late region* التي تشفر بروتينات L1 و L2 ، المناطق الثلاث للجينوم بالبداية تكون منطقة بداية التنظيم غير المشفرة *Non-coding Upstream region* . هذه المنطقة تحتوي على *Promoter* مع تسلسلات محفزة ومثبطة التي تنظم تضاعف DNA من خلال السيطرة على استساخ المنطقة المبكرة والمتأخرة (Early - Late) كما تحتوي منطقة URR أيضاً على أعلى درجات التغير في الجينوم الفيروسي. ثانياً : المنطقة المبكرة *Early region* وتتضمن جينات E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 هذه المنطقة مرتبطة مع التضاعف الفيروسي وتوليد حالة التكوين السرطاني *Oncogenesis* . إن التعبير الجيني لمنتجات الجينات المبكرة تحدد ما إذا كانت الإصابة بفايروس الحليمات البشرية فعالة ( نشطة ) أم في حالة سكون أو تؤدي إلى تحول خبيث .

ثالثاً : المنطقة المتأخرة *Late region* التي تشفر البروتينات التركيبية L1 و L2 من أجل بناء الغطاء البروتيني للفايروس *Viral capsid* (Gomez and Santos, 2007) . إن عزلات فايروس الحليمات البشرية توصف بشكل "أنواع" *Species* التي تصيب معظم الثدييات وموجودة في كل مكان وبتوزيع عالمي (de Villiers *et al.*, 2004), إذ يوجد نحو 200 نوع من فايروس الحليمات البشرية وصفت اعتماداً على صفات الجينوم الكلي. إن فايروس الحليمات البشرية واحد من أكثر المسببات الشائعة للأمراض المتنقلة عبر الجنس سواء عند الرجال أو النساء في العالم ،ولهذا هو أكثر الأمراض الفايروسية الشائعة المتنقلة جنسياً والمنتشر في كل أنحاء العالم .

تم تمييز أنواع HPV على أساس بيانات تسلسل DNA التي أظهرت اختلافات جينومية بينها (Burd, 2003) . كما إنها لا تصنف إلى نمط مصلي (Serotype) بل إلى نمط جيني (Genotype) اعتماداً على تسلسل DNA (Stanley, 2012).

الأنواع التناسلية التابعة ل HPV تقسم إلى أنواع عالية الخطورة وقليلة الخطورة تبعاً لقابلية الفايروس الكامنة في إحداث الحالات السرطانية (Gómez and Santos, 2007). إن المجموعة القليلة الخطورة تشمل الأنواع الأتية 6 و 11 و 42 و 43 و 44 والمجموعة العالية الخطورة تشمل الأنواع الأتية 34 و 39 و 51 و 52 و 56 و 58 و 59 و 66 و 68 و 70 (Burd, 2003). إن فايروس الحليمات البشرية مرتبط مع حالات سريرية متنوعة مداها يتراوح بين آفات غير ضارة إلى حالات سرطانية خطيرة. معظم إصابات HPV هي حميدة التي تصيب النسيج الطلائي الجلدي والتي تسبب تأليل

أخمصية Plantar warts و ثآليل عامة Commen warts و ثآليل مسطحة Flat warts (Gómez and Santos, 2007). الثآليل الجلدية skin warts تنقل بصورة مباشرة عبر التلامس البشري مع نسيج مصاب بالفيروس أو ينتقل بصورة غير مباشرة عبر التلامس مع مواد ملوثة بالفيروس بصورة عامة هذه الإصابة تشفى بصورة تلقائية في أثناء 1-5 سنوات. من الآفات التي تسببها فيروسات الحليمات البشرية هي Epidermo dysplasia verruciforms وهو مرض وراثي نادر مع الإصابة بفيروس HPV حيث يسبب ثآليل على الساق والأطراف العليا، ويمكن أن تتطور إلى حالات سرطانية. أما التي تصيب الجهاز التنفسي Recurrent respiratory papillomatosis فتصيب في البداية الحنجرة عند الأطفال ويمكن أن تحدث الإصابة في البالغين (Stanley , 2012). أما الأنواع التناسلية فتصيب بصورة أولية عنق الرحم والمهبل والقضيب والشرج. وتعد الأنواع السرطانية عالية الخطورة هي تلك التي تسبب سرطان عنق الرحم Cervical cancer، إذ أخذت اهتمام كل المراكز البحثية في العالم ولاسيما الأنواع 16 و 18 و 31 و 45 التي تمثل أكثر من 90 % من مسببات سرطان عنق الرحم، ومن هذه الأنواع نوع 16 هو الأكثر تسببا للإصابة، إذ يسبب معظم حالات سرطان العنق في الولايات المتحدة وأوروبا . فضلاً عن أن هذه المجموعة العالية الخطورة لها علاقة بسرطانات تناسلية أخرى . مثل سرطان المهبل والقضيب والمخرج (de Villiers *et al.*,2007; Gómez and Santos, 2004 ;Schiffman *et al.* , 2009 )

## 2-2-1 دورة حياة HPV

إن دورة حياة HPV تبدأ بإصابة الخلايا الطلائية (الخلايا الكيراتينية keratinocytes)، تحدث الإصابة بفيروس الحليمات البشرية بإصابة الطبقة الطلائية المتعددة الطبقات Stratified epithelium من خلال الجروح أو الخدوش التي قد تحصل فيها، إذ يدخل الفيروس إلى الطبقة القاعدية. وهنا يجب توافر المستقبلات التي تسمح لجزيئات الفيروسات بالارتباط بالخلية. بعد ذلك يبدأ تضاعف الفيروس بمراحل متعددة في طبقات الجلد المختلفة تنتهي بتكوين فيروسات جديدة وقبل التحرر فإن الخلية المصابة تصبح بارزة مظهرها في هذه المرحلة مع نواة كبيرة وغالباً أنوية متعددة في كل خلية (Abdul hamid *et al.* , 2009).

## 2-3 تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction

يعد تفاعل البلمرة المتسلسل تقانة علمية جزيئية تستخدم لتضخيم نسخة مفردة أو عدد قليل من النسخ لقطعة من DNA عبر العديد من الخطوات المتسلسلة تنتهي بتوليد الآف إلى ملايين النسخ من DNA (Joshi and Deshpande , 2010). تم تطوير هذه التقانة إلى تقانة أخرى أكثر حساسية ودقة وأقل عرضة للتلوث وهي تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل الآني Real - Time PCR والتي تعطي قياساً حجمياً للمادة الوراثية تحت الفحص وبطريقة مشابهة لتلك التي تعرض بيانات Microarray (Schmittgen *et al.*, 2007). هذه التطورات الحديثة في الطرائق الجزيئية أحدث ثورة في التقدم في إكتشاف الكائنات المجهرية Microorganism في مدى واسع من حقول التشخيص الطبي الذي يشمل علم الفايروسات والفطريات و الطفيليات والبكتريا (Valones *et al.*, 2009). حيث ان هذه التقنية تحدث بثلاث خطوات رئيسية ففي البداية يحدث مسح لشريط ال DNA برفع درجة الحرارة وتكسير الاواصر الهيدروجينية وبذلك يتحول من من شريط مزدوج dsDNA الى شريط مفرد ssDNA ثم تبدأ المرحلة الثانية وهي ربط البادئات وتحدث عند خفض درجة الحرارة والسماح بربط البادئات مع النكليوتيدات وتكوين الاواصر الهيدروجينية اما اخر مرحلة فهي الاستطالة حيث يتم تحفيز انزيم polymerase لبناء سلسلة مكملة لسلسلة القالب . وإن الاستخدامات (التطبيقات) الأنموذجية لل Real- Time PCR تشمل تحديد الكائن المسبب للمرض وتحليل التعبير الجيني وتحليل انحراف الكروموسوم و تحديد البروتينات في PCR المناعي Real-Time immune-PCR (Kubista *et al.* , 2006)، فضلاً عن أن هذه الطريقة مفيدة وناجحة في تحديد مدى واسع من تسلسلات الأحماض النووية للفيروسات أكثر من معظم الطرائق الكمية Quantitative methods وعلاوة على ذلك يمكن إجراء تحديد نوعي Qualitative والذي يتم بصورة اوتوماتيكية (Valones *et al.*, 2009).

إن تقانة Real-Time PCR مفيدة للغاية في دراسة الفيروسات المسببة للأمراض ، أغلب التحليلات المنشورة أظهرت زيادة في استخدامها لتحديد الفايروسات المختلفة وبناء عليه تعد تقانة جذابة للعديد من المجالات الفيروسية، وأنها تقانة قيمة بسبب سرعتها في تحديد الكشف عن الفايروسات المتنوعة والمتلازمات التي تسببها تلك الفايروسات. هذه الطريقة تسهم في دراسات علم الأوبئة بسبب قابليتها على تحديد مقدار الأحماض النووية في التفاعل المفرد وسمحت بتمييز أفضل للعديد من الأنماط الجينية الفيروسية في تفاعل واحد مفرد ووفرت طريقة بديلة لتحديد الفايروسات اعتماداً على تحليل معدل الاصابات المرضية ومعدل الوفيات . إن تقانة PCR سهلت وحسنت تحديد عدد كبير من الفايروسات ولاسيما تشخيص الفايروسات كان معتمداً سابقاً على زراعة الأنسجة وإصابتها بالفايروسات ،ثم دراسة

تأثيرها مما يستوجب استهلاك جهد ووقت وأموال كثيرة مقارنة مع هذه التقانة الحديثة التي تتحسس بدقة عالية لتضاعف المادة الوراثية من خلال استخدام المسبار المتفلور *Fluorescent probes* (Valones *et al.*, 2009) مثل استخدام صبغة SYBR Green غير المتخصصة وأنظمة المسبار المتخصصة مثل نوع Tag Man الذي يتكون من عدد قليل من النيوكليوتيدات ويتطابق مع هدفه بين البادئين *Two primers* ويؤدي عمله من خلال وميضه عندما يتحطم بفعل إنزيم التضاعف *DNA polymerase* ثم يلتقط الوميض من قبل حساس عالي الدقة ليحول الوميض إلى إشارة تدل على تضاعف المادة الوراثية دورة واحدة وهكذا كلما دارت دورة أخرى تحصل الإشارة نفسها ومن ثم يتم تحديد عدد النسخ المتضاعفة كميًا (Mortarino *et al.*, 2004).

## 2-4 المصفوفة الدقيقة *Microarray*

إن مبدأ تقانة المصفوفة الدقيقة بمساعدة الحامض النووي الرسول mRNA وصفت لأول مرة في عام 1987 باستعمال مجموعة من قطع *cDNA* المثبتة على ورقة ترشيح خاصة (Call, 2001; Kulesh *et al.*, 1987). ومنذ ذلك الوقت تطورت هذه التقانة بشكل كبير واصبحت متوافرة تجارياً في كل أنحاء العالم. وباختصار تقوم على مبدأ تثبيت الآف من القطع القصيرة (*Oligonucleotides*) من DNA أو mRNA على شريحة صغيرة (مساحة 1 ملم مربع) (Russo *et al.*, 2003). يضاف إليه مستخلص المحتوى الجيني المعلم (قيد البحث) الذي يتطابق مع الجين المناسب له ويعطي صورة عن التعبير الجيني المحدد ضمن المحتوى الجيني لكائن محدد، وهذا يزود الباحثين برؤية مهمة لمحتويات الجين الموجودة أو المختلفة داخل الحينوم المايكروبي المطلوب دراسته (Schena, 2004; Kwan *et al.*, 2008).

تم استخدام تقانة المصفوفة الدقيقة في علم الفيروسات من خلال ثلاثة محاور الأول، في تشخيص العامل المسبب للمرض الفيروسي، والثاني في تحديد النمط الجزيئي سواء كان للمريض أم للفايروس أم لأسباب تتعلق في إنتاج اللقاح، والثالث في البحوث الفيروسية، للتحقق وللكشف عن التفاعلات بين الفيروس وخلية المضيف خاصة تأثير الإصابة الفيروسية في التعبير الجيني (Clewley, 2004; Venkatasubbarao, 2004).

إن تطور هذه التقانة سهلت طرائق البحث والتحري عن الفيروسات الممرضة من العوائل الفيروسية الواسعة الانتشار في كل البيئات المختلفة سواء كان الفيروس من نوع حامض نووي DNA أو نوع RNA (Li *et al.*, 2015) إذ يتم استعمال بادئ عشوائي *Randomized primer* لتضخيم أي RNA فيروسي موجود في العينة باستعمال *Reverse-transcriptase PCR* متبوعاً بالتهجين على

Microarray (Uttamchandani *et al.*, 2009 ; Fey , 2011). فضلاً عن ذلك فإن استخدام هذه التقنية في تحديد صيغ أو أنماط التعبير الجيني باستعمال cDNA microarray تعد طريقة غاية في الأهمية في التحليل الجزيئي للخلايا والأنسجة (Macgregor and Squire, 2002) وتم استخدامها من خلال مقارنة مستويات التعبير الجيني لعشرات والآلاف الجينات بوقت واحد . (Tanaka, 2000; Tang *et al* , 2005). ومع تقدم البحث العلمي تم حديثاً التوصل إلى تقنية تتضمن دمج كل من التقنيتين أعلاه وهما دمج تقنية المصفوفة الدقيقة Microarray مع تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المعكوس الآني Real –Time reverse PCR والحصول على تقنية جديدة هي مصفوفة تفاعل البلمرة المتسلسل المعكوس الآني Real Time Reverse PCR Array ، إذ يتم استخدام الانزيم الناسخ العكسي الذي ينسخ المئات من جزيئات RNA إلى DNA ، ثم يحصل تضاعف ثم تحديد للتعبير الجيني لمجموعة محددة من الجينات مثل الجينات المناعية الالتهابية أو جينات تكوين أوعية دموية Angiogenesis أو مجموعة جينات انتحار الخلايا المصابة Apoptotic genes وغيرها.

تعد هذه التقنية من أكثر التقانات حساسية وهي موثوقة النتائج لتحليل التعبير الجيني (AL Ghazal,2010) . إذ إن لها مدى داينميكياً واسعاً يجعل RT-PCR Array الاختيار الأفضل لتحديد نمط التعبير الجيني للعديد من الجينات بوقت واحد مع دقة عالية بسبب وجود جينات السيطرة الداخلية Internal control gene التي تستخدم للمعايرة Normalization مع جينات العينة فضلاً عن استخدام التحليل للجينات المرتبطة بالحالات الممرضة أو المسار الحيوي (Campeau *et al.*, 2009 ; Myskiw *et al.*, 2009 ; Chittur *et al.*, 2009 ) .

## 5-2 علم التنبؤ الجيني Gene Ontology

علم التنبؤ الجيني (GO) Gene Ontology هو جهد تعاوني يوفر تكوين تنبؤ كامل لتوضيح الوظائف الجزيئية والدور البيولوجي والموقع الخلوي لمنتجات الجين بشكل نظامي عالي التقنية وبأسلوب نوعي يهدف إلى توحيد صورة وظيفة الجين عبر مختلف الكائنات (Bourne, 2009). التنبؤ الجيني يوفر تصنيفاً لمنتجات الجين بشكل وظائف جزئية، معالجات بايولوجية ومكونات خلوية وبناءً عليه يمكن أن يقال إنه مفيد بشكل متخصص للحصول على خلاصة المعلومات مثل نسبة الجينات المنسوخة داخل كل خلية، ويوفر أيضاً ميكانيكية سريعة للباحثين من أجل تصنيف الجينات التي غالباً يصعب إعطاؤها اسماً عددياً خلال توضيح الجينوم (Baehrecke *et al* ., 2004). فضلاً عن ذلك فإن له فوائد أخرى مهمة مثل زيادة توضيح التشابه والاختلاف عبر قواعد بيانات الجينوم ويوفر

معلومات مهمة للبنية الهيكلية لكل المحتوى البيولوجي، كما يستخدم أيضا لتوضيح الوظائف الخلوية المختلفة (Bourne, 2009).

## 6-2 الساييتوكينات Cytokines

إن الساييتوكينات هي نواقل صغيرة الوزن الجزيئي تفرز عن طريق خلية واحدة لتحول سلوكها أو سلوك خلية أخرى إلى حالة نشطة أو خاملة ووفق متطلبات الخلية التي تعبر عنها بشكل إشارة منفردة متسلسلة تمتد من الجين عبر النواة إلى البروتين في الساييتوبلازم (Mariani and Venuti, 2010). الساييتوكينات ترسل إشارات داخل الخلية خلال الارتباط بمستقبلات سطح الخلية المتخصصة و على الرغم من أن معظمها قابل للذوبان إلا أن بعضها ممكن أن يرتبط بالغشاء ، الساييتوكينات تنتج من قبل كل الخلايا وتملك وظائف واسعة التنوع (Stanley, 2006). التأثير الحيوي يعتمد على الساييتوكينات والخلية التي تتضمنها لكن بشكل أنموذجي هذه الجزيئات تؤثر في نشاط انقسام الخلية ، موت الخلية المبرمج Apoptosis أو الحركة ، فضلاً عن تحفيز الخلية لإفراز الانزيمات داخلياً وخارجياً.

الساييتوكينات من نوع الانترلوكينات Interleukins تنتج من قبل خلايا الدم البيض ولها تأثير بشكل كبير في بقية خلايا الدم البيض. أما الأنواع التي تمتاز بالقدرة على الجذب الكيميائي فتسمى بالكيموكينات Chemokines التي تنقل إلى المناطق الالتهابية وتقوم بحث الخلايا المناعية على العمل ضد المايكروبات أو الفايروسات الغازية (Stanley, 2009). كما يوجد نوع آخر يدعى تحفيز تكوين التجمعات الخلوية Colony-stimulating-factors والتي تقوم بتحفيز تمايز وتكاثر الخلايا الجذعية Stem cell, أما الانترفيرونات Interferons فهي نوع من الساييتوكينات التي تتداخل مع عملية تضاعف الفيروسات الغازية للخلايا وتثبط تضاعفها ولها دور في القضاء على الخلايا السرطانية أيضاً (Parkin and Cohen, 2001)، ومن الأنواع الأخرى للساييتوكينات عوامل النمو Growth factors التي تحفز نمو الخلايا المناعية كلها وتنشطها (Kelly, 2007). تتوسط الساييتوكينات عمليات التصدي لجميع أنواع الالتهابات، فهي تشترك في الالتهابات الحادة والمزمنة في شبكة معقدة من التفاعلات و أظهرت العديد من الساييتوكينات بعض الزيادة في الفعالية الوظيفية من خلال مشاركتها في التفاعلات المناعية الالتهابية ضد الإصابات المختلفة (Parkin and Cohen, 2001)، لذا فإن فهم المسار المنظم من قبل الساييتوكينات يسهم في تطوير عملية فهم المناعة الالتهابية تجاه الفايروسات ، وهذا يسهل من عملية معالجة الإصابة بالأمراض المعدية أو أمراض المناعة الذاتية (Feghali and Wright, 1997).

الفصل الثالث

# مواد العمل وطرائقه

**Materials and Methods**

## 3 - مواد العمل وطرائقه

## 1-3 جمع عينات الجينات المناعية Gene-Data Collection

تم جمع ثلاث مجاميع من الجينات المناعية الالتهابية 90 جيناً كما موضح في جدول 1 في الملحق 1 التي تغير تعبيرها الجيني (بالزيادة أو النقصان) بعد إصابة الإنسان بفيروس الحليمات البشرية خاصة الأنواع السرطانية 16 و 18 و 31 و 45 في الدراسات السابقة المختلفة (AL-Ghazal , 2012; Santegoets *et al.* , 2008 ; Karim *et al.* , 2011; Guess and McCance. , 2005; Pei *et al.* , 1998 ; Ornellas *et al.* , 2012 ; Yim and Park. , 2005 ; Cao *et al.* , 2008 ; Garcia-Piñeres *et al.* , 2009 ; Martinez. , 2007 ; Wang *et al.* , 2010 ; Sperling *et al.* , 2012; Bonagura *et al.* , 2010 ; Trimble *et al.* , 2010; DeVoti *et al.* , 2008 ; Hatam *et al.* , 2012 ; Kindt *et al.* , 2012 ; Santin *et al.* , 2005; Bermúdez-Morales *et al.* , 2011; Poveda *et al.* , 2012; Shiau *et al.* , 2013; Chuang *et al.* , 2012; Baumgarth *et al.* , 2004 ; Aubin *et al.* , 2011; Poelgeest. , 2007 ; Chang *et al.* , 2010; Karim *et al.* , 2011; Bauknecht and Shi. ,1998; Kukimoto *et al.* , 2006 ; Gius *et al.* , 2007; Fernandesa *et al.* , 2005 ; Pinto *et al.* , 2003; Lee *et al.* , 2009 ; Yang *et al.* , 2004 ; Kadish *et al.* , 1997 ; Olea *et al.* , 2011; Bais *et al.* , 2005 ; Kemp *et al.*, 2010; Baker *et al.*, 2011; Wang,1996; Chang, 2000; Alazawi *et al.* , 2002; Kanodia *et al.* , 2007 ; Castrilli *et al.* , 1997 ; Tirone *et al.*, 2009; Molina *et al.* , 2013 ; Scott *et al.* ,1999; Marks *et al.*, 2010; Gravitt *et al.* , 2003; Morales *et al.* , 2008; Santin *et al.* , 2000; Sharma *et al.* , 2007; Azar *et al.* , 2004;Tjong *et al.* ,1999; Misson *et al.*, 2011; Rosenthal *et al.*, 2004)

بعد ذلك تم اعتماد الجينات المناعية التي تغيرت بثلاثة مكررات وبأضعاف مختلفة وعُدَّت هذه الجينات قيد التجربة، تم تصنيف الجينات المتأثرة على وفق التغير الحاصل في التعبير الجيني كما موضح في جدول 3-1. والجينات إما زاد تعبيرها الجيني أو نقص، فالجينات التي تضاعف تعبيرها الجيني ( زاد تعبيرها الجيني وتضاعف Up regulated genes) بمقدار أكبر من الضعف (More than one fold) مقارنة مع جينات السيطرة ، في حين الجينات التي نقص تعبيرها الجيني (Down regulated genes) بأقل من ضعف واحد (Less than one fold) مقارنة مع جينات

السيطرة. أما جينات السيطرة فقد أخذت من الجداول القياسية للدراسات السابقة ومقدار تضاعفها التعبيري تضاعف واحد فقط (One fold) كما موضح في جدول 2 في الملحق 1.

جدول 3-1: العينات الجينية المناعية ومكرراتها ونوع التغير الحاصل في تعبيرها الجيني بعد الإصابة بفيروس الحليمات البشرية.

مكررات المجاميع الجينية المناعية المتأثرة بالإصابة			الجينات المناعية الزائدة في تعبيرها الجيني		
المجموعة الثالثة	المجموعة الثانية	المجموعة الأولى	الرمز	الموقع	التسلسل
3.0	2.5	2.0	<i>BCL6</i>	A02	1
2.4	2.07	2.0	<i>CCL17</i>	A11	2
2.0	1.5	1.8	<i>CCL18</i>	A12	3
2.0	1.9	1.8	<i>CCL19</i>	B01	4
4.3	3.1	2	<i>CCL2</i>	B02	5
3.6	2.4	2.0	<i>CCL20</i>	B03	6
9.8	5.9	2.0	<i>CCL21</i>	B04	7
5.8	9.3	2.3	<i>CCL7</i>	B12	8
2.0	2.1	2.0	<i>CCR7</i>	C08	9
4.8	2.4	2.0	<i>CEBPB</i>	C11	10
12.1	7.9	3.7	<i>CXCL1</i>	D02	11
3.5	3.1	2.3	<i>CXCL11</i>	D04	12
2.6	2.0	1.9	<i>CXCL9</i>	D12	13
8.9	4.8	2.0	<i>IFNA2</i>	E02	14
6.0	4.6	2.0	<i>IL-10</i>	E03	15
24	13.0	2.0	<i>IL10RA</i>	E04	16
2.1	2.0	1.6	<i>IL17C</i>	E08	17
5.8	2.1	2.0	<i>IL-1A</i>	E09	18
3.6	2.0	1.5	<i>IL-1B</i>	E10	19
11.0	6.9	2.0	<i>IL36G</i>	F04	20
11.6	6.6	1.61	<i>IL1RN</i>	F06	21
2.1	2.5	2.0	<i>IL-8</i>	F10	22
24.4	13.00	3.4	<i>MIF</i>	G06	23
2.5	2.0	1.8	<i>TNF</i>	G09	24
4.5	3.3	2.8	<i>TOLLIP</i>	G10	25
الجينات المناعية المنخفضة في تعبيرها الجيني					
-2.8	-2.4	-2	<i>C3</i>	A03	1
-2.3	-1.6	-1	<i>CCL1</i>	A06	2
-4	-3	-2	<i>CCL3</i>	B09	3
-3.6	-2.4	-2.0	<i>CCL5</i>	B11	4
-3.6	-2.8	-2.0	<i>CXCL12</i>	D05	5
-5.1	-3.2	-2.0	<i>IL1R1</i>	F05	6

### 2-3 حساب التغيير في التضاعف الجيني

باستخدام الجداول القياسية لقيم التضاعف في التعبير الجيني كما موضح في جدول 2 في الملحق 1, تم تحويل قيم التغيير في التعبير الجيني (Fold change) سواء كانت زيادة أو نقصان إلى قيم التضاعف الحرج (Ct) Threshold values وهي القيمة التي عندها تحصل عملية تضاعف الحامض النووي DNA في التقانة المستخدمة في التحليل الجيني وهي Real Time PCR-Array كما موضح في جدول 2-3.

جدول 2-3: قيم التعبير الجيني المحسوبة وفق التغيير الحاصل بالتعبير الجيني (Fold change).

الجينات المناعية التي حصل فيها زيادة في التعبير الجيني (up regulated genes) مقارنة مع السيطرة											
ت	موقع الجين	رمز الجين	Fold 1	Ct Control	Ct Acute	Fold 2	Ct Control	Ct Acute	Fold 3	Ct Control	Ct Acute
1	A02	<i>BCL6</i>	2.0	30.5	27.8	2.5	27.7	21.8	3.0	24.6	29.1
2	A11	<i>CCL17</i>	2.0	30.5	27.8	2.07	30.5	27.8	2.4	32.7	29.7
3	A12	<i>CCL18</i>	1.8	31.2	28.6	1.5	31.2	28.9	2.0	30.5	27.8
4	B01	<i>CCL19</i>	1.8	31.2	28.6	1.9	27.4	21.9	2.0	30.5	27.8
5	B02	<i>CCL2</i>	2	30.5	27.8	3.1	25.0	19.8	4.3	24.3	29.3
6	B03	<i>CCL20</i>	2.0	30.5	27.8	2.4	32.7	29.7	3.6	29.1	32.4
7	B04	<i>CCL21</i>	2.0	30.5	27.8	5.9	33.2	29.0	9.8	24.4	31.0
8	B12	<i>CCL7</i>	2.3	27.7	23.6	9.3	24.1	30.4	5.8	29.1	33.3
9	C08	<i>CCR7</i>	2.0	30.5	27.8	2.1	28.8	24.4	2.0	30.5	27.8
10	C11	<i>CEBPB</i>	2.0	30.5	27.8	2.4	32.7	29.7	4.8	23.4	28.9
11	D02	<i>CXCL1</i>	3.7	31.5	27.9	7.9	28.0	21.5	12.1	22.0	27.0
12	D04	<i>CXCL11</i>	2.3	27.5	23.6	3.1	25.0	19.9	3.5	32.7	29.2
13	D12	<i>CXCL9</i>	1.9	27.4	21.9	2.0	30.5	27.8	2.6	26.6	30.9
14	E02	<i>IFNA2</i>	2.0	30.5	27.8	4.8	28.9	23.4	8.9	23.2	27.6
15	E03	<i>IL-10</i>	2.0	30.5	27.8	4.6	27	21.3	6.0	23.7	29.6
16	E04	<i>IL10RA</i>	2.0	30.5	27.8	13.0	33.6	28.2	24	24.0	29.0
17	E08	<i>IL17C</i>	1.6	29.6	24.3	2.0	30.5	27.8	2.1	24.4	28.8
18	E09	<i>IL-1A</i>	2.0	30.5	27.8	2.1	28.8	24.0	5.8	29.1	33.3
19	E10	<i>IL-1B</i>	1.5	31.2	28.9	2.0	30.5	27.8	3.6	29.1	32.4
20	F04	<i>IL36G</i>	2.0	30.5	27.8	6.9	31.3	25.7	11.0	25.0	31.3
21	F06	<i>IL1RN</i>	1.6	29.6	24.3	6.6	31.3	25.7	11.6	20.6	27.7
22	F10	<i>IL-8</i>	2.0	30.5	27.8	2.5	27.7	21.8	2.1	24.4	28.8
23	G06	<i>MIF</i>	3.4	28.2	32.7	13.0	33.6	28.2	24.4	24.5	29.3
24	G09	<i>TNF</i>	1.8	31.2	28.6	2.0	30.5	27.8	2.5	21.8	27.7
25	G10	<i>TOLLIP</i>	2.8	24.6	21.7	3.3	23.3	26.4	4.5	24.2	29.2
الجينات المناعية التي حصل فيها نقصان في التعبير الجيني (Down regulated genes) مقارنة مع السيطرة											
1	A03	<i>C3</i>	-2	28.7	32.6	-2.4	30.0	29.8	-2.8	29.8	30.0
2	A06	<i>CCL1</i>	-1	22.5	24.9	-1.6	26.1	25.6	2.3	31.2	31.7
3	B09	<i>CCL3</i>	-2	27.8	31.6	-3	26.0	24.7	-4	24.7	26.0

26.3	23.6	-3.6	31.0	31.4	-2.4	31.6	28.6	-2.0	CCL5	B11	4
26.3	23.6	-3.6	29.8	30.0	-2.8	29.6	25.7	-2.0	CXCL12	D05	5
27.1	26.1	-5.1	24.4	31.0	-3.2	26.6	23.7	-2.0	IL1R1	F05	6

بعد ذلك تم إدخال قيم Ct إلى موقع التحليل الجيني :-

SABioscience-RT-PCR-Array using a Blank Excel Spread-sheet,  
SABioscience Data Analysis Template Excel File .

(Campeau *et al.*, 2009; Myskiw *et al.*, 2009) . تم الحصول على قيم التعبير الجيني الجديدة وعلى وفق مقارنتها مع جينات السيطرة الثابتة في جميع التحليلات الجينية كما موضحة في الجدول (2-3). وبعد التحليلات الجينية تم الحصول على قيم التعبير الجيني لكل جين محدد بشكل قيمة التضاعف أكبر من ضعف واحد أو أقل من ضعف واحد مقارنة مع جينات السيطرة. وتم توضيح قيم التغير في التعبير الجيني إلى منحنيات وهستوكرامات والخريطة الخاصة بالجينات المرتفعة أو المنخفضة في تعبيرها الجيني وتحديد مواقع الجينات (ذات التعبير الجيني العالي والمنخفض) على المسارات المناعية الرئيسية في الإنسان.

### 3-3 تحليل البيانات الجينية $\Delta\Delta C_t$ Method Data Analysis:

طبقا لتقانة Real time PCR Array تم حساب مقدار التغير في التعبير الجيني  $\Delta C_t$  لكل جين قيد الدراسة من خلال مقارنته مع الجينات ثابتة التعبير الجيني بالإنسان Housekeeping genes (HKG) وهي خمسة جينات تشمل كل من: Beta-2-microglobulin , Ribosomal protein L13 Alpha, Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and Actin- Beta. ( Kreth, *et al* 2010. )

ان التغير في التعبير الجيني لكل جين تحت الدراسة تم تقييمه (Normalized) تبعاً للجينات الثابتة ومن خلال المعادلة التالية

$\Delta C_t = C_t^{GOI} - C_t^{AVG\ HKG}$  حيث يمثل الحد  $C_t^{GOI}$  مقدار التغير في التعبير الجيني للجينات تحت التجربة ( Genes of interest GOI ) بينما الحد الآخر  $C_t^{AVG\ HKG}$  معدل التعبير الجيني

للجينات الثابتة التعبير ( Average of Housekeeping genes )

بعد ذلك تم حساب مقدار التغير في تعبير التعبير الجيني لكل جين باستخدام المعادلة التالية:

الجيني للجينات تحت الدراسة مقارنة مع التغيير في التعبير الجيني لجينات السيطرة.  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Acute group}) - \Delta Ct (\text{Control group})$  والتي تمثل مقدار التغير في التعبير

### 3-4 الجينات المستخدمة في تقانة RT-PCR-Array

الجينات المستخدمة في التحليلات الجينية شملت 90 جيناً مناعياً في الإنسان وهي موضحة في جدول 1 في الملحق 1 والتي تقسم على المجاميع الآتية:

#### 1-جينات السايوكينات Cytokines genes:

وتشمل كل من *CD40LG (TNF-SF5), IFNA2, IL10, IL13, IL17C, IL1A, IL1B, IL1F10, IL36RN, IL36A, IL37, IL36B, IL36G, IL22, IL5, IL9, LTA, LTB, MIF, AIMP1, SPP1, TNF*.

#### 2-جينات مستقبلات السايوكينات Cytokine receptors genes:

وتشمل كل من *IFNA2, IL10RA, IL10RB, IL13, IL13RA1, IL5RA, IL9, IL9R*.

#### 3-جينات الكيموكينات Chemokines genes:

وتشمل كل من *C5, CCL1 (1-309), CCL11 (eotaxin), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (mcp-1), CCL20 (MIP-3 α), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2 / eotaxin-2), CCL25 (TECK), CCL26, CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CXCL1, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC / IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, IL8*.

#### 4-جينات مستقبلات الكيموكينات Chemokines receptors genes:

*CCL13 (mcp-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, IL8RA, XCR1 (CXCR1)*.

#### 5-جينات الاستجابة الالتهابية Inflammatory response genes:

وتشمل كل من *ABCF1, BCL6, C3, C4A, CEBPB, CRP, CARD18, IL1R1, IL1RN, IL8RB, LTB4R, TOLLIP*.

### 3-5 التنبؤ الجيني Gene Ontology

اعتمادا على علم التنبؤ الجيني الذي يسهم وبشكل كبير في استنتاج الكثير من المعلومات المهمة الخاصة بالتحليلات الجينية مثل تحليلات الوظائف الجينية باستخدام David Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis ومعلومات الجينات المتعلقة بالتركيب والارتباطات الجينية مع الجينات الأخرى أو الارتباطات الجينية مع نواتجها البروتينية functional annotation clustering وتحديد الخرائط للمسارات الإيضية باستخدام KEGG pathway mapping وتحليلات ربط الجينات بالأمراض Gene-disease association. وفي هذه الدراسة تم اعتماد كل من تحليلات الوظائف الجينية للتعرف على وظيفة كل جين من الجينات التي تمت دراستها لمعرفة مدى تأثير الإصابة بفيروس الحليمات البشرية في هذه الجينات. فضلاً عن اعتماد تحليلات الخرائط للمسارات الإيضية المناعية لمعرفة مكان تواجد هذه الجينات التي تغير تعبيرها الجيني (حصل لها زيادة في التعبير الجيني) بسبب الإصابة بهذا الفيروس وعند معرفة مكانها نستطيع تحديد مدى تأثيرها الامراضي في هذا المسار المناعي الالتهابي ، ومن ثمَّ تحديد مدى تأثير الإصابة في الحالة المرضية والصحية للإنسان.

### 3-6 التحليل الإحصائي

تم استخدام التحليل الإحصائي نوع :

Non parametric K-paired sample Friedman test P value (significance degree)

وبما أن كل جين له ثلاث قيم سيطرة Control وثلاث قيم قيد التجربة ، لذا تم جمع كل قيم السيطرة واختبارها تجاه كل قيم قيد التجربة لإيجاد الفروقات المعنوية بين الاثنين .

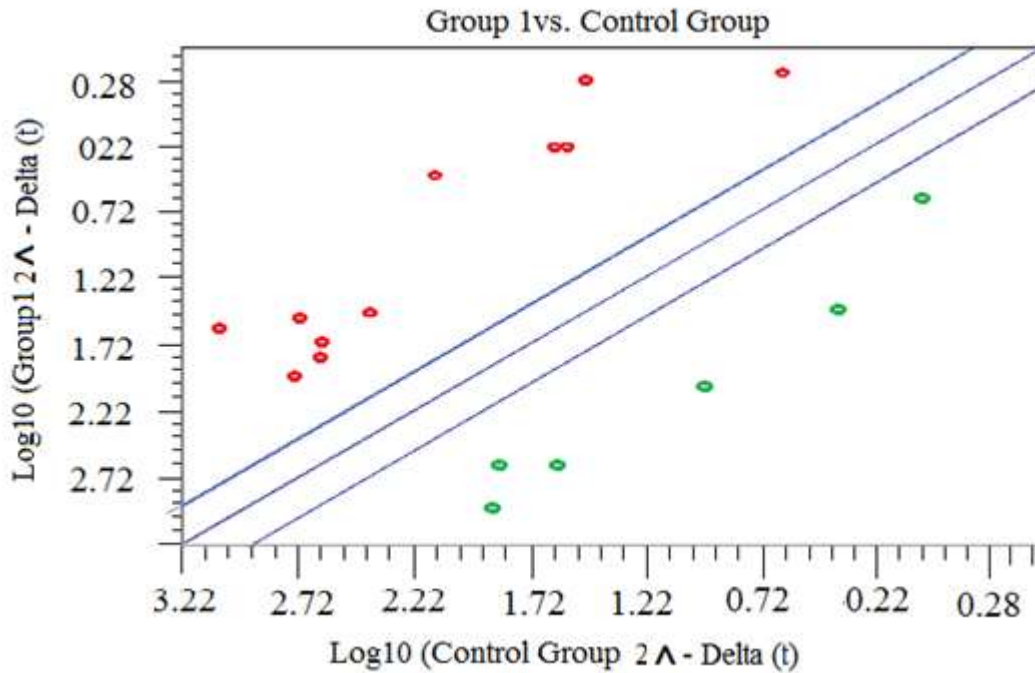
الفصل الرابع

# النتائج والمناقشة

**Results and Discussion**

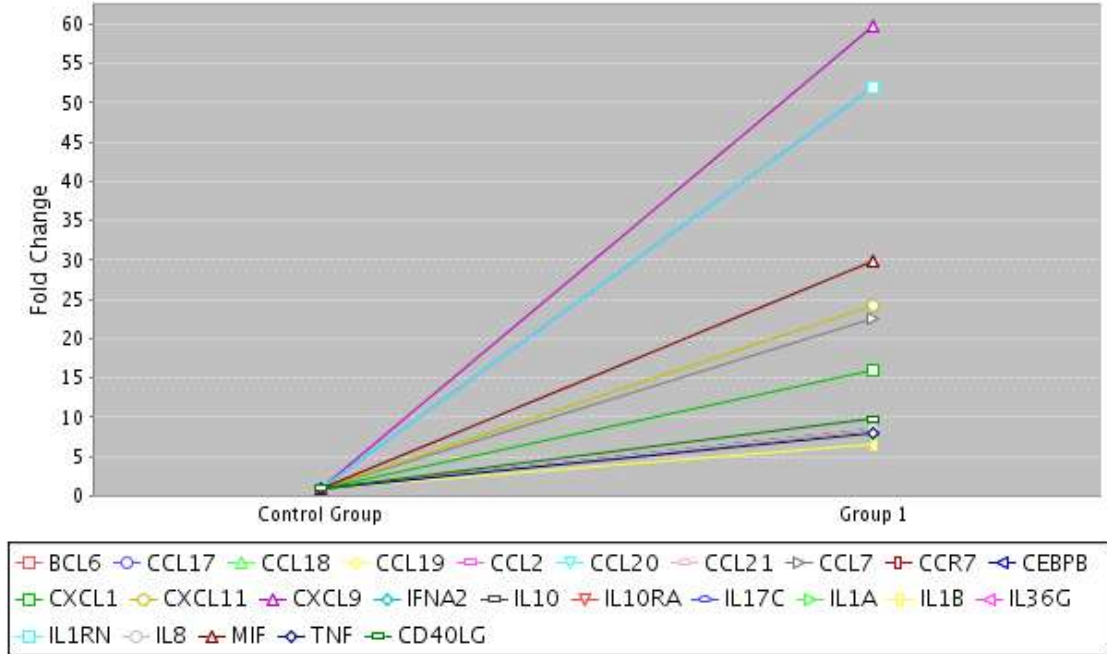
## 4 - النتائج والمناقشة.

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية عالية ( $P=0.021$ ) بين قيم Ct لجينات السيطرة وجينات التجربة في المجاميع الثلاث كلها ، كما أظهرت النتائج أن أنواع فايروسات الحليمات البشرية خاصة السرطانية منها قد أعطت تغيرات مختلفة في التعبير الجيني لـ 25 جيناً مناعياً التهابياً والمأخوذة من دراسات سابقة مختلفة. تم تصنيف هذه التغيرات إلى ثلاث مجاميع موضحة في جدول 3-1، المجموعة الأولى ضمت جينات منتشرة بشكل عشوائي بقيم مختلفة تراوحت بين 59.714 في جين *CXCL9* إلى 6.498 في الجين *IL1B* كما موضح في جدول 3 ملحق 1. يلاحظ من شكل 4-1 أن الجينات تنتشر بشكل عشوائي في المثلث العلوي ضمن مخطط الانتشار الذي يبين وبوضوح انتشار 25 من الجينات الزائدة في تعبيرها الجيني بتأثير الإصابة بـ HPV (أكبر من ضعف واحد مقارنة مع السيطرة والمؤشر بدوائر ذات لون أحمر) والانتشار العشوائي يعني وجود تباين في التعبير الجيني لكل جين عن الآخر. من ناحية أخرى يلاحظ أن ستة من الجينات حصل لها نقصان بالتعبير الجيني بتأثير الإصابة بـ HPV (أقل من ضعف واحد مقارنة مع السيطرة و المؤثرة بدوائر ذات لون أخضر) وتنتشر أيضاً بشكل عشوائي في المثلث السفلي من مخطط الانتشار الجيني. أما الخط الوسطي فيمثل الجينات المناعية التي لم يحصل فيها تغيير في التعبير الجيني (لا زيادة ولا نقصان) بعد الإصابة بفايروس HPV.



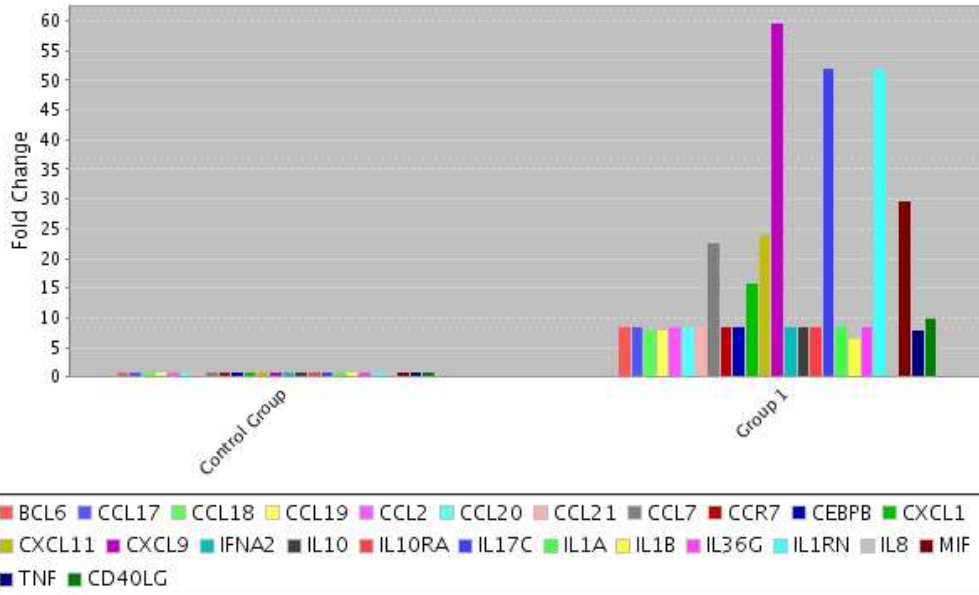
شكل 4-1: انتشار الجينات الزائدة في التعبير الجيني (دوائر حمراء) والناقصة في تعبيرها الجيني (دوائر خضراء).

يلاحظ من شكل 2-4 المنحني المتعدد Multi curve وفيه نوع الجينات التابعة للمجموعة الأولى التي حصلت فيها زيادة في التعبير الجيني بتأثير الإصابة بفيروس HPV وبشكل ترتيبي لكل جين ابتداءً من الأقل تعبيراً (6.498 أضعاف) في الجين *IL1B* إلى الأعلى في التعبير الجيني (59.714 ضعفاً) في الجين *CXCL9* جدول 3 في ملحق 1.



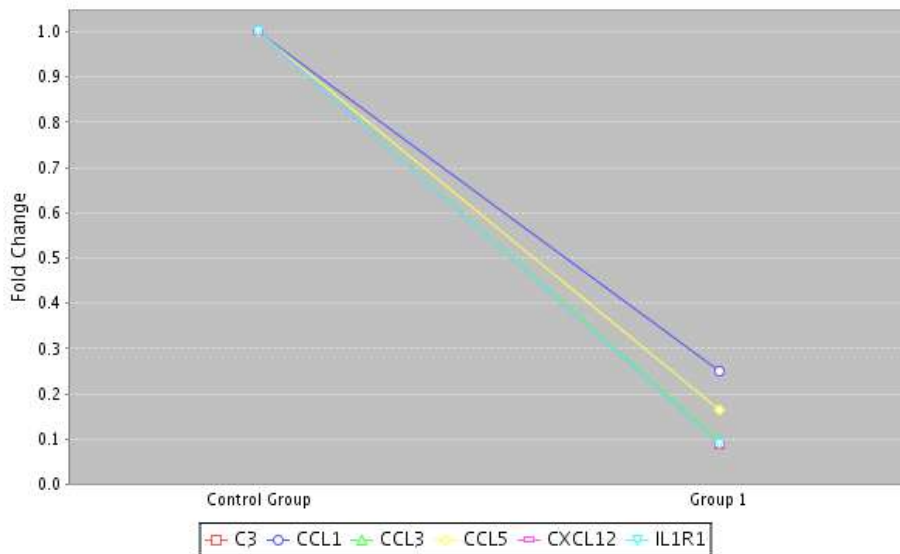
شكل 2-4: الجينات التي حصلت فيها زيادة في التعبير الجيني في المجموعة الأولى بعد الإصابة بفيروس HPV مرتبة على وفق عدد تضاعف التعبير الجيني.

أما شكل 3-4 فيظهر مخطط الهستوگرام المتعدد Multi Histogram لكل من جينات التجربة التي حصل لها زيادة في التعبير الجيني بتأثير الإصابة بـ HPV وكذلك جينات السيطرة المتساوية في التعبير الجيني (ضعف واحد لكل جينات السيطرة) والواقعة في المجموعة الأولى. ويلاحظ الفرق في التعبير الجيني لكل جين والمعبر عنه بلون يختلف عن الآخر لتسهيل المقارنة.



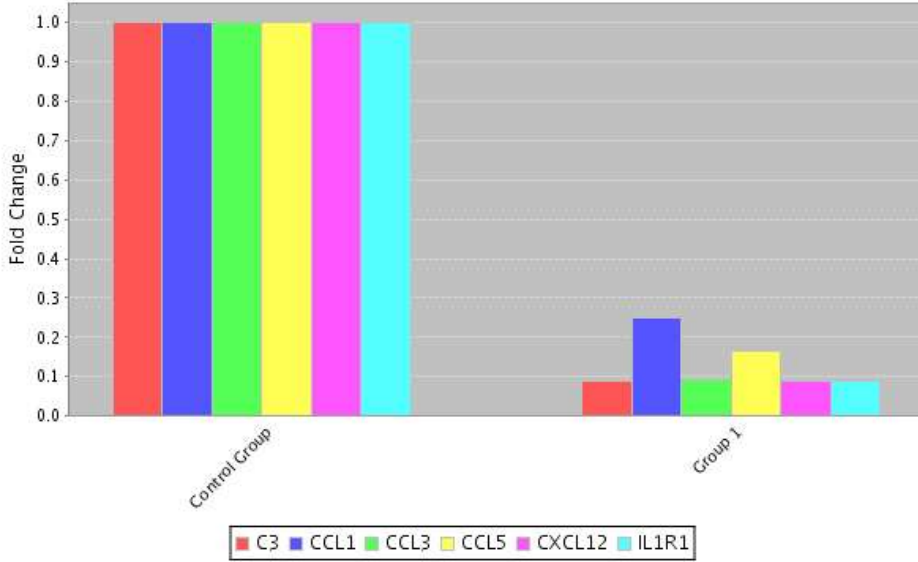
شكل 3-4: الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (أكثر من ضعف) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) والممثلة بأعمدة كل عمود بلون يمثل جيناً محدداً مع بيان اسم كل جين على وفق الأعمدة مرتبة من اليسار إلى اليمين.

يظهر شكل 4-4: مخطط المنحنيات المتعدد Multi curve للجينات التابعة للمجموعة الأولى التي عانت من نقصان في التعبير الجيني بتأثير الإصابة بفيروس HPV. إذ تظهر قيم التعبير الجيني للجينات الستة وبأقل من 1 ضعف مقارنة مع السيطرة التي قيمتها 1 ضعف لكل جين بحيث كل جين يتمثل بمنحنى خاص به وبلون مختلف عن الجينات الأخرى كما موضح في جدول 3 ملحق 1 إذ كان معدل التضاعف التفاضلي بين 0.09 في الجين *CCL3* و 0.25 في الجين *CCL1*.



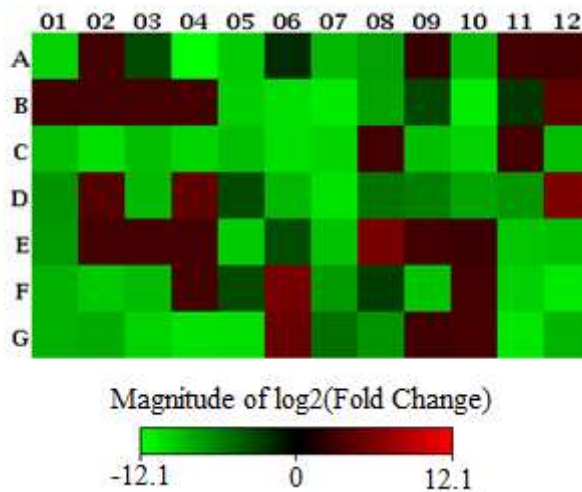
شكل 4-4: الجينات (عدد 6) التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني (أقل من ضعف) مقارنة بالسيطرة (المجموعة الأولى).

يلاحظ من شكل 4-5: مخطط الهستوگرام للجينات التابعة للمجموعة الأولى التي عانت من نقصان في تعبيرها الجيني (أقل من 1 ضعف) تحت تأثير الإصابة بفيروس HPV وكل جين مميز بعمود ذات لون خاص لتسهيل المقارنة.



شكل 4-5: الجينات التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني بأقل من ضعف واحد (المجموعة الأولى) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) ممثلة بأعمدة (كل جين بلون محدد) مع بيان اسم كل جين على وفق ترتيب الأعمدة.

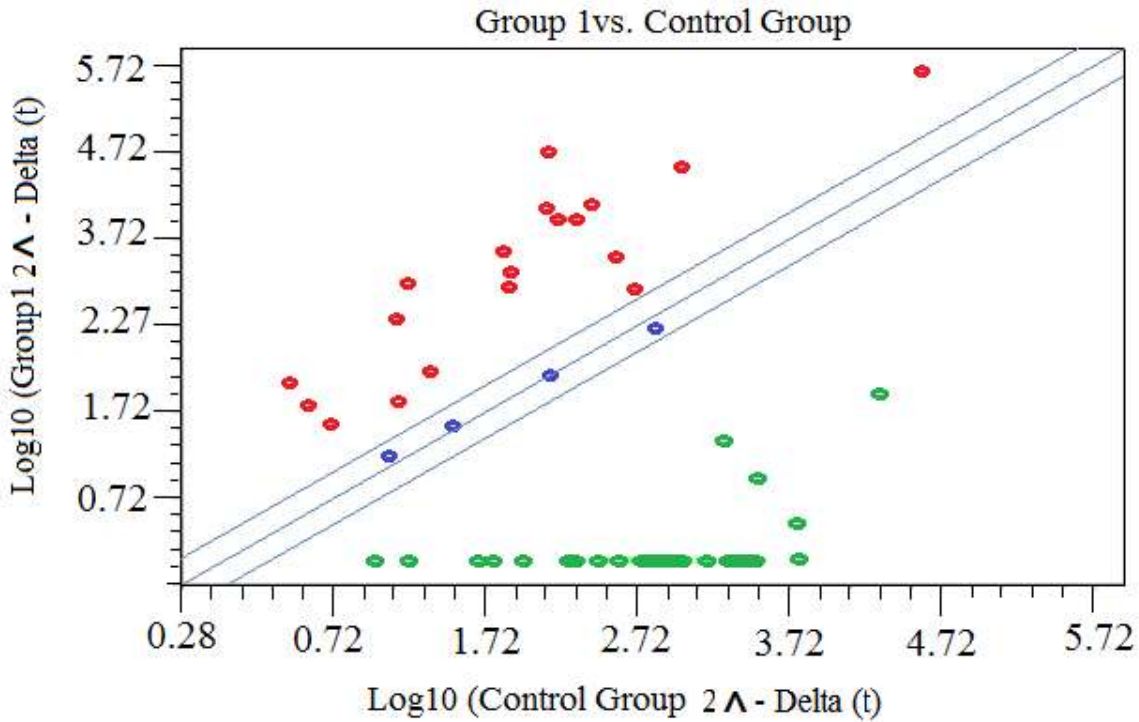
يمثل شكل 4-6 الخريطة الحرارية Heat map للجينات التابعة للمجموعة الأولى التي تأثرت بالإصابة بفيروس HPV وتوضح الصورة الكاملة لكل الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (باللون الأحمر) أو التي حصل لها نقصان (باللون الأخضر).



شكل 4-6: تظهر الخريطة الحرارية للجينات ضمن المصفوفة الخاصة بتقانة RT-PCR -Array التعبير العام لكل الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (المربع الأحمر) أو نقصان (المربع الأخضر).

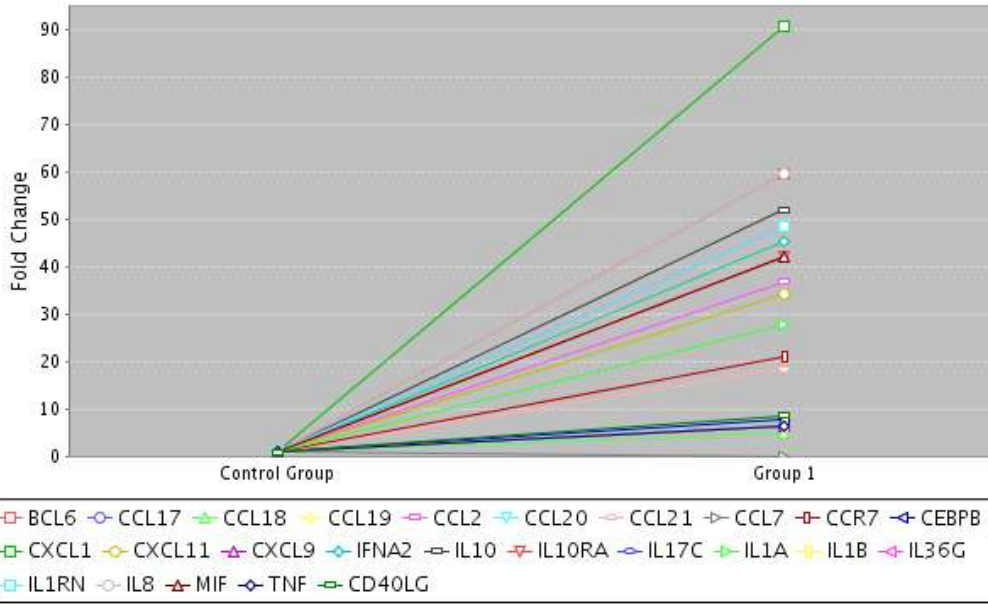
فيما يخص المجموعة الثانية من الجينات فقد أظهرت النتائج وجود تغيرات كبيرة في مستويات التعبير الجيني مقارنة مع المجموعة الأولى . حيث يلاحظ من الجدول 4 في الملحق 1 أن مدى التعبير الجيني كان بين 6.49 ضعف في الجين *CXCL9* و 90.50 ضعفاً في الجين *CXCL1*.

يلاحظ من شكل 4-7 أن الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني في المثلث العلوي من مخطط الانتشار ( بلون أحمر) تنتشر بمدى أوسع ولكن متقاربة من المنطقة الوسطية للمخطط.



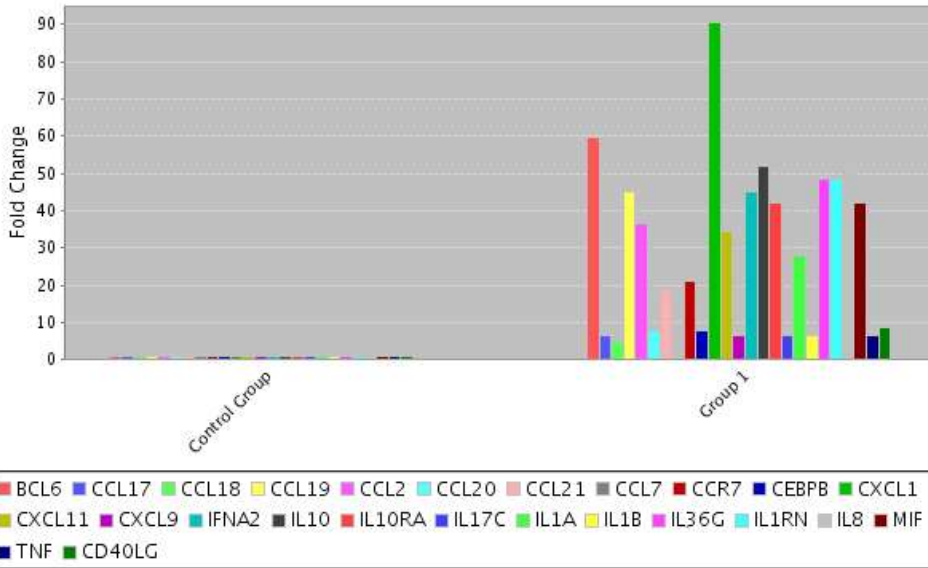
الشكل (4-7): انتشار الجينات التابعة للمجموعة الثانية التي حصلت لها زيادة (25 جيناً بلون أحمر) ونقصان (6 جينات بلون أخضر) في التعبير الجيني مقارنة مع السيطرة.

أما في الشكل (4-8) فالمنحني المتعدد Multi curve فيه نوع الجينات التابعة للمجموعة الثانية التي حصلت فيها زيادة في التعبير الجيني بتأثير الإصابة بفيروس HPV وبشكل ترتيبى لكل جين ابتداءً من الأقل تعبيراً بين 6.49 ضعفاً في الجين *CXCL9* و 90.50 ضعفاً في الجين *CXCL1* كما موضح في جدول 4 في الملحق 1.



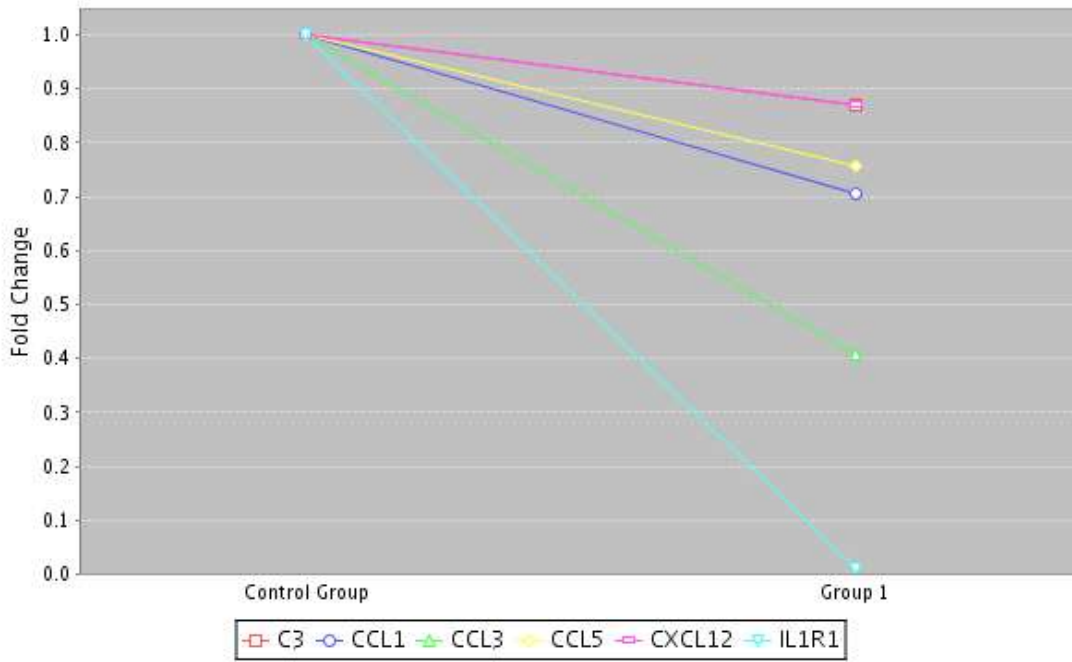
شكل 4-8: الجينات التي حصلت فيها زيادة في التعبير الجيني في المجموعة الثانية بعد الإصابة بفيروس HPV مرتبة على وفق عدد تضاعف التعبير الجيني (بين 6.49 و 90.50 ضعفاً) ومقارنة ذلك مع السيطرة (1ضعف).

أما شكل 4-9 فيظهر مخطط الهستوگرام المتعدد Multi Histogram لكل من جينات التجربة التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني بتأثير الإصابة بـ HPV وكذلك جينات السيطرة المتساوية في التعبير الجيني (ضعف واحد لكل جينات السيطرة) والواقعة في المجموعة الثانية. ويلاحظ الفرق في التعبير الجيني لكل جين والمعبر عنه بلون يختلف عن الآخر لتسهيل المقارنة.



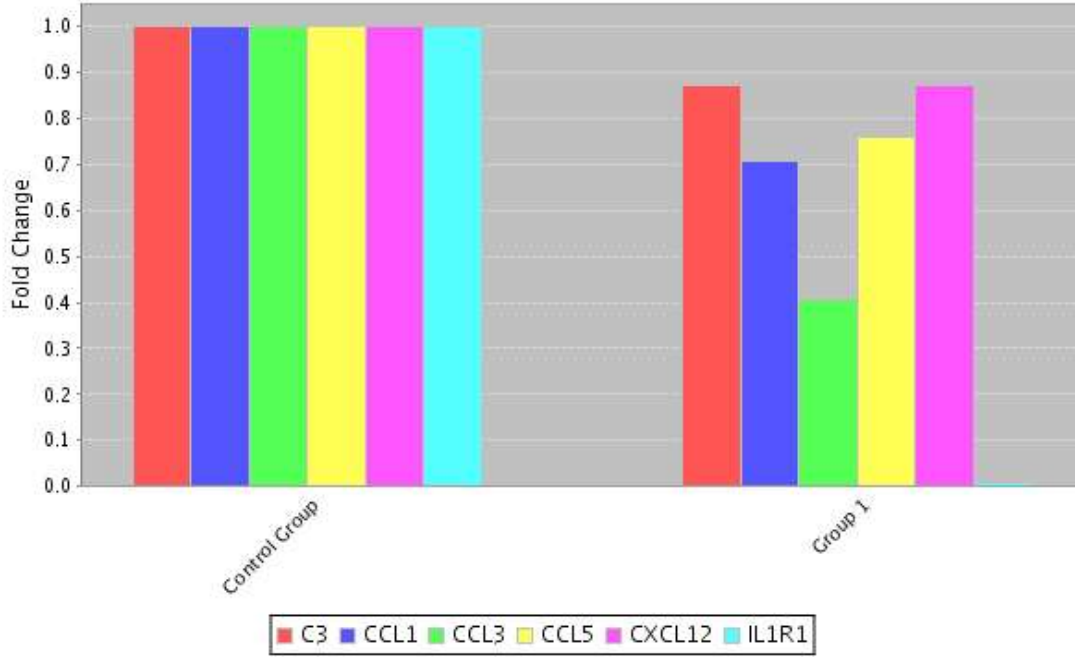
شكل 4-9: الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (أكثر من ضعف) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) ضمن المجموعة الثانية والممثلة بأعمدة كل عمود بلون يمثل جيناً محدداً مع بيان اسم كل جين على وفق الأعمدة من اليسار إلى اليمين ترتيباً.

يظهر شكل 4-10 مخطط المنحنيات المتعدد Multi curve للجينات التابعة للمجموعة الثانية التي عانت من نقصان في التعبير الجيني بتأثير الإصابة ب HPV. إذ تظهر قيم التعبير الجيني للجينات الستة وبأقل من ضعف واحد مقارنة مع السيطرة التي قيمتها ضعف واحد لكل جين بحيث كل جين يتمثل بمنحنى خاص به، وبلون مختلف عن الجينات الأخرى كما موضح في جدول 4 في الملحق 1 إذ كان معدل التضاعف التناقصي واسعاً بين 0.01 في الجين *IL1R1* و 0.87 في الجين *C3*.



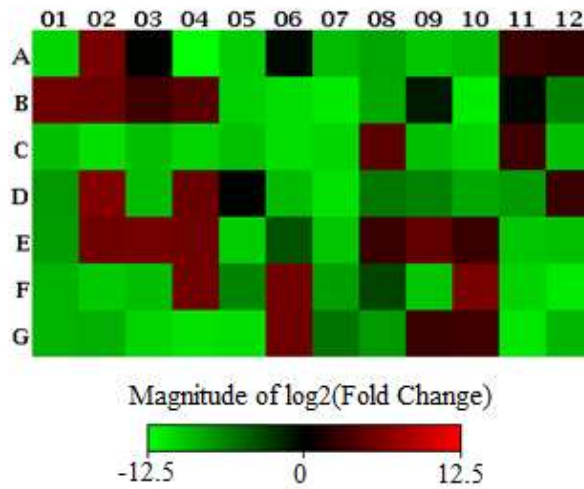
شكل 4-10: الجينات (عدد6) التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني (أقل من ضعف) مقارنة بالسيطرة والتابعة للمجموعة الثانية.

يلاحظ في شكل 4-11 مخطط الهستوگرام للجينات التابعة للمجموعة الثانية التي عانت من نقصان في تعبيرها الجيني (أقل من ضعف واحد) تحت تأثير الإصابة ب HPV وكل جين مميز بعمود ذات لون خاص لتسهيل المقارنة.



شكل 4- 11 : الجينات التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني بأقل من ضعف واحد (المجموعة الثانية) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) ممثلة بأعمدة (كل جين بلون محدد) مع بيان اسم كل جين على وفق ترتيب الأعمدة.

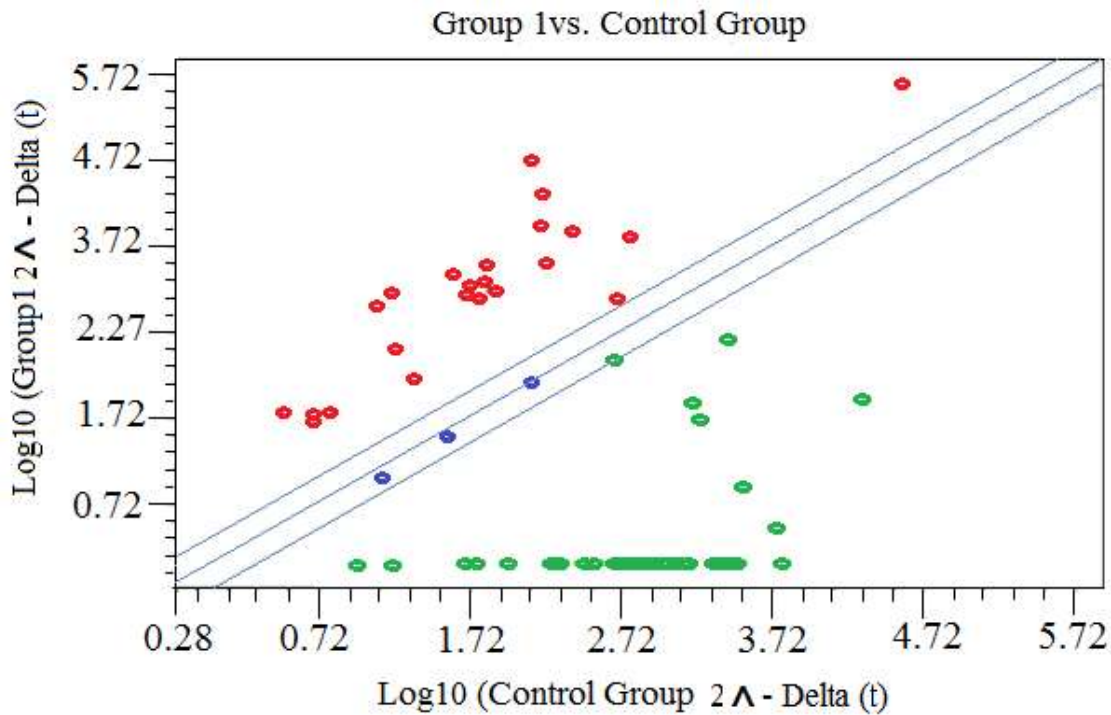
يمثل شكل 4- 12 الخريطة الحرارية للجينات التابعة للمجموعة الثانية التي تأثرت بالإصابة بفيروس HPV وتوضح الصورة الكاملة لكل الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (باللون الأحمر) أو التي حصل لها نقصان (باللون الأخضر).



شكل 4-12: تظهر الخريطة الحرارية للجينات التابعة للمجموعة الثانية ضمن المصفوفة الخاصة بتقانة RT-PCR -Array التعبير العام لكل الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (المربع الأحمر) أو نقصان (المربع الأخضر).

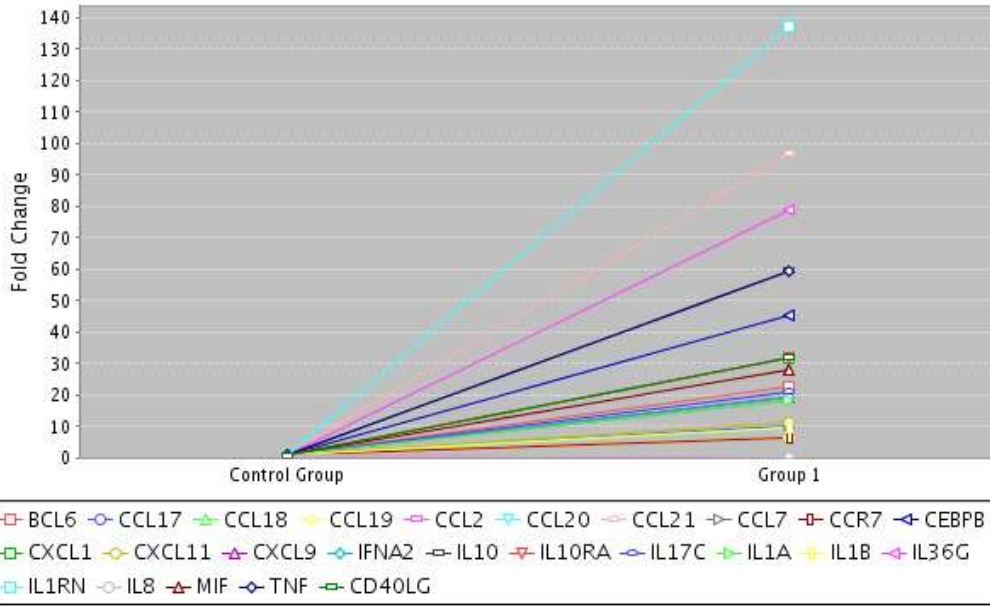
فيما يخص المجموعة الثالثة من الجينات فقد أظهرت النتائج زيادة في مدى التعبير الجيني في مستويات التعبير الجيني مقارنة مع المجموعة الأولى والثانية. إذ يلاحظ من جدول 5 في الملحق 1 أن مدى التعبير الجيني للجينات التي عانت من زيادة في التعبير الجيني كان بين 6.498 ضعف في كلاً من الجينات *CCL18* و *CCL19* و *CCR7* و 137.187 ضعفاً في الجين *IL1RN*.

يلاحظ من شكل 4-13 أن الجينات التي حصل لها زيادة في التعبير الجيني في المثلث العلوي من مخطط الانتشار (بلون أحمر) بالمنطقة الوسطى من المثلث ومتقاربة من بعض. أما الجينات التي عانت من نقصان في تعبيرها الجيني فكانت ذات مدى من التعبير الجيني تراوح بين 0.0009 ضعف مع الجين *CCL3* و 0.87 ضعف للجين *C3* كما موضح في جدول 5 في الملحق 1.



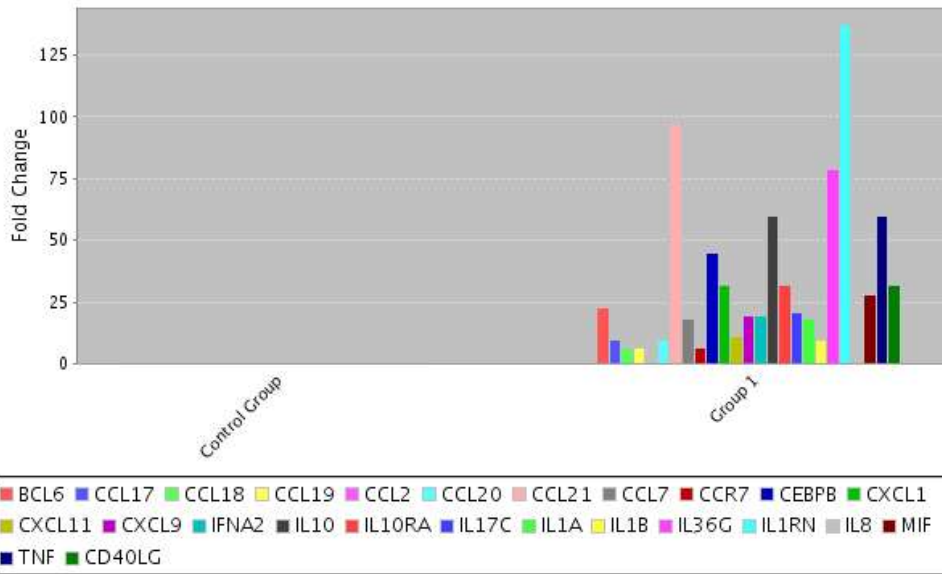
شكل 4-13: انتشار الجينات التابعة للمجموعة الثالثة التي حصلت لها زيادة (بلون أحمر) و نقصان (بلون أخضر) في التعبير الجيني مقارنة مع السيطرة.

كما يلاحظ في شكل 4-14 المنحني المتعدد Multi curve وفيه نوع الجينات التابعة للمجموعة الثالثة التي حصل فيها زيادة في التعبير الجيني بتأثير الإصابة بفيروس HPV وبشكل ترتيبي لكل جين ابتداءً من الأقل تعبيراً بين 6.498 ضعف في كلاً من الجينات *CCL18* و *CCL19* و *CCR7* و 137.187 ضعفاً في الجين *IL1RN*.



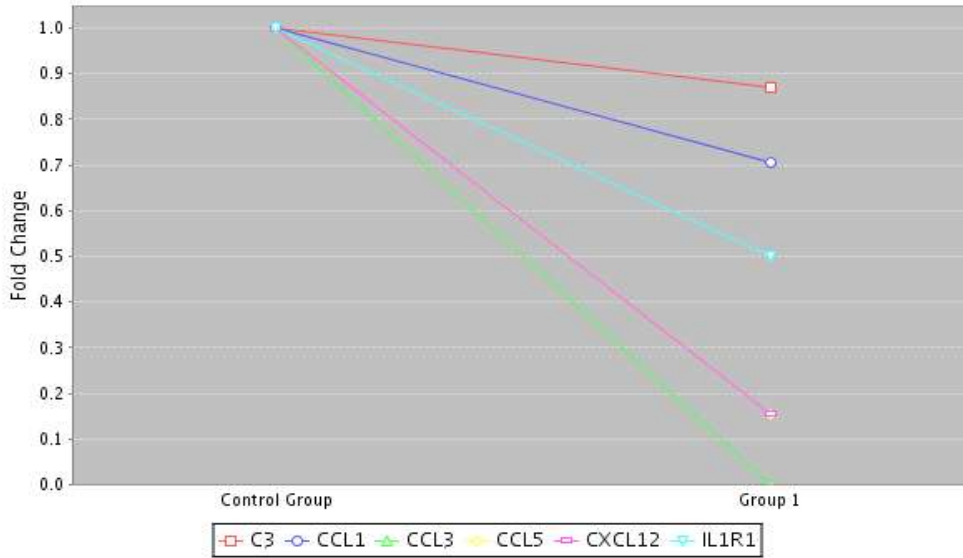
شكل 4-14: الجينات التي حصلت فيها زيادة في التعبير الجيني في المجموعة الثالثة بعد الإصابة بفيروس الحلبيات البشرية مرتبة وفق عدد تضاعف التعبير الجيني 6.498 ضعف في كلاً من الجينات *CCL18* و *CCL19* و *CCR7* و 137.187 ضعفاً في الجين *IL1RN*.

ويلاحظ من شكل 4-15 مخطط الهستوگرام المتعدد Multi Histogram لكل من جينات التجربة التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني بتأثير الإصابة بـ HPV وكذلك جينات السيطرة المتساوية في التعبير الجيني (ضعف واحد لكل جينات السيطرة) والواقعة في المجموعة الثالثة. ويلاحظ الفرق في التعبير الجيني لكل جين والمعبر عنه بلون يختلف عن الآخر لتسهيل المقارنة.



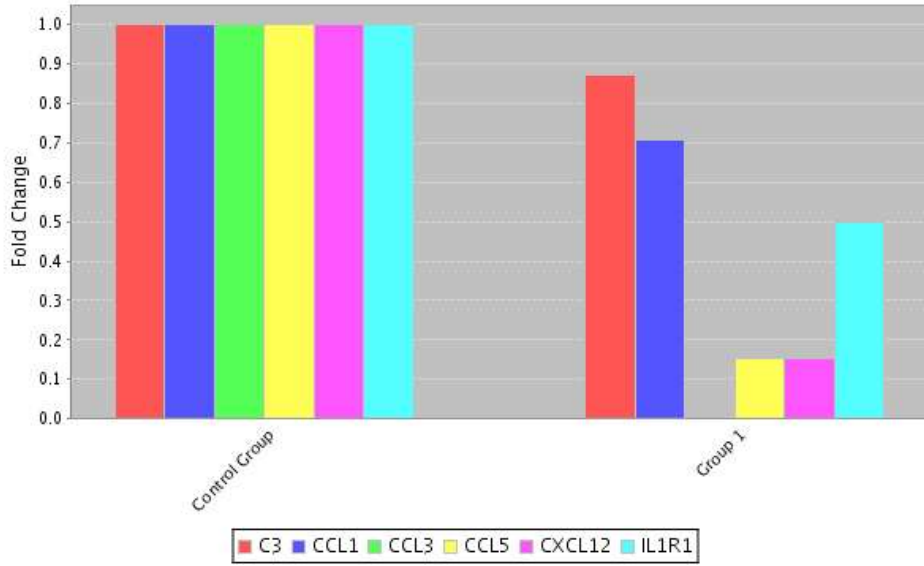
شكل 4-15 : الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (أكثر من ضعف) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) ضمن المجموعة الثالثة والممثلة بأعمدة كل عمود بلون يمثل جيناً محدداً مع بيان اسم كل جين على وفق الأعمدة مرتبة من اليسار إلى اليمين.

أما شكل 4-16 فيمثل المنحني المتعدد للجينات في المجموعة الثالثة التي عانت من نقصان في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس HPV وكل جين ممثل بمنحني منفرد وبلون محدد له لمقارنته مع جينات السيطرة وترواح معدل النقصان بين 0.0009 ضعف في الجين *CCL3* و 0.87 ضعف في الجين *C3* كما موضح في جدول 5 في الملحق 1 .



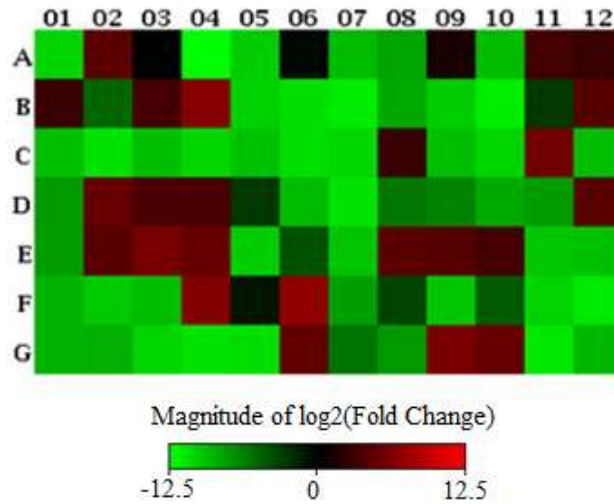
شكل 4-16: الجينات التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني (أقل من ضعف) مقارنة بالسيطرة والتابعة للمجموعة الثالثة, كل منحني يمثل جيناً.

يمثل شكل 4-17 مخطط الهستوكرام للجينات التابعة للمجموعة الثالثة التي عانت من نقصان في تعبيرها الجيني (أقل من ضعف واحد) تحت تأثير الإصابة بـ HPV وكل جين مميز بعمود ذات لون خاص لتسهيل المقارنة.



شكل 4-17: الجينات التي حصل لها نقصان في التعبير الجيني بأقل من ضعف واحد (المجموعة الثالثة) مقارنة مع السيطرة (ضعف واحد) ممثلة بأعمدة (كل جين بلون محدد) مع بيان اسم كل جين على وفق ترتيب الأعمدة.

كما يلاحظ من شكل 4-18 الذي يمثل الخريطة الحرارية للجينات التابعة للمجموعة الثالثة التي تأثرت بالإصابة بفيروس HPV وتوضح الصورة الكاملة لكل الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (باللون الأحمر) أو التي حصل لها نقصان (باللون الأخضر).



شكل 4-18: تظهر الخريطة الحرارية للجينات التابعة للمجموعة الثالثة ضمن المصفوفة الخاصة بتقانة RT-PCR -Array التعبير العام لكل الجينات التي حصلت لها زيادة في التعبير الجيني (المربع الأحمر) أو نقصان (المربع الأخضر).

تم استخراج المعدل العام للتعبير الجيني لكل جين من الجينات ضمن المجاميع الجينية الثلاث لتوحيد التعبير الجيني في كل المجاميع ، ثم معرفة معدل التعبير الجيني التسلسلي لكل جين كما موضح في جدول 1-4 .

جدول 1-4: المعدل العام للتعبير الجيني للجينات التي عانت من زيادة في التعبير الجيني ضمن المجاميع الثلاث.

موقع الجين	رمز الجين	التعبير الجيني لكل مجموعة			المعدل العام للتعبير الجيني	الترتيب التنازلي للتعبير الجيني	
		المجموعة 1	المجموعة 2	المجموعة 3		رمز الجين	التعبير الجيني
A02	<i>BCL6</i>	8.5742	59.7141	22.6274	30.3	<i>IL1RN</i>	79.22
A11	<i>CCL17</i>	8.5742	6.498	10.0561	8.37	<i>CXCL1</i>	46.16
A12	<i>CCL18</i>	8	4.9246	6.498	6.47	<i>IL36G</i>	45.28
B01	<i>CCL19</i>	8	45.2548	6.498	19.91	<i>CCL21</i>	41.31
B02	<i>CCL2</i>	8.5742	36.7583	0.0312	15.11	<i>IL10</i>	40.08
B03	<i>CCL20</i>	8.5742	8	9.8492	8.80	<i>MIF</i>	33.30
B04	<i>CCL21</i>	8.5742	18.3792	97.0059	41.31	<i>BCL6</i>	30.3
B12	<i>CCL7</i>	22.6274	0.0127	18.3792	13.66	<i>CXCL9</i>	28.63
C08	<i>CCR7</i>	8.5742	21.1121	6.498	12.05	<i>IL10RA</i>	27.59
C11	<i>CEBPB</i>	8.5742	8	45.2548	20.60	<i>IL17C</i>	26.52
D02	<i>CXCL1</i>	16	90.5097	32	46.16	<i>TNF</i>	24.73
D04	<i>CXCL11</i>	24.2515	34.2968	11.3137	23.28	<i>IFNA2</i>	24.50
D12	<i>CXCL9</i>	59.7141	6.498	19.6983	28.63	<i>CXCL11</i>	23.28
E02	<i>IFNA2</i>	8.5742	45.2548	19.6983	24.50	<i>IL8</i>	22.77
E03	<i>IL10</i>	8.5742	51.9842	59.7141	40.08	<i>CEBPB</i>	20.60
E04	<i>IL10RA</i>	8.5742	42.2243	32	27.59	<i>CCL19</i>	19.91
E08	<i>IL17C</i>	51.9842	6.498	21.1121	26.52	<i>IL1A</i>	18.26
E09	<i>IL1A</i>	8.5742	27.8576	18.3792	18.26	<i>TOLLIP</i>	16.80
E10	<i>IL1B</i>	6.498	6.498	9.8492	7.60	<i>CCL2</i>	15.11
F04	<i>IL36G</i>	8.5742	48.5029	78.7932	45.28	<i>CCL7</i>	13.66
F06	<i>IL1RN</i>	51.9842	48.5029	137.187	79.22	<i>CCR7</i>	12.05
F10	<i>IL8</i>	8.5742	59.7141	0.0474	22.77	<i>CCL20</i>	8.80
G06	<i>MIF</i>	29.8571	42.2243	27.8576	33.30	<i>CCL17</i>	8.37
G09	<i>TNF</i>	8	6.498	59.7141	24.73	<i>IL1B</i>	7.60
G10	<i>TOLLIP</i>	9.8492	8.5742	32	16.80	<i>CCL18</i>	6.47

تم استخراج المعدل العام للتعبير الجيني (المرتب تنازليا) لجينات المجاميع الثلاث للجينات التي عانت من نقصان في التعبير الجيني بعد الإصابة بفيروس الحليمات البشرية كما هو موضح في جدول 2-4.

جدول 4-2: المعدل العام للتعبير الجيني للجينات التي عانت من نقصان في التعبير الجيني ضمن المجاميع الثلاث.

الترتيب التنازلي للتعبير الجيني		التعبير الجيني لكل مجموعة				رمز الجين	موقع الجين
التعبير الجيني السلبي	رمز الجين	معدل التعبير الجيني السلبي	مجموعة 3	مجموعة 2	مجموعة 1		
0.55	<i>CCL1</i>	0.34	0.8706	0.8706	0.0884	<i>C3</i>	A03
0.36	<i>CXCL12</i>	0.55	0.7071	0.7071	0.25	<i>CCL1</i>	A06
0.35	<i>CCL5</i>	0.16	0.0009	0.4061	0.0947	<i>CCL3</i>	B09
0.34	<i>C3</i>	0.35	0.1539	0.7579	0.1649	<i>CCL5</i>	B11
0.19	<i>IL1R1</i>	0.36	0.1539	0.8706	0.0884	<i>CXCL12</i>	D05
0.16	<i>CCL3</i>	0.19	0.5	0.0103	0.0884	<i>IL1R1</i>	F05

من النتائج أعلاه يلاحظ أن فايروس الحليمات البشرية تأثر بفعل الاستجابة المناعية للمصاب بدليل أن عدد الجينات المناعية الالتهابية التي تأثرت كان 25 جيناً وهو عدد كبير يدل على التفاعل الكبير بين ضراوة الفايروس واستجابة الجهاز المناعي له. من ناحية أخرى يلاحظ أن هذا التأثير في هذه الجينات يختلف في درجاته مع اختلاف الجينات، أي إن مدى التأثير في الجينات يلاحظ من خلال التغير الحاصل في التعبير الجيني الذي تم حسابه بعدد التضاعف المتغير في التعبير الجيني *Fold change*. ومن خلال الجدول (4-1) يلاحظ هذا التغير في التعبير الجيني بشكل واضح ابتداءً من الجين *IL1RN* (Interleukin 1 receptor antagonist) الذي تضاعف تعبيره الجيني بشكل كبير وصل إلى 79.22 ضعفاً. هذا التضاعف حصل بسبب الوظيفة المهمة التي يقوم بها هذا السايبتوكاين من خلال حثه للمناعة الذاتية *Innate immunity* التي تحث المسار المناعي المضاد للفايروس وأن تعبيره الجيني يزداد مع زيادة عدد الخلايا المناعية (T-Helper) أثناء الإصابة (Chevalier *et al.*, 2013) ، وفي دراسة أخرى أوضحت أن تعبيره الجيني يزداد بشكل حاد أثناء الإصابات الفايروسية المرتبطة مع السرطان (Gius *et al.*, 2007).

الجين *CXCL1* (Chemokine (C-X-C motif) ligand 1) يأتي بالمرتبة الثانية من حيث معدل تضاعف تعبيره الجيني (46.16 ضعفاً) وهذه الزيادة يؤدي دوراً مهماً في الاستجابة الالتهابية إذ تعمل على جذب الخلايا العدلة إلى موقع الالتهابات والتصدي للمايكروبات (Equesten *et al.*, 2007). دراسة أخرى سجلت زيادة في التعبير الجيني لهذا الجين وصلت 30.5 ضعفاً أثناء الإصابة الفايروسية وربطت هذه الزيادة مع حصول الحالات الالتهابية والشعور بالألم عند المصاب (Wang *et al.*, 2009).

اما الجين *IL36G* (Interleukin 36 , gamma) فقد تضاعف تعبيره بمقدار 45.28 ضعفاً وهي زيادة كبيرة تعكس أهميته المناعية إذ يعمل بوصفه موقع استقبال للعامل NF-kappa B مع وجود المستقبل *IL1RL2* ومن خلال هذه الوظيفة يؤدي دوراً مهماً في الاستجابة المناعية. في دراسة أخرى (Bonagura *et al.* , 2008) أوضحت زيادة قليلة في التعبير الجيني (6.9 أضعاف) وقد يعود سبب الاختلاف إلى نوع الفيروس الذي سبب الإصابة أو الاختلاف في وقت أخذ العينة من المريض التي قد تكون في بداية الإصابة أو نهايتها وعلى العموم فإن النتيجة متطابقة في حصول الزيادة في التعبير الجيني بعد الإصابة .

أما الجين *CCL21* (Chemokine (C-C motif) ligand 21) فقد تضاعف بمقدار 41.31 وهو جين يحث على هجرة الخلايا المناعية ويتوسط الاستجابة المناعية عبر تحفيزه للخلايا التائية والبائية والبلعمية أثناء الإصابة الالتهابية وبسبب هذه الوظائف فقد ازداد تعبيره الجيني في هذه الدراسة، في حين في دراسة أخرى سجلت نتيجة معاكسة إذ انخفض التعبير الجيني مقارنة مع السيطرة بعد الإصابة بـ HPV وربما يعود سبب هذا الانخفاض إلى أن العينات المدروسة كانت من مرضى نساء أصبن بـ HPV يعانون من نقص المناعة (Santegoets *et al.* , 2008).

الجين *IL10* (Interleukin 10) تضاعف بعد الإصابة بفيروس HPV بمقدار 40.08 ضعفاً وهو يؤدي دوراً مؤثراً كمضاد لحالة الالتهابات (Anti-inflammatory)، وتعليل ذلك هو احتمالية كون الإصابة هنا قديمة تمت معالجتها، وبعد ذلك تم الإيعاز من الخلية إلى فرض حالة ضد الالتهاب لتجنب إصابة الخلايا المجاورة ، كما يؤدي دوراً فعالاً أثناء الإصابات الفيروسية (Keer *et al.* , 2008). وفي دراسة أخرى لوحظت أيضاً زيادة في التعبير الجيني لهذا الجين أثناء الإصابات الفيروسية وهذا ينسجم مع نتائج هذه الدراسة. (Grissell *et al.* , 2005).

وفيما يخص الجين *MIF* (Macrophage migration inhibitory factor) فقد تضاعف بمقدار 33.30 وهو جين ينتج سايتوكاين ذا مناعة ما قبل الالتهابية Pro-inflammatory cytokine يستخدم في الاستجابة المناعية الذاتية ضد الإصابات المايكروبية إذ يتم إنتاجه في المواضع الالتهابية كوسيط في تنظيم وظائف الخلايا البلعمية الكبيرة أثناء الإصابة (Lo *et al.* , 2013) . في دراسة أخرى (Hira *et al.* , 2005) أوضحت أيضاً زيادة التعبير الجيني للجين *MIF* أثناء الإصابات الفيروسية خاصة الحادة منها وهذا يتوافق مع هذه الدراسة .

تضاعف الجين *BCL6* (B-cell CLL/lymphoma 6) في هذه الدراسة بمقدار 30.3 ضعفاً وهو جين يلعب دوراً في الاستجابة المناعية ويزيد تعبيره الجيني في خلايا الدم البيض في المرضى المصابين بالأمراض الفيروسية، كما يشارك أيضاً في احداث الأمراض عند المصابين (Guan *et al.* , 2002).

في دراسة أخرى (Singh *et al.*, 2006) أوضحت أن *BCL6* ينخفض تعبيره الجيني وهذا لا يتطابق مع نتائج هذه الدراسة، ولعل السبب هو قياس تعبيره الجيني بعد مدة طويلة من الإصابة أو في المراحل الأخيرة لإنحار الخلية إذ إنه بعد الإصابة بمدة يسمح ببدء عملية انحار الخلية عن طريق تحفيز إنتاج البروتين caspase-9 ومن ثمَّ يسبب ضغطاً كبيراً على الخلية وتنتهي بالموت المبرمج للتخلص من انتشار الإصابة .

وفيما يخص الجين *CXCL9* (Chemokine (C-X-C motif) ligand 9) فإنه تضاعف بنسبة متوسطة (28.63 ضعفاً) بعد الإصابة بفيروس HPV وهذه النتيجة جاءت متطابقة مع دراسة أخرى (AL-Ghazal, 2010) أوضحت أن الإصابات الفيروسية للإنسان تسبب زيادة في التعبير الجيني تصل إلى أكثر من 79 ضعفاً. من خلال ذلك يلاحظ ان ارتفاع تعبيره الجيني قد يرجع إلى أهميته الوظيفية في تحفيز الخلايا المناعية للاستجابة ضد الالتهابات المايكروبية ويقوم باستدعاء الخلايا التائية (T-cells) إلى مناطق الالتهابات (Lau and Peiris, 2009). أما الجين *IL10RA* (Interleukin 10 receptor, alpha) فقد تضاعف بمقدار 27.59 بعد الإصابة بفيروس الحليمات البشرية، وفي دراسة أخرى ازداد التعبير الجيني لهذا الجين أيضاً بسبب الإصابة الفيروسية لكن الزيادة كانت قليلة إذ يعمل هذا الجين كمستقبل عالي الانجذاب تجاه الساييتوكاين IL10، فضلاً عن أنه يعمل على تحفيز إنتاج مستوى عالٍ من بروتين IL10 داخل الخلايا وحيدة النواة (Monocyte) والخلايا التائية والبائية أثناء الإصابة الفيروسية (Huange *et al.*, 2009). وفي دراسة أخرى أوضحت أن *IL10RA* يتوسط الإصابات الفيروسية وينتج بتركيز واطئة في بداية الإصابة ثم يزداد تدريجياً (Henning *et al.*, 2007).

فيما يخص الجين *IL17C* (Interleukin 17C) فيؤدي دوراً حاسماً في المناعة الذاتية ضد الإصابات الميكروبية، إذ يقوم بإنتاج ببتيدات تعمل كجزئيات التهابية أولية مضادة للمكروبات من خلال تحفيز سلسلة الإشارات عبر المسار المناعي NF-kappa-B وMAPK pathways. في هذه الدراسة ازداد التعبير الجيني لهذا الجين بمقدار 26.52 ضعفاً وهذا يعكس أهميته أثناء الإصابة للقيام بالوظائف المذكورة أعلاه، في دراسة أخرى لوحظ أن التعبير الجيني يزداد لهذا الجين ويعمل كمضاد مايكروبي إلا أنه قد ينخفض بتأثير التدخين (Pfeifer *et al.*, 2013).

الجين *TNF* (Tumor necrosis factor) تضاعف بمقدار 24.73 في هذه الدراسة وهو ينتج من الخلايا المناعية الذاتية ويعمل كساييتوكاين استهلاكي للالتهابات، إذ يرتبط مع مستقبل خلوي خاص ويحث إنتاج البروتين NF-kB الذي بدوره يحث التعبير الجيني لـ 60 جيناً مناعياً تستهل المناعة الأولية ثم تتوسط الانتحار الخلوي المبرمج بعد الإصابة

الفايروسية (Mehta *et al.*, 2003; Alberts *et al.*, 2002). في دراسة أخرى أوضحت أن *TNF* يزداد تعبيره الجيني عند الإصابة بالفايروسات وهذا يتطابق مع نتائج هذه الدراسة (Hayden *et al.*, 2002).

الجين *IFNA2* (Interferon, alpha 2) فقد تبين أن تعبيره الجيني ازداد بمقدار 24.50 وهو بروتين يعمل بوصفه ناقلاً طبيعياً للإشارة المناعية الخلوية. وأوضحت دراسة كلاً من (Kotenko *et al.*, 2003 ; Dillon, and Runstadler, 2010) أن تعبيره يزداد خلال الإصابات الفايروسية، إذ ينتج من الخلايا المناعية ويعد وجوده دليلاً على وجود إصابة فايروسية. أما الجين *CXCL11* (Chemokine (C-X-C motif) ligand 11) تضاعف بمقدار 23.28 ضعفاً في هذه الدراسة وهو يؤدي دوراً مهماً في المناعة الخلوية التي تعمل ضد الإصابات الالتهابية، لذا لوحظ أنه في دراسة أخرى أيضاً تعبيره الجيني يزداد لكن في وقت متأخر من الإصابة ويعد دليلاً على الإصابة الالتهابية (Zajkowska *et al.*, 2011).

الجين *IL8* (Interleukin 8) ازداد بمقدار 22.77 ضعف وهو يفرز كبروتين مناعي يتوسط التفاعلات المناعية الذاتية من خلال عمله كعامل حركي يحث هجرة الخلايا العدلة والقعدة والتائية خلال العديد من الإصابات الالتهابية الفايروسية (Utgaard *et al.*, 1998). في دراسة أخرى أوضحت انه ينتج بزيادة لغرض تحفيز الخلايا العدلة أثناء الالتهابات المختلفة (Van Damme *et al.*, 1990).

الجين *CEBPB* (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). beta) تضاعف بمقدار 20.60 وهو جين له دور مهم في المناعة والاستجابة الالتهابية، لذا فإن زيادة التعبير الجيني له بعد الإصابة بـ HPV يحصل باستجابة الخلية المصابة للفايروس والتصدي له من خلال زيادة استنساخ جينات مناعية أخرى (خاصة *IL1* و *IL6*) تسهم في التصدي للفايروس (Sebastian and Johanson, 2009). في دراسة أخرى أوضحت ان هذا الجين ينخفض تعبيره الجيني أثناء الإصابة بفايروس HPV وهذا معاكس للنتائج المتحصلة، وقد يكون السبب هو الاختلاف في نوع الخلية المصابة، إذ أن في حالة الإصابة بفايروس HPV فإن هذا الجين إما يعمل كاجاً أو منشطاً للجينات التابعة لفايروس HPV وذلك اعتماداً على نوع الخلية التي أصابها (Walter *et al.*, 2006). الجين *CCL19* (Chemokine (C-C motif) ligand 19) ازداد تعبيره الجيني بمقدار 19.91 في حين في دراسة أخرى (Bonagura *et al.*, 2010) انخفض تعبيره الجيني أثناء الإصابة بـ HPV وكان تليل هذا الانخفاض هو قابلية أحد جينات الفايروس على تعطيل التعبير الجيني له. لكن في دراسة أخرى أوضحت أن هذا الجين ازداد تعبيره بعد الإصابة بفايروس الحليمات البشرية السرطانية وهذا يتطابق مع هذه الدراسة (Trimble, *et al.*, 2013).

ينتج الجين *IL1A* (Interleukin 1, alpha) من خلايا البلعمية الكبيرة وظيفته تحفيز تضاعف خلايا التوتة من خلال إنتاجه للسايوتوكاين IL2 كما يشارك في تضاعف الخلايا البائية ونضوجها (Misener *et al.*, 2008). في هذه الدراسة تضاعف هذا الجين بمقدار 18.26 ضعفاً، وأوضحت دراسة (AL Ghazal, 2012) أيضاً زيادة في التعبير الجيني بمقدار 16.89 ضعفاً وعلل ذلك بأن الخلية المضيف لها تأثير في الفايروس، إذ حثت على إنتاج هذا الجين لكي يقوم بوظيفته بالتصدي للفايروس. وفي دراسة أخرى سجلت زيادة واطئة في التعبير الجيني (مقارنة مع هذه الدراسة) إذ كانت 5.87 أضعاف (Santin *et al.*, 2005).

الجين *TOLLIP* (Toll interacting protein) يعد مكوناً رئيساً لمسار الإشارة الخلوي المناعي لإنتاج IL1 والمستقبلات نوع Toll-like receptor ويثبط فعالية المنتجات المايكروبية داخل الخلية المضيف (Lee *et al.*, 2009)، في هذه الدراسة تضاعف بمقدار 16.80 ضعفاً وهو تضاعف عالٍ مقارنة مع دراسة (Santin *et al.*, 2005) إذ أوضحت تضاعفه التعبيري أثناء الإصابة بـ HPV بمقدار 2.83 فقط، وهذا يدل على أهميته في حث المسار المناعي أعلاه للعمل ضد الفايروس.

الجين *CCL2* (Chemokine (C-C motif) ligand 2) وهو يشفر لبروتين حركي يفرز من خلايا وحيدة النواة Monocyte وله أهمية كبيرة جداً في استحداث وتكوين الأوعية الدموية الدقيقة Angiogenesis في مناطق الأورام وأثناء العمليات الالتهابية (Dell'Agnola and Biragyn, 2008). في هذه الدراسة تضاعف التعبير الجيني لهذا الجين بمقدار 15.11 ضعفاً وهذه النتيجة مطابقة لدراسة سابقة أوضحت حصول زيادة في التعبير الجيني لغرض تثبيط فعالية الخلايا المساعدة نوع Th1، ومن ثمّ تثبيط الاستجابة الخلوية لمضادات الأورام (Dell'Agnola and Biragyn, 2008).

الجين *CCL7* (Chemokine (C-C motif) ligand 7) يعد عاملاً حركياً يجذب خلايا وحيدة النواة (Monocyte) والخلايا الحمضة أثناء الاستجابة الالتهابية، فضلاً عن حثه على إنتاج إنزيم الجيلاتينيز الذي بدوره يرتبط بالعديد من المستقبلات مثل CCR1 و CCR2 و CCR3. في هذه الدراسة تضاعف بمقدار 13.66 ضعفاً وفي دراسة سابقة سجلت أيضاً زيادة في التعبير الجيني بتأثير السايوتوكاين TNF-alpha وبالتالي سببت زيادة في الاستجابة ضد الإصابات الفايروسية (Renner *et al.*, 2011).

الجين *CCR7* (Chemokine (C-C motif) receptor 7) يسهل عملية هجرة الخلايا البيض إلى مناطق العقد اللمفاوية لإنجاز عملية التمايز المناعي، في هذه الدراسة تضاعف التعبير الجيني لهذا الجين بمقدار 12.05 ضعف في حين في دراسة سابقة لوحظت أيضاً زيادة في التعبير الجيني له أثناء

الإصابات الفيروسية (Mburu *et al.*, 2012), وسبب هذه الزيادة يعود إلى أهميته في تمايز الخلايا المناعية عند الاستجابات المناعية ضد الفيروسات ومنها HPV. وفي دراسة أخرى حصلت زيادة أكبر من الزيادة الحاصلة في هذه الدراسة (59 ضعفاً) بعد الإصابة ب HPV و اعزيت هذه الزيادة أيضا إلى تحفيز أعداد كبيرة من الخلايا المناعية (Yang *et al.*, 2004).

الجين *CCL20* (Chemokine (C-C motif) ligand 20) تضاعف بمقدار 8.80 أضعاف في هذه الدراسة في حين في دراسة سابقة تضاعف بدرجة أقل (3.39 أضعاف) بعد الإصابة ب HPV (Boccardo *et al.*, 2010) ، وتعد الزيادة في التعبير الجيني لهذا الجين مهمة كونه عامل جذب حركي لكل من الخلايا اللمفية ( Lymphocyte ) والخلايا العدلة وخلايا وحيدة النواة Monocyte إلى المناطق الالتهابية (Kawashiri *et al.*, 2009).

يؤدي الجين *CCL17* (Chemokine (C-C motif) ligand 17) دوراً كبيراً في حث هجرة الخلايا اللمفية نوع T وحث تطور الخلايا التائية داخل غدة التوتة وكذلك ينشط حركة الخلايا الناضجة منها، وذلك أثناء الإصابات الفيروسية (Riezu-Boje *et al.*, 2011) تضاعف هذا الجين في هذه الدراسة بمقدار 8.37 أضعاف وفي دراسة سابقة لوحظ وجود زيادة في التعبير الجيني كاستجابة للإصابة ب HPV (Yang *et al.*, 2004).

ينتج الجين *IL1B* (Interleukin 1, beta) من الخلايا البلعمية الكبيرة ويقوم ببحث تتاسل الخلايا التايروسية وتنشيط نضج الخلايا البائية وتناسلها أثناء الإستجابة الالتهابية للفيروسات (Abbas and Muatter, 2003). في هذه الدراسة تضاعف بمقدار 7.60 أضعاف في حين في دراسة سابقة تضاعف بمقدار 4.9 أضعاف (AL Ghazal, 2012) .

الجين *CCL18* (Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-) (regulated) كان أقل الجينات التي درست في تضاعف تعبيره الجيني (6.47). ويعد عاملاً جذب Chemoattractants إذ يعزز استدعاء الخلايا المناعية أثناء الالتهابات والاستجابة الفيروسية وينتج من الخلايا القاتلة والخلايا البلعمية الكبيرة والخلايا التائية (Kim *et al.*, 2005) . في دراسة أخرى أكدت حصول زيادة في التعبير الجيني للجين *CCL18* أثناء الإصابة ب HPV التي عللت الزيادة بسبب تحفز الخلايا البلعمية الكبيرة للإصابة بفيروس HPV والنتيجة قيامها بإنتاج الجين للتصدي للفيروس (Bonagura *et al.*, 2010).

اما الجينات التي عانت من انخفاض في التعبير الجيني فكانت ستة كما موضح في جدول 4-2 ومعدل الانخفاض تراوح بين 0.16 ضعف في جين *CCL3* إلى 0.55 في جين *CCL1* وهو مدى

ضيق وغير واسع مقارنة مع الدراسات السابقة، أما ما يخص الجين *CCL1* (Chemokine (C-C motif) ligand 1) فقد انخفض إلى أقل من النصف وهذه النتيجة تعزز بدراسة سابقة، إذ أوضحت أن تعبيره الجيني أثناء الإصابة بفيروس الحليمات البشرية كان ضعيفاً (Cao *et al.* , 2008). دراسة أخرى أيضاً بينت أن الجين *CCL1* لا تحصل له أية زيادة في تعبيره الجيني (Baumgarth *et al.* , 2004) ويعلل هذا الانخفاض من خلال وظيفته في استدعاء خلايا وحيدة النواة الذي يحث إشارة مناعية ضد HPV والذي بدوره قد يحفز إنتاج بروتين (STAT) الذي يوقف التعبير الجيني له في بداية الإصابة فينخفض إنتاجه (Hintzen *et al.* , 2008).

أما الجين *CXCL12* (Chemokine (C-X-C motif) ligand 12) فقد انخفض إنتاجه إلى 0.36 ضعف وهو جين يقوم بوظيفتين متناقضتين وفق وضع الخلية المصابة فهو من ناحية يحفز جذب الخلايا التائية وخلايا وحيدة النواة لمناطق الإصابة ، ومن ناحية أخرى يثبط الجذب الحركي لهذه الخلايا الذي يحدد ذلك شدة الإصابة. وفي دراسة سابقة حديثة عللت انخفاض تعبيره الجيني بسبب حصول حالة نهاية الإصابة أو أن تكون الإصابة في طور الشفاء (Tanegashima *et al.* , 2013).

أما الجين *CCL5* (Chemokine (C-C motif) ligand 5) فقد انخفض تعبيره الجيني إلى 0.35 ضعف وهذه النتيجة تتوافق مع دراسة سابقة أوضحت انخفاض التعبير الجيني أثناء إصابة الفايروس HPV حيث إن وظيفة هذا الجين هو أنه يعمل مثبطاً طبيعياً للانجذاب الحركي للخلايا المناعية ، ومن هنا يمكن تعليل سبب انخفاض تعبيره الجيني (Karim *et al.* , 2011).

الجين *C3* (Complement component 3) لقد انخفض تعبيره بمقدار 0.34 ضعف وهو جين له عدة وظائف منها تحطيم الأحياء المجهرية الغازية للخلايا، و تعزيز عملية البلعمة وإنهاء الحالة المناعية عند المراحل الأخيرة من الإصابة ؛ لذلك فإن تعليل ضعف إنتاج هذا الجين قد يكون أن العينة المأخوذة من دم المصاب أخذت في المراحل النهائية من الإصابة (Saleh *et al.* , 1998). دراسة أخرى أوضحت انخفاض التعبير الجيني له بمعدلات مختلفة تراوحت بين 0.06 و 0.28 ضعف وهي حالة انخفاض أقل مما لوحظ في هذه الدراسة (Sen *et al.* , 2003).

ينتج الجين *IL1R1* (Interleukin 1 receptor, type I) سايتوكايناً مهماً يتوسط الاستجابة المناعية والالتهابية خاصة الفايروسية منها، وفي هذه الدراسة انخفض تعبيره الجيني بمقدار 0.19 ضعف عند الإصابة ب HPV إلا أن دراسة (Santin *et al.* , 2005) أوضحت زيادة

خفيفة في تعبيره الجيني (3.75 أضعاف) أثناء الإصابة بالفايروس وقد يعزى السبب الى أن كمية العينة كانت قليلة وكما أن عمر المريض ممكن أن يؤثر على النتيجة .

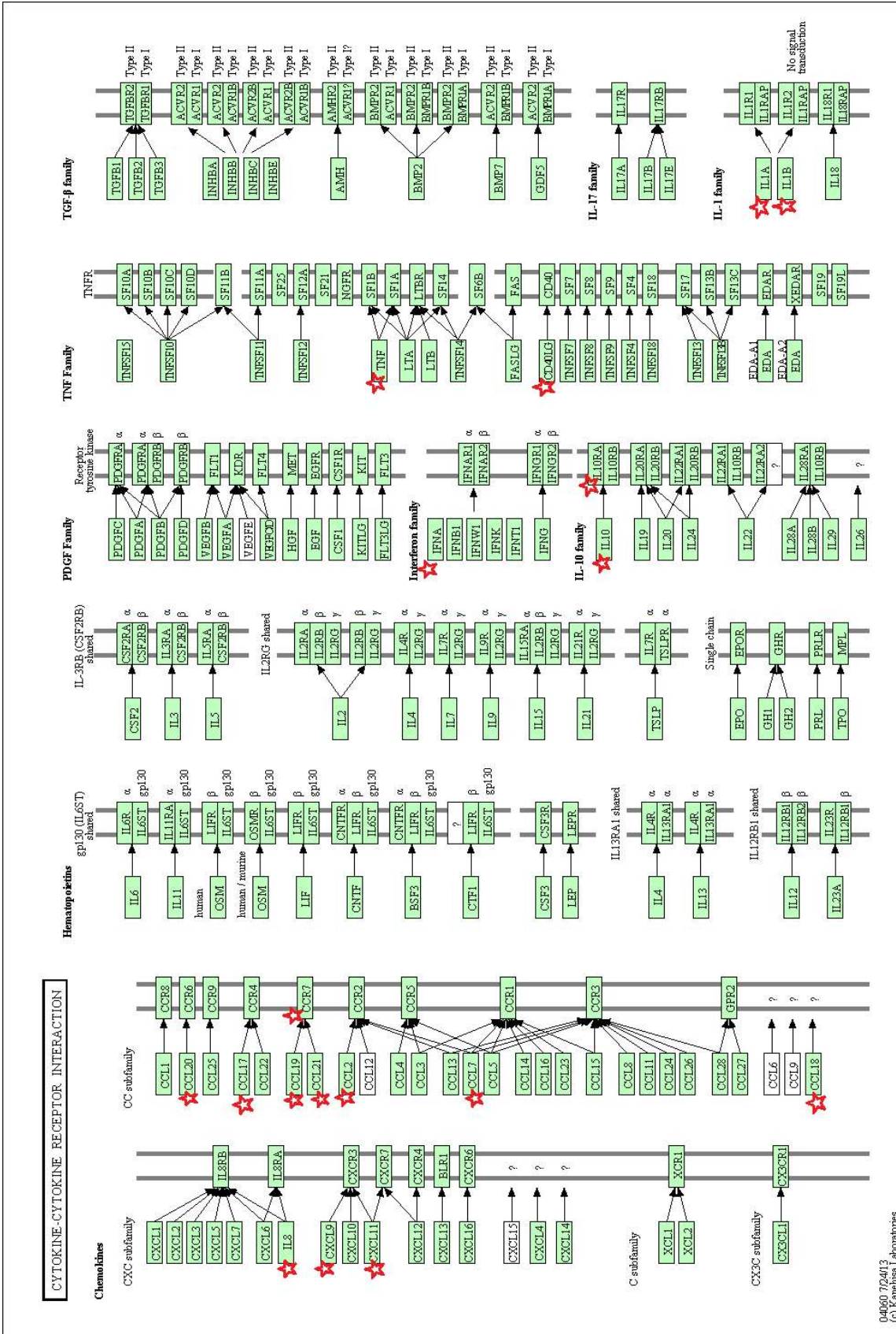
الجين *CCL3* (Chemokine (C-C motif) ligand 3) انخفض التعبير الجيني لهذا الجين في هذه الدراسة بمقدار 0.16 ضعف وهو أقل انخفاض في الجينات تحت الدراسة، يشفر هذا الجين سايتوكايناً مهماً جداً في التصدي للإصابات الفايروسية ، وذلك عبر ارتباطه مع عدة مستقبلات مناعية مثل *CCR1* و *CCR4* و *CCR5* التي تستحث إشارات مناعية للتصدي للفايروسات خاص فايروس نقص المناعة المكتسبة (الإيدز)، وفي دراسة سابقة (Echchannaoui *et al.*, 2008) لوحظ أن تعبيره الجيني يزداد زيادة طفيفة (1.88 ضعف) فقد يكون السبب هو ان المريض يعاني من أمراض اخرى.

#### 2-4 التنبؤ الجيني Gene Ontology

تم تحليل 25 جيناً من الجينات التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بعد الإصابة بفايروس HPV للحصول على مكان تأثير هذه الجينات في المسارات المناعية الالتهابية المهمة في الإنسان باستخدام برنامج David Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis .

أظهرت النتائج تأثير هذه الجينات في 9 مسارات من هذه المسارات التي تشمل: Chemokine signaling و Cytokine- Cytokine Receptor Interaction pathway و NOD-like receptor signaling و Toll-like receptors signaling pathway و Graft-versus-host disease pathway و Asthma signaling pathway و Apoptosis pathway و Rig-1-like receptor signaling pathway و T-cell receptor signaling pathway .

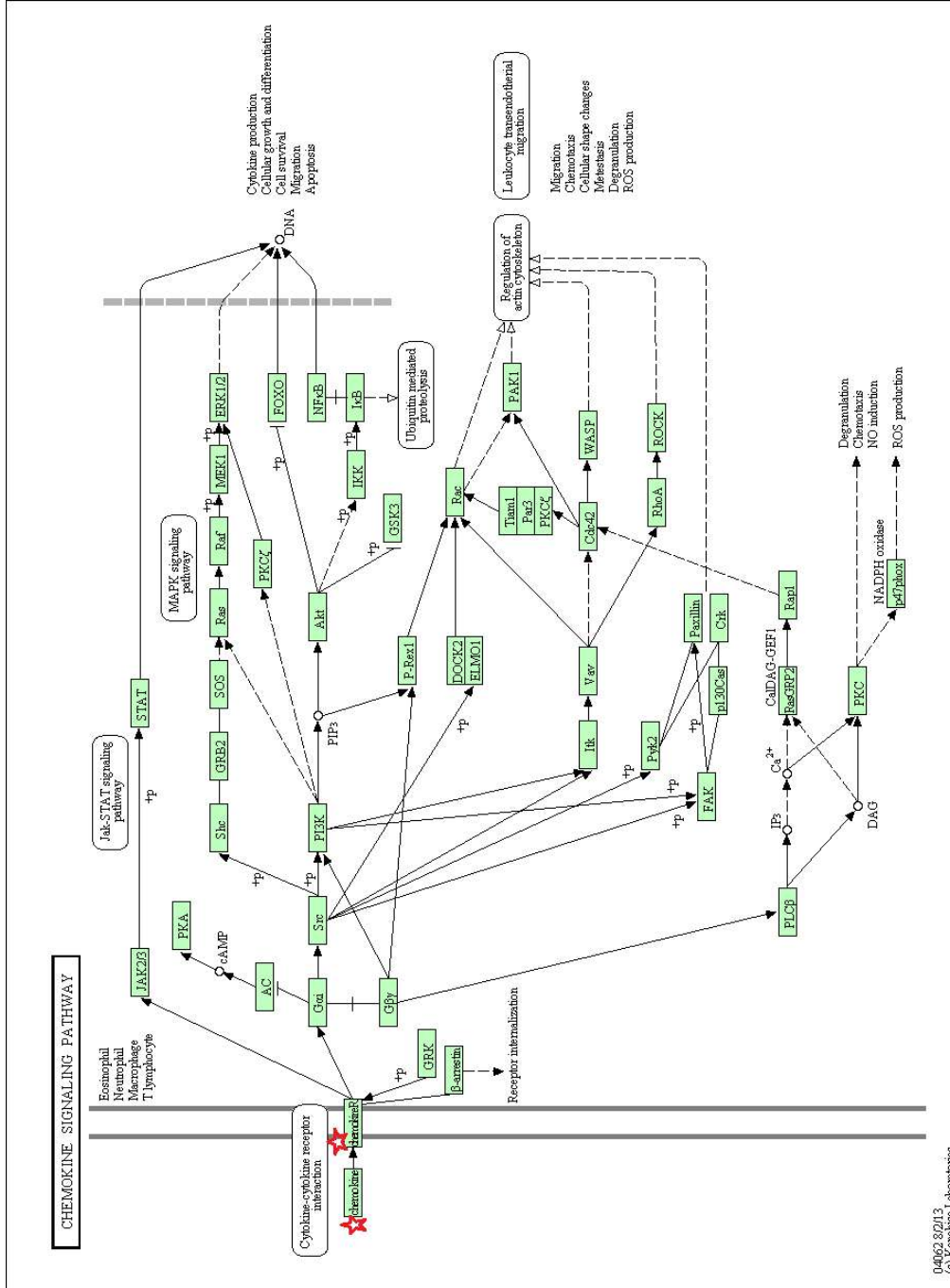
فيما يخص المسار Cytokine- Cytokine Receptor Interaction pathway يلاحظ من شكل 4-19 أن هناك 18 موقعاً في هذا المسار (الجينات المؤشرة بالنجمة الحمراء) قد تأثر بفعل 18 جيناً من الجينات التي تنتج سايتوكاينات خلوية ويزيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفايروس الحليمات البشرية وهذه الجينات هي *IL-8* , *CXCL9* , *CXCL11* , *CCL20* , *CCL17* , *CCL19* , *CD40LG* , *TNF* , *CCL21* , *CCL2* , *CCL7* , *CCR7* , *CCL18* , *INF-α* , *IL-10* , *IL-10RA* . وتلعب دوراً رئيساً في تنظيم كل من: المناعة الذاتية والمكتسبة ونمو وتمايز الخلايا وموت الخلية Apoptosis , واسحاث الأوعية الدموية الشعيرية (angiogenesis) , وأنظمة طور الخلية وتصلحها (Kazi and Rönstrand., 2013).



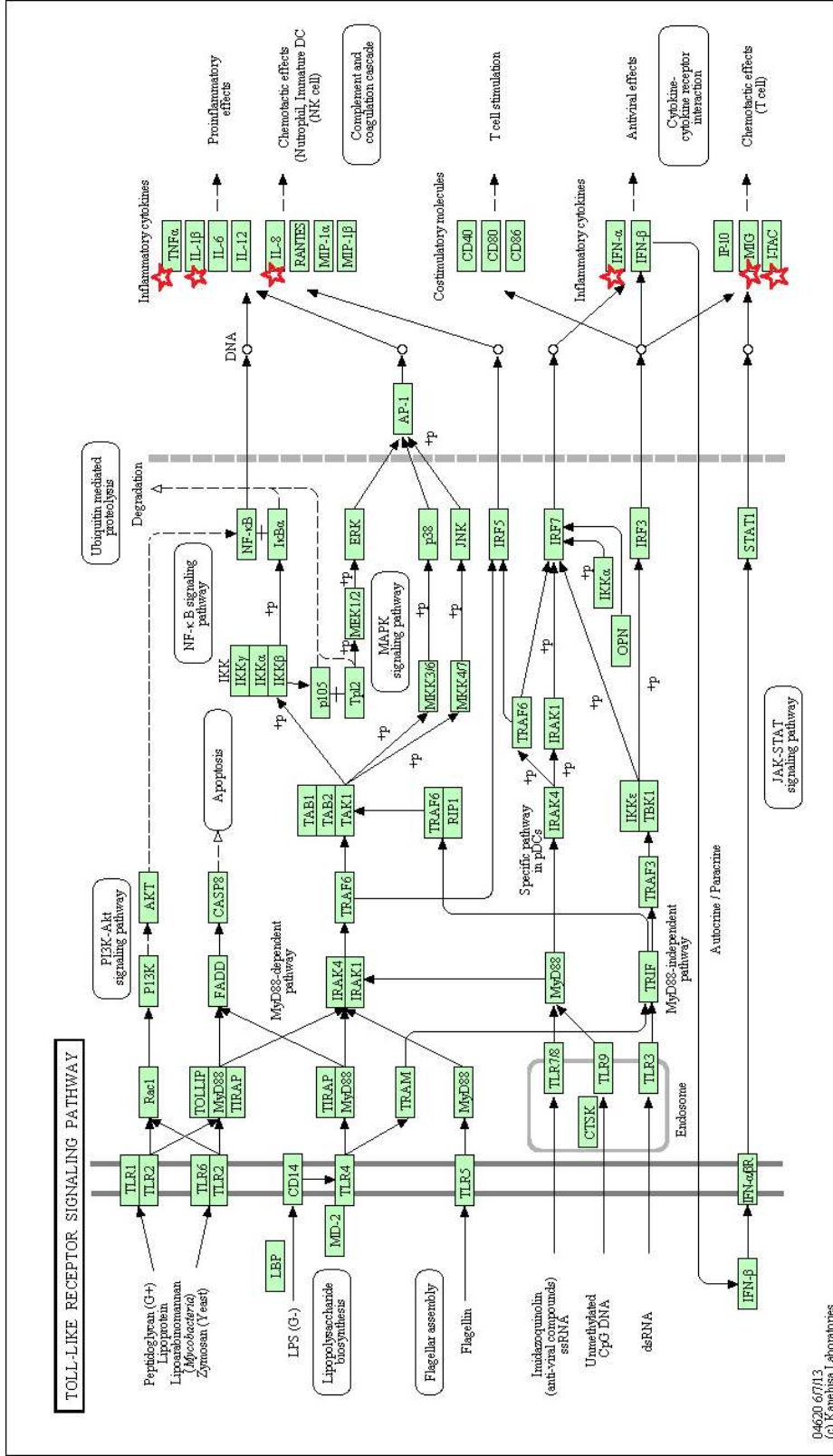
شكل 4-19: تأثير الجينات المناعية الإلتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحصيات البشرية في المسار Cytokine- Cytokine Receptor Interaction pathway

الإلتهابات التي تعاني من غزو خارجي. والنتائج لهذه الجينات يساعدان على توجيه هذه الخلايا إلى هذه المناطق. فضلاً عن ذلك فإن هذه البروتينات الحركية تنظم الفعاليات الحيوية للخلايا الجذعية من خلال تنشيطها وتمايزها وبقائها حية. ويتم تنشيط هذه البروتينات الحركية من خلال تنشيط مستقبلات البروتينات الحركية التي تقترن مع G-Protein. بعد تنشيط المستقبلات ينشط الـ G-protein إلى وحدتين (الفا وبيتا) حيث يتم تنشيط عدة مسارات حيوية مناعية (Vural *et al.*, 2010).

يعد المسار المناعي Toll-like receptors signaling pathway من أهم المسارات المناعية الذي تأثر بإصابة فيروس الحليمات البشرية حيث ازداد التعبير الجيني التابع لستة جينات من مجموع 25 من الجينات الكلية وهي (*TNF-α*, *IL-1B*, *IL-8*, *INF-α*, *MIG*, *CXCL11(I-TAC)*). يلاحظ من شكل 4-21 إن تأثير جميع هذه الجينات الستة جاءت في المرحلة النهائية من هذا المسار الذي يحتوي على المستقبلات البروتينات المناعية (TLRs) المسؤولة عن التعرف على الأحياء الممرضة وتولد الاستجابات المناعية الذاتية تجاهها وهي عبارة عن مستقبلات ترتبط بالغشاء الخلوي من الخلايا المناعية الذاتية مثل الخلايا البلعمية والخلايا الشجرية dendritic cells (Kumar *et al.*, 2013). تقوم الـ TLRs بالتعرف على الكائنات الممرضة ثم تقوم بتنشيط سريع للمناعة الذاتية من خلال إنتاج سايتوكينات التهابية أولية proinflammatory cytokines وكذلك زيادة التعبير الجيني لجزيئات تحفيزية مساعدة، وتصنف الـ TLRs إلى مجموعتين: مجموعة تحفز إنتاج السايتوكينات الالتهابية الأولية عبر التنشيط السريع لعامل التخر NF- $\kappa$ B والمجموعة الثانية ترتبط مع حث الإنترفيرون نوع بيتا IFN-Beta وكذلك حث الجينات المحفزة للإنترفيرون (Roberts *et al.*, 2010).



شكل 4-20: تأثير الجينات المناعية الإنتهاجية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحليمات البشرية في المسار Chemokine signaling Pathway .



شكل 4-21 : تأثير الجينات المناعية الإلتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحصيات البشرية

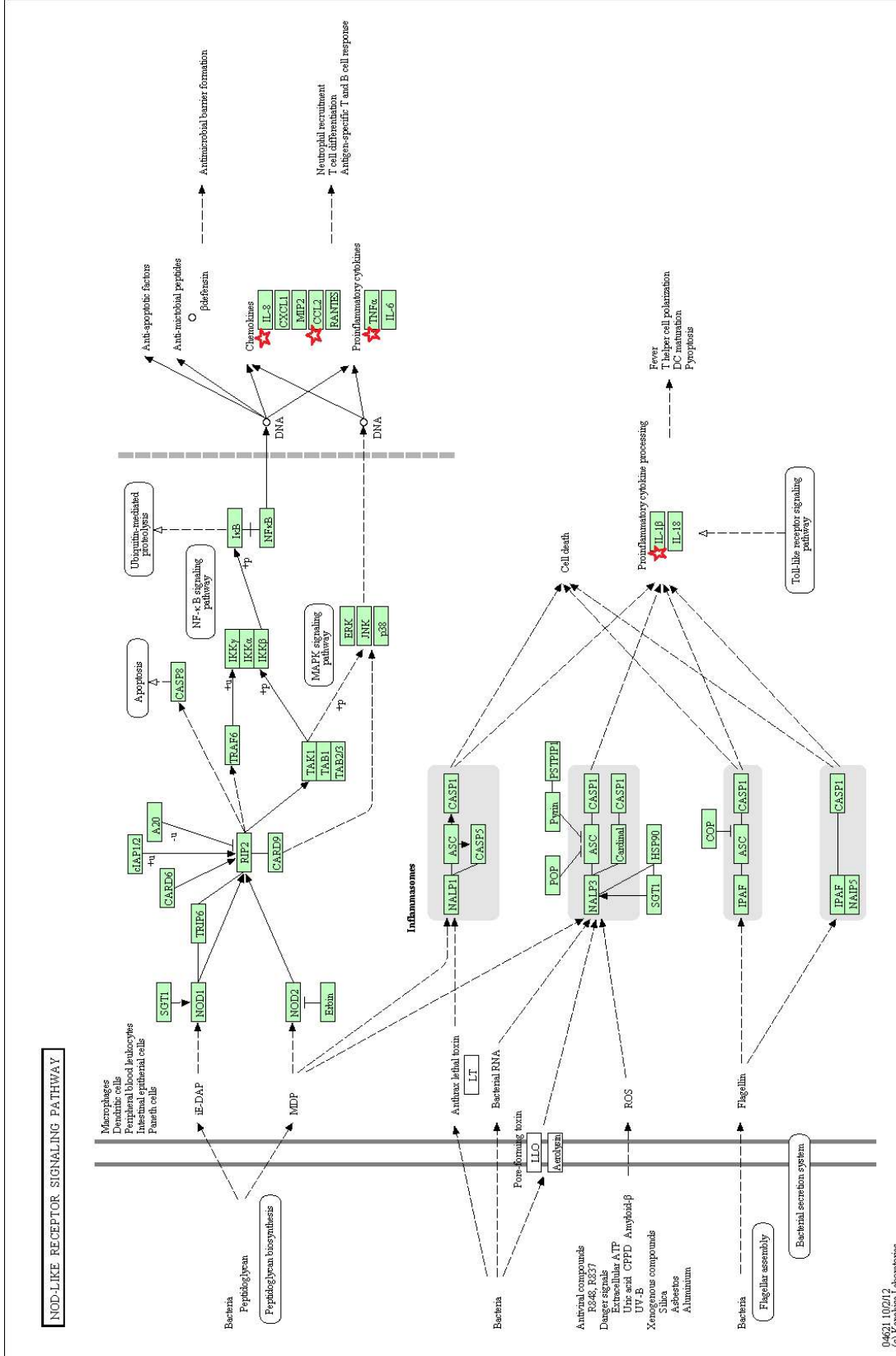
في المسار Toll-like receptors signaling pathway .

من ناحية أخرى أظهرت النتائج أن أربعة جينات أخرى من كل الجينات المدروسة كان لها تأثير في المسار المناعي من نوع NOD-like receptor signaling pathway كما موضح في شكل 4-22 , تتمثل في  $IL-1B$  ,  $TNF-\alpha$  ,  $CCL2$  ,  $IL-8$  , ويعد ال NOD-like receptor (NLR) من المستقبلات الخاصة المسؤولة عن تشخيص العديد من الممرضات pathogens وتوليد استجابات مناعية ذاتية. تضم هذه المستقبلات 20 نوعاً في اللبائن وتؤدي دوراً محورياً في تصنيف الوحدات الداخلة خلوية التابعة للكائنات الغازية ، ثم تحث على تنشيط عمليات مناعية مهمة مثل تنشيط عامل التنخر  $NF-\{kappa\}B$  والبروتين Map-Kinase وإنتاج الساييتوكينات المسؤولة عن الموت المبرمج (انتحار الخلية) apoptosis بعد الإصابة (Fritz et al ., 2006) .

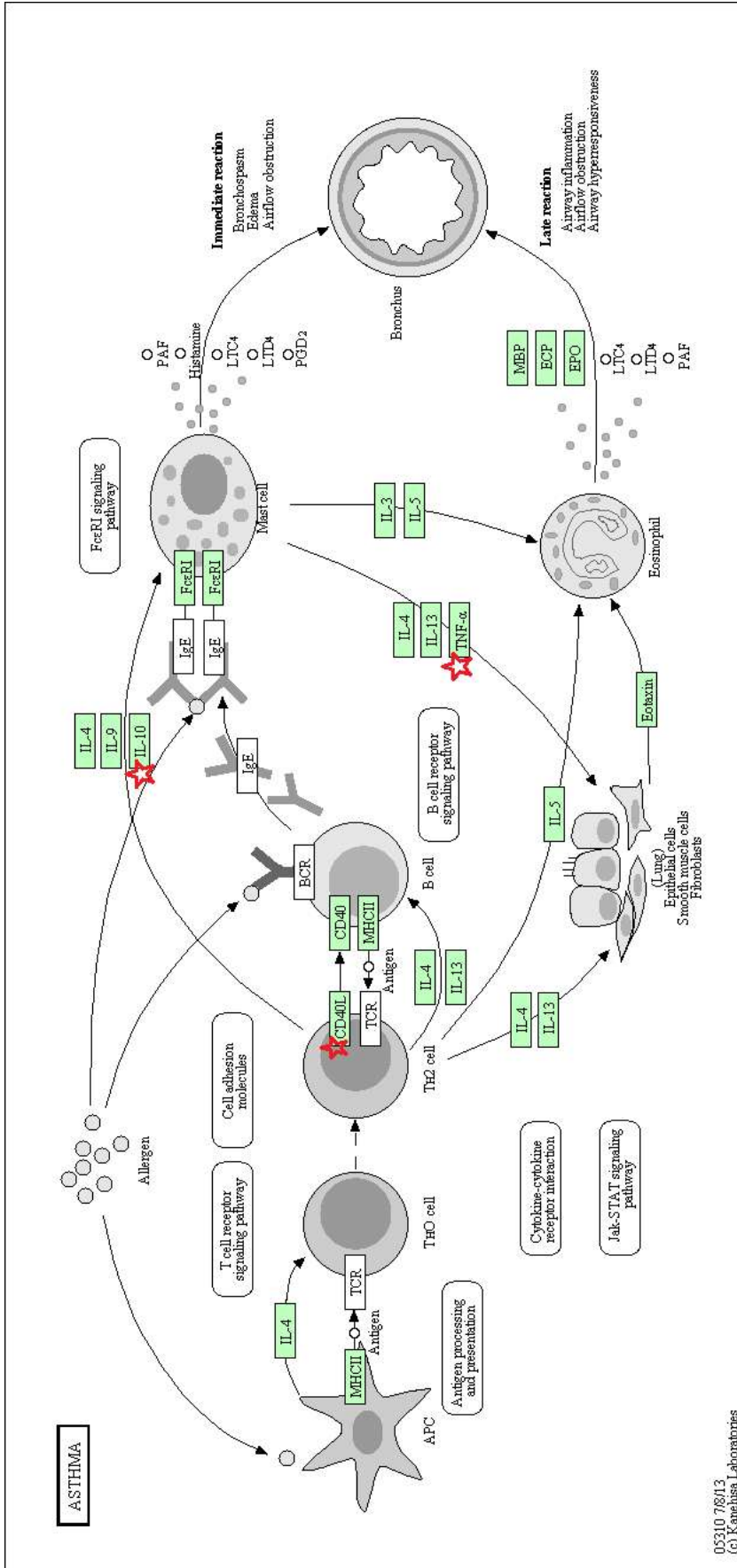
أظهرت النتائج أيضاً ارتباط الإصابة بفيروسات الحليمات البشرية مع حصول حالة الربو asthma عند المرضى ، ويظهر ذلك من خلال شكل 4-23 إذ يلاحظ تأثير الإصابة (زيادة في التعبير الجيني) بهذه الفيروسات على ثلاثة جينات التي تؤدي دوراً مهماً في مراحل هذا مسار وهي جينات  $TNF-\alpha$  ,  $IL-10$  ,  $CD10L$  . تعد هذه النتيجة مهمة جداً لوجود جدل كبير بين مختلف المراكز البحثية بالعالم حول مسببات الربو التي تعزى إلى مسببات كثيرة ومنها الفيروسات إذ أن البعض يعزو حصول الربو إلى أسباب فيروسية والبعض يرفض ذلك. وهذه الدراسة تؤكد وجود هذه العلاقة بين فيروسات الحليمات البشرية والربو للأسباب الآتية وهي أن الربو يحصل في الأطفال وفي الكبار، كما أن الربو يحصل بمسببات تصل إلى المجاري التنفسية وكذلك فيروسات الحليمات البشرية أيضاً تصل إلى الجهاز التنفسي لوجود أنواع خاصة منها تصيب الجهاز التنفسي. إن كل مسببات الربو التي يطلق عليها المحسسات allergens سواء كانت بكتريا أو فيروسات أو حبوب الطلع أو أية عوامل أخرى فإنها تواجه الخلايا المعرفة للمستضد (APC) antigen presenting cells التي تبطن المجاري التنفسية (Hammad et al ., 2003). بعد التعرف على هذه المسببات وتنشيط APC فإن الخلايا التائية المناعية غير المنشطة naive T cells تتمايز إلى خلايا مساعدة نوع TH2 cells التي بدورها تحفز الخلايا البائية B cells على إنتاج الكلوبولين المناعي IgE الذي يرتبط مع مستقبلاته الخاصة على الخلايا التي تبطن المجاري التنفسية mast cells و تسبب انسداداً للمجاري التنفسية (Iwabuchi et al., 2009).

وهذا الارتباط يحفز إطلاق مواد فعالة بايولوجيا مثل histamine و leukotrienes من خلال تحلل الحبيبات داخل هذه الخلايا (mast cells) وبالنتيجة تظهر أعراض الحساسية أو الربو. ومن ناحية أخرى فإن Mast cells عند تحلل حبيباتها تحرر عوامل جذب كيميائي chemotactic factors التي تسهم في استدعاء الخلايا الالتهابية خاصة الحمضة منها Eosinophils التي تتكاثر وتتمايز في النخاع

العظمي بتحفيز من الانترلوكين 5 (IL5) وتنشيط الخلايا الحمضة يسبب إطلاق حبيبات سامة وجذور  
أوكسجين حرة تقود إلى تحطيم الأنسجة وبالنتيجة تسبب التهابات مزمنة ( Qi et al ., 2011 ).



شكل 4 - 22: تأثير الجينات المناعية الإنتهاجية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفايروس الحصيات البشرية في المسار NOD-like receptor signaling pathway



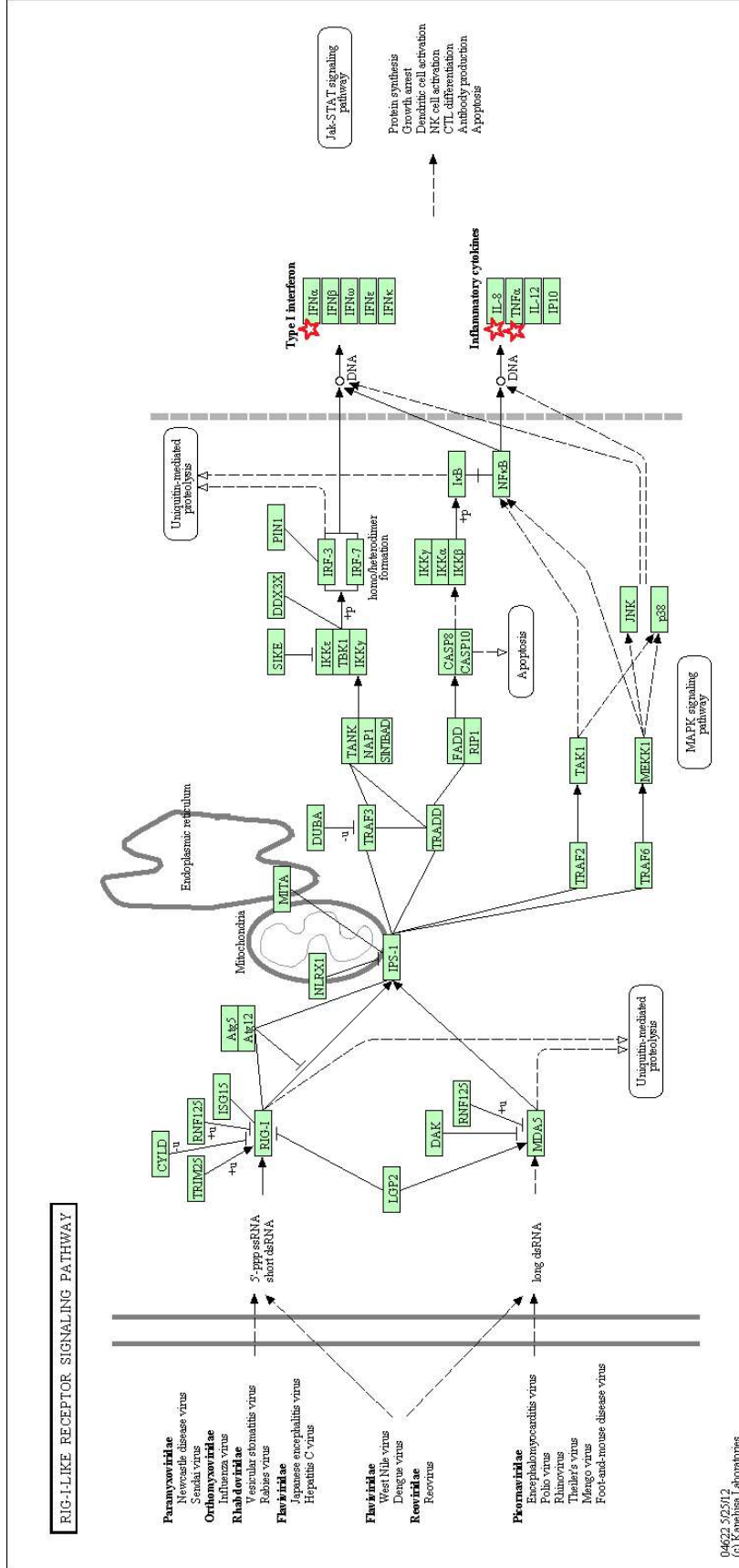
شكل 4- 23: تأثير الجينات المناعية الإتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحليمات البشرية في المسار

. Asthma signaling pathway

أظهرت النتائج أيضا وجود تأثير لفايروسات الحليمات البشرية في مسار Graft-versus-host disease pathway وهو مسار مناعي مهم وهذا التأثير كان من خلال زيادة التعبير في اثنين من الجينات مناعية  $TNF-\alpha$  ,  $IL-10$  لكن في مواقع مختلفة من المسار فقد ظهر التأثير في بداية المسار ونهاية المسار كما موضح في شكل 4-24 من مجموع 25 جيناً التهابياً ، يحصل التأثير في هذا المسار من خلال الإصابة التي تؤدي إلى تحطيم في الأنسجة المصابة وهذا يحدث إنتاج الساييتوكينات الإلتهابية مثل interleukin 1 (IL-1) و Tumor necrosis factor (TNF-alpha) , فضلاً عن إنتاج nitric oxide (NO) عن طريق الخلايا البلعمية الكبيرة وهذا يسبب بالنتيجة تحطيم المزيد من الأنسجة (Fontanella *et al.* , 2010) .

من أهم النتائج التي توصلنا إليها في هذه الدراسة هو تأثير الإصابة بفايروسات الحليمات البشرية في مسار Rig-1-like receptor signaling pathway من خلال حث زيادة في التعبير الجيني لجينين من الجينات التهابية  $IL-8$  ,  $INF-\alpha$  في المراحل الاخيرة من هذا المسار. ويلاحظ من شكل 4-25 أن تأثير هذه الجينات يكون في المراحل النهائية من هذا المسار. يتضمن هذا المسار مستقبلات مناعية خاصة للبحث عن الفايروسات وتوليد استجابة مناعة فطرية. وبعد الإصابة الفايروسية تظهر جزيئات من الحامض النووي داخل الخلية كنتيجة لتضاعف الفايروسات الغازية، ويتم تمييز هذه الجزيئات بمستقبلات خاصة تدعى Cytosolic RNA helicase termed RIG-1-like receptor (RLR) تتضمن هذه المستقبلات عدة أنواع من البروتينات أهمها RIG-1 التي تنتج في كل من الخلايا المناعية وغير المناعية. بعد تمييز هذه الجزيئات تقوم مستقبلات RLRs باستدعاء بروتينات خلوية تقوم بتنشيط المسار من خلال تحفيز إنتاج ( $INF-\alpha$ ) فضلاً عن أنواع أخرى من الساييتوكينات المهمة لإزالة الفايروسات (Schuurhof *et al.* , 2010).

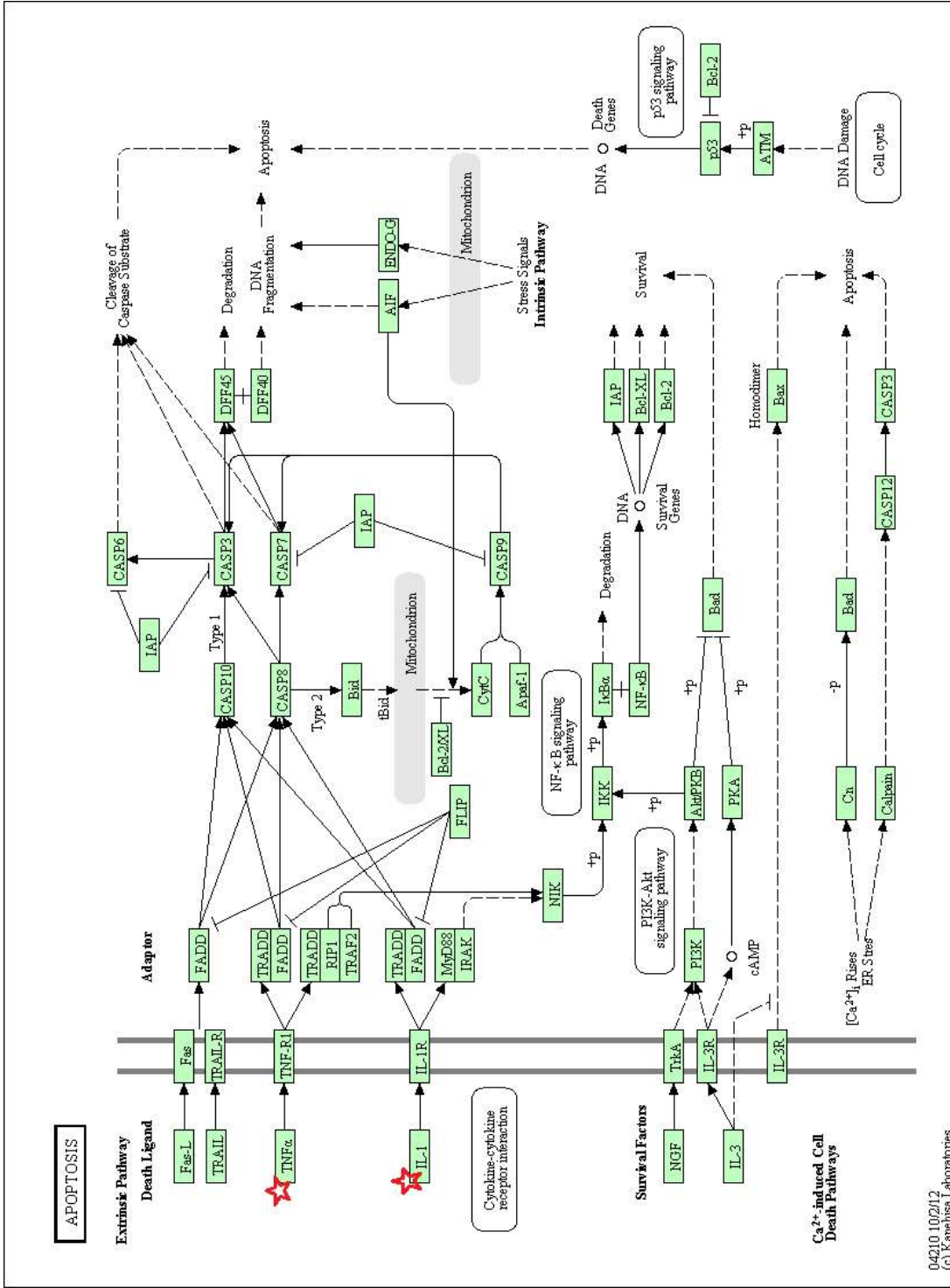




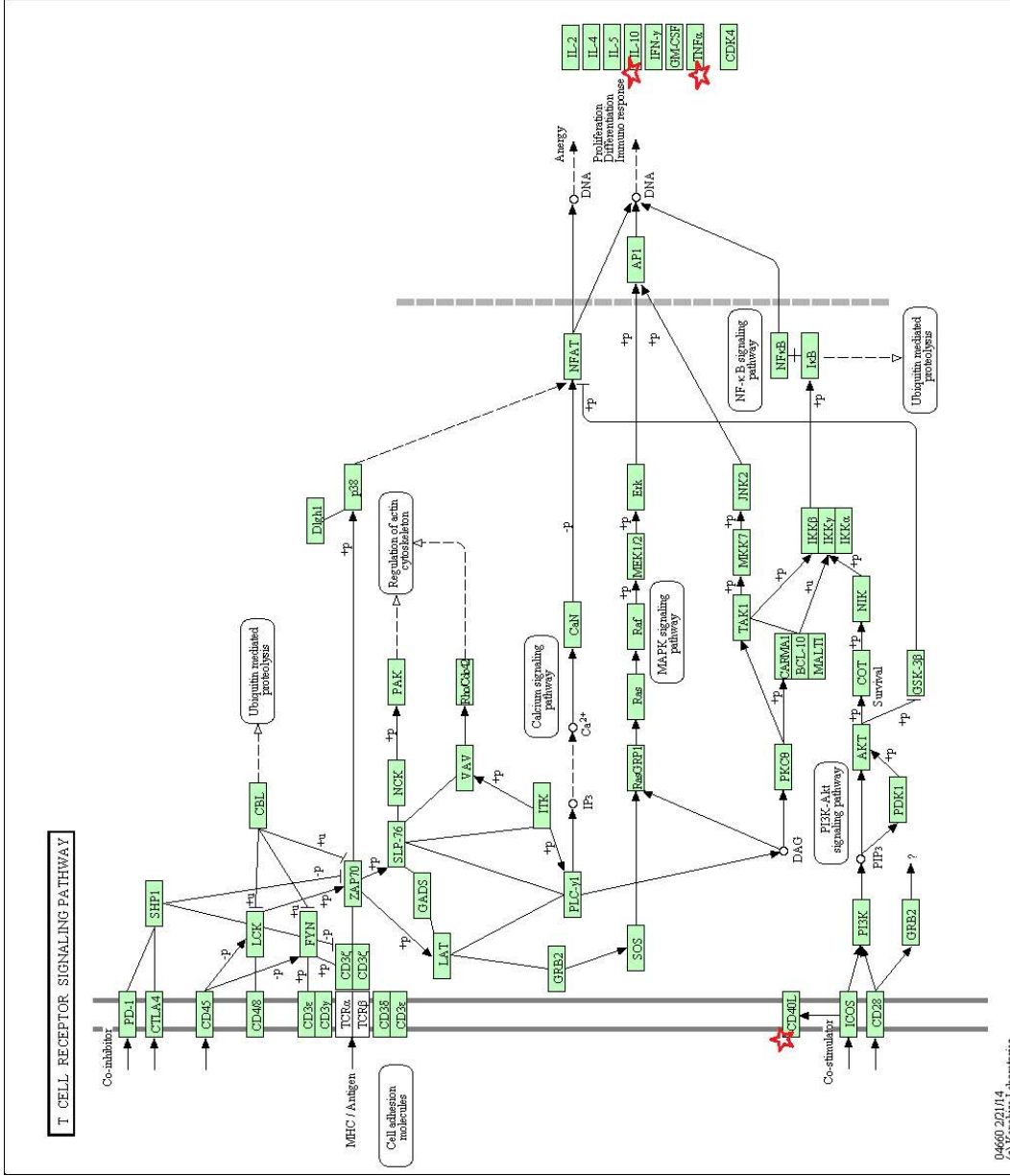
اشكل (4- 25): تأثير الجينات المناعية الإنتهاجية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحليمات البشرية في المسار signaling pathway Rig-1-like .

يعد مسار موت الخلية المبرمج الذي يدعى أيضاً مسار انتحار الخلية Apoptosis pathway من المسارات المناعية الالتهابية المهمة بعد الإصابة الفايروسية ، إذ أظهرت النتائج تأثير الإصابة بفايروسات الحليمات البشرية في هذا المسار من خلال حث زيادة في التعبير الجيني لجينين من الجينات الالتهابية المناعية  $TNF-\alpha$  ,  $IL-10$  كما موضح في شكل 4-26 بعد الإصابة الفايروسية يتحفز هذا المسار من خلال تنشيط مسار من الإشارة المناعية المتسلسلة يتوسطها تنشيط البروتين كاسبس نوع 8 (caspase-8 activation) , هذا البروتين بدوره يحفز الكاسبس نوع 3 وكذلك يحفز إطلاق الساييتوكروم نوع C من المايوكونديريا. الكاسبس نوع 3 يسبب تحطيم البروتينات الخلوية المهمة لبقاء الخلية (Jani *et al.* , 2009). أما الساييتوكروم نوع C فإنه يحث بروتينات أخرى خاصة الكاسبس نوع 9 الذي بدوره يحث تنشيط الكاسبس 3 وبالنتيجة يتم تحطيم DNA الخلية وهذا يؤدي إلى موت الخلية أو انتحارها ( Xu *et al.* , 2009; Yang *et al.*, 2013 ) .

تبين من النتائج في هذه الدراسة أن فايروسات الحليمات البشرية HPVs تؤثر المسار المناعي الالتهابي T-cell receptor signaling pathway من خلال التأثير في ثلاثة جينات مناعية  $TNF-A$  ,  $IL-10$  ,  $CD40LG$  من مجموع 25 جيناً مناعياً إذ إن الإصابة سببت زيادة في التعبير الجيني لهذه الجينات كما موضح في الشكل (4-27). تعد عملية تنشيط الخلايا اللمفية حدثاً رئيساً لتوليد الاستجابة المناعية ذات الكفاءة العالية في الجهاز المناعي, وهذا التنشيط يستلزم وجود المستقبل الخاص للخلايا اللمفية T-cell receptor (TCR) اضافة إلى تواجد جزيئات تساعد على هذا التنشيط مثل جزيئات CD28 (Li *et al.* , 2012) . ترتبط هذه الجزيئات مع المايكروبات الغازية بتوسط جزيئات major histocompatibility complex molecules (MHC) وبالنتيجة تثار سلسلة من المسارات المناعية تتضمن : توليد بروتينات tyrosine kinases و phosphatases و GTP-binding proteins و adaptor proteins وكلها تقوم بتنظيم وظائف نوعية ومتخصصة تؤدي بالنتيجة إلى زيادة توليد الخلايا التائية T-cell وانقسامها وإنتاج الساييتوكينات الخاصة للعمل ضمن هذا المسار فضلاً عن تمايز الخلايا التائية إلى خلايا مؤثرة أثناء الحالات الالتهابية (Wu *et al.* , 2011).



شكل 4-26 : تأثير الجينات المناعية الإنتهاية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحصيات البشرية في المسار Apoptosis pathway .



شكل 4-27 : تأثير الجينات المناعية الإلتهابية التي عانت من زيادة في التعبير الجيني بسبب الإصابة بفيروس الحليمات البشرية في المسار T-cell receptor signaling pathway .

الاستنتاجات والتوصيات

**Conclusions &  
Recommendations**

## 5- الاستنتاجات والتوصيات

## Conclusions الاستنتاجات

نستنتج من محصلة هذه الدراسة ما يأتي:

1. إن الإصابة بفايروس الحليمات البشرية سببت تغيرات في التعبير الجيني المناعي.
2. الزيادة في التعبير الجيني المناعي هي النمط السائد بعد الإصابة بفايروسات الحليمات البشرية و إن العلاقة المناعية بين الفايروسات الحليمية البشرية والخلية المصابة هي علاقة متبادلة بدليل زيادة التعبير الجيني ل 25 جيناً مناعياً في حين نقصان التعبير الجيني (التأثير الفايروسي) كان على ستة جينات فقط .
3. نمط التعبير الجيني العام بعد الإصابة بفايروسات الحليمات البشرية هو 25:6 (25 جيناً ذات زيادة في التعبير الجيني و ستة جينات ذات نقصان في التعبير الجيني).
4. الجينات الزائدة في تعبيرها الجيني تؤثر في المسارات المناعية الرئيسية في الخلية المضيفة بمدى يتراوح بين جينين الى ثمانية عشر جيناً نتيجة لزيادة التعبير الجيني وإن هذا التأثير كان في تسعة مسارات مناعية التهابية رئيسية

## التوصيات Recommendations

1. إجراء بحوث تتضمن دراسة تأثير فيروسات الحليمات البشرية في الجهاز التنفسي والتأكيد على دور هذه الفيروسات في توليد حالة الربو Asthma في الإنسان.
2. الربط بين الجانب المعلوماتي والجانب العملي معاً عند دراسة الأنواع المختلف من مجاميع فيروسات الحليمات البشرية.
3. دراسة مجاميع الفايروسات المختلفة (الحميدة خفيفة التأثير والحميدة كبيرة التأثير والسرطانية) للمقارنة بينهما والحصول على الاختلافات في نمط التعبير الجيني بين هذه المجاميع
4. إجراء بحوث مستفيضة تتضمن بيان تأثير كل جين من هذه الجينات في المواقع المحددة في هذه الدراسة.
5. إجراء دراسات متقدمة تعتمد على نمط التعبير الجيني العام لهذه الفايروسات بناءً على نتائج في هذه الدراسة من خلال اعتماد الجينات التي لها تأثير كبير (زادت بتعبيرها الجيني بشكل كبير) في فايروسات الحليمات البشرية مع دراسة البروتينات الناتجة من هذه الجينات .
6. إجراء دراسات حول الجينات التي عانت من نقصان في التعبير الجيني (بتأثير الفايروسات) وبيان مدى إمكانية تعويض هذه البروتينات للمرضى المصابين بأنواع الحليمات السرطانية وتحديد مدى الإفادة منها في القضاء على الفايروسات.
7. إجراء دراسة حول دور Bioinformatic في التطبيقات الطبية والصيدلانية ونتاج الأدوية .

المصادر

**References**

## References

- Abbas, Z., and Moatter, T.(2003). Interleukin (IL) 1beta and IL-10 gene polymorphism in chronic hepatitis C patients with normal or elevated alanine aminotransferase levels. *J Pak Med Assoc.*,53(2):59-62.
- Abd-Elsalam .K. A., (2003). Web-based bioinformatics resources for protein and nucleic acids sequence alignment . *Afr J Biotechnol.*, 2 (12): 714-718.
- Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatics tools and guideline for PCR primer design . *Afr J Biotechnol.* ,2(5): 91– 95.
- Abdul Hamid , N., Brown, C. and Gaston, K., (2009). The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins . *Cell Mol Life Sci.* 66(10) :1700 – 1717.
- Al Ghazal , A. T.,( 2010). Effect of viral respiratory infection by influenza ,A. virus ,parainfluenza and adenovirus on immune inflammatory gene expression / inhibition of human white blood cell, Ph.D .thesis University of Jordan ., *Jordan* ,pp.1-214.
- AL Ghazal ,A. T.(2012). Determination of the Changes in Human Leukocytes inflammatory genes expression after infection with human Papillomavirus. *Raf J Sci.*, 23(4) : 33-50.
- Alazawi ,W., Pett M., Arch, B., Scott ,L., Freeman ,T., Stanley, M. A., and Coleman, N .(2002). Changes in Cervical Keratinocyte Gene Expression Associated with Integration of Human Papillomavirus 16 . *Cancer Res.*,62(23) : 6959 –6965.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roperts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*, (4<sup>th</sup> ed). United State of America, Garland Science, Tylor and Francis Group.
- Aubin F., Martinc M., Puzenat E., Bertrandc N. M., Segondy M., Riethmullera D., Wendling D.(2011). Genital human papillomavirus infection in patients with autoimmune inflammatory diseases. *Joint Bone Spine* ,78 ,460–465.
- Azar, K.K., Tani, M., Yasuda , H., Sakai, A., Inoue, M., Sasagawa, T.(2004). Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol* ., 35(11): 1376–1384.Abstact.

- Baehrecke, E. H., Dang, N., Babaria, K. and Shneiderman. (2004). Visualization and analysis of microarray and gene ontology data with tree maps. *BMC Bioinformatics*. 5:84.
- Bais ,A.G., Beckmann, I., Lindemans, J., Ewing ,P .C., Meijer, C. J. L. M., Snijders ,P. J. F ., Helmerhorst ,T. J .M .(2005). A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J Clin Pathol* ; 58(10):1096–1100.
- Baker ,R., Dauner, J. G., Rodriguez, A.C., Williams,M. C., Kemp, T. J., Hildesheimd, A., and Pinto, L. A.(2011). Increased plasma levels of adipokines and inflammatory markers in older women with persistent HPV infection . *Cytokine.*, 53(3): 282–285.
- Baldi,p. and Brunak. , S.(2001). Bioinformatics, The Machine Learning Approach A Bradford Book ,The MIT Press ,Cambridge ,England ,P ,1-4 .
- Bauknecht ,T. And Shi, Y.(1998). Overexpression of C/EBP $\beta$  represses human papillomavirus type 18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein. *J Virol* .,72, ( 3: 2113–2124.
- Baumgarth, N., Szubin ,R., Dolganov, G. M., Watnik, M. R., Greenspan, D., Costa, M. D., Palefsky, J.M., Jordan ,R., Roederer, M., and Greenspan, J.S..(2004). Highly Tissue Substructure-Specific Effects of Human Papilloma Virus in Mucosa of HIV-Infected Patients Revealed by Laser-Dissection Microscopy-Assisted Gene Expression Profiling. *Am J Pathol.*, 165( 3) :707-18.
- Baxevanis, A. D., Ouellette, B. F. F.,(2001) . Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Protein. 2<sup>nd</sup>ed John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Bermúdez-Morales,V.H, Peralta-Zaragoza,O. Alcocer-González,J.M.,Moreno ,J. Madrid-Marina, V.(2011). IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. *Mol Med Rep* .,4(2): 369-375.
- Boccardo, E., Baldi ,C. V., Carvalho ,A.F., Rabachini T., Torres ,C., Barreta , L. A., Brentani ,H. and Villa L.L.(2010) . Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor-alpha .*Carcinogenesis* ., 31(3) :521–531.

- Bonagura ,V. R , DeVoti , J.A ., Rosenthal ,D. W ., Wu, R., Abramson , A. L., Steinberg ,B. M. (2008). Immune dysregulation and tumor-associated gene changes in recurrent respiratory papillomatosis: A paired microarray analysis . *Mol Med.*, 14 ( 9 -1 0 ) 608 - 617.
- Bonagura, V. R. , Hatam, L.J., Rosenthal ,D. W., DeVoti ,J.A., Lam, F., Steinberg, B.M., and Abramson, A. L. (2010). Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11. *APMIS*. 118(6-7): 455–470.
- Bourne, P. E.,(2009). The Gene ontology’s reference genome project: A unified framework for functional annotation across species . *PLoS Comput Biol.*, 5(7).
- Buchan, N.,S., Rajpal ,D.,K., Webster, Y., Alatorre, C., Gudivada, R.,C, Zheng, C., Sanseau, P., Koehler ,J.(2011) The role of translational bioinformatics in drug discovery ., *Drug Discov Today*, 16(9-10):426-434.
- Burd, E. M., (2003) . Human papilloma virus and cervical cancer . *Clin Microbiol Rev* , 16,( 1) :1-17.
- Call, D.,(2001). DNA microarrays – their mode of action and possible applications in molecular diagnostics . *Veterinary Sciences Tomorrow* . 3:1-9.
- Campeau, P., Rafei, M., Boivin , M., Sun, Y., Grabowski, G., Galipeau, J. (2009). Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome . *Blood*, 114(15):3181-3190.
- Cao, Y., Zhao ,J., Lei, Z., Shen ,S., Liu, C., Li, D., Liu ,J., Shen, G.X., Zhang, G.M., Feng, Z.H., Huang, B.(2008). Local accumulation of FOXP3+ regulatory T cells: Evidence for an immune evasion mechanism in patients with large condylomata acuminata . *J Immunol.*, 180 (11) :7681-7686.
- Castrilli, G., Tatone, D., Diodoro, M.G., Rosini ,S., Piantelli, M. and Musiani, P .(1997). Interleukin I *ac* and interleukin 6 promote the in vitro growth of both normal and neoplastic human cervical epithelial cells . *Br J Cancer* . , 75 (6) :855-859 .
- Chang ,Y. E. And Laimins, L. A.(2000). Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and stat-1 as major transcriptional targets of human papilloma virus type 31. *J Virol*, 74( 9): 4174–4182.

- Chang, Y., Yu C., Lai ,L., Tsao, C., Ho, K., Yang,S., Lee ,H., Cheng, Y., Wu, T., and Shiau, M.(2010). Up-regulation of interleukin-17 expression by human papillomavirus type 16 E6 in non-small cell lung cancer . *Cancer* 116 (20) :4800–4809.
- Chen, Y. , Al- Gelfond, J., Mc Manus L.M. and Shirman, P. K., (2009). Reproducibility of quantitative RT-PCR array in mRNA expression profiling and comparison with microarray analysis . *BMC Genomic* , 10:407.
- Chevalier, M.F., Petitjean.,G., Dunyach, R. C, Didier C, Girard, P.M., Manea, M.E., Campa, P., Meyer, L., Rouzioux, C., Lavigne, J.P., Barré, F., Scott, D., Weiss, L. (2013).The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation . *Plos Pathog.*, 9(6).
- Chittur ,S., Parr, B.,Marcovici, G.(2009). Inhibition of Inflammatory Gene Expression in keratinocytes using a composition evid based complement alternat . *Medical European Journal* , *PMID* , 19692448.
- Christensen ,N.,D.(2016). HPV disease transmission protection and control. *Microb Cell.*, 3(9):476-490.
- Chuang, C.Y., Sung ,W.W., Wang,L., Lin, W.L., Yeh, K.T., Su, M.C., Hsin, C.H., Lee, S.Y., Wu, B.C., Cheng, Y.W., Lee, H.(2012). Differential impact of IL-10 expression on survival and relapse between HPV16-positive and - negative oral squamous cell carcinomas. *Plos One*, 7, (10).
- Clewley, J.( 2004). A role of arrays in clinical virology : fact or fiction, *J Clin Virol* ,29(1) :2-12 .
- Cohen, J., (2004). Bioinformatics—An introduction for computer scientists. *ACM Comput. Surv.*, 36 (2): 122–158.
- Counsell , D., (2003). A review of bioinformatics education in the UK , *Brief. Bioinform.* ,4 ( 1) : 7–21.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker ,T. R., Bernard ,H.U. and zur Hausen, H., (2004). Classification of papilloma viruses. *Virology*, 324(1): 7–27.

- Dell'Agnola ,C.,and Biragyn ,A. (2008). Clinical utilization of chemokines to combat cancer: the double edged sword. *Expert Rev Vaccines* . , 6(2): 267–283 .
- DeVoti ,J. A. , Rosenthal D.W ., Wu, R., Abramson ,A. L., Steinberg, B. M, and Bonagura, V. R.(2008). Immune dysregulation and tumor-associated gene changes in recurrent respiratory papillomatosis: a paired microarray analysis. *Mol Med* 14(9 -10) 608 - 617.
- Dillon, D., and Runstadler, J. (2010). Mx gene diversity and influenza association among five wild dabbling duck species (*Anas* spp.) in Alaska. *Infect Genet Evol.* ,10(7):1085-93.
- Echchannaoui, H., Bianchi, M., Baud ,D., Bobst M., Stehle J.C. and Denise, Nardelli-Haefliger (2008) Intravaginal immunization of mice with recombinant *salmonella enteric* serovar typhimurium expressing human papilloma virus type 16 antigens as a potential route of vaccination against cervical cancer. *Infect Immun.*, 76(5):1940-1951.
- Eqesten ,A., Eliasson, M., Olin, A., Erjefält, J.S., Bjartell, A., Sangfelt, P., Carlson, M.( 2007) .The proinflammatory CXC-chemokines GRO-alpha/CXCL1 and MIG/CXCL9 are concomitantly expressed in ulcerative colitis and decrease during treatment with topical corticosteroids. *Int J Colorectal Dis.* ,22(12):1421-1427.
- Feghali, C.A .,Wright ,T,M..(1997). Cytokines in acute and chronic inflammation . *Front Biosci.*, 2 : 12-26.
- Fernandes, A.P., Gonçalves, M.A., Duarte ,G., Cunha, F.Q., Simões, R.T., Donadi ,E.A.(2005). HPV16, HPV18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. *Viol J* 334 (2) 294–298.
- Fey, M. F.,(2011). VI. DNA microarray technology. Principles and application to the analysis of malignant tumours (with special emphasis on lymphoma). *Ann. Oncol.*. 22 (4): 44–46.
- Fontanella, M., Rainero, I., Gallone ,S., Rubino, E., Fornaro, R., Fenoglio, P., Valfrè, W., Vaula, G., Benevello, C., Ducati ,A., Pinessi ,L. (2010). Interleukin-1 cluster gene polymorphisms and aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* ,66(6):1058-62.
- Fritz ,J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., Girardin ,S.E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol.*7(12):1250-7.

- García-Piñeres, A.J., Hildesheim ,A., Dodd ,L., Kemp, T.J., Yang ,J., Fullmer, B., Harro, C., Lowy, D.R., Lempicki, R.A., Pinto, L.A. (2009) .Gene expression patterns induced by HPV-16 L1 virus-like particles in leukocytes from vaccine recipients. *J Immunol.* 182(3);1706-1729.
- Gius ,D., Funk, M. C., Chuang, E.Y., Feng, S., Huettner, P. C., Nguyen, L., Bradbury ,C. M., Mishra ,M., Gao ,S., Buttin, B. M., Cohn ,D. E., Powell ,M. A., Horowitz ,N. S., Whitcomb, B.P., and Rader, J.S.(2007) Profiling microdissected epithelium and stroma to model genomic signatures for cervical carcinogenesis accommodating for covariates. *Cancer Res* ; 67(15) : 7113-7123.
- Gius, D., Margo, C. Funk, Eric, Y. Chuang .(2007) Accommodating for covariates genomic signatures for cervical carcinogenesis profiling . *Cancer Res.*,67 : 7113-7123.
- Gómez, D.T. , Santos ,J. L., ( 2007).Human papillomavirus infection and cervical cancer : pathogenesis and epidermology . Communication current Research And education topics and trends in applied microbiology. ,vol. 2 (680-688).
- Gravitt, P. E. , Hildesheim, A. , Herrero, R. ,Schiffman, M. , Sherman, M. E. , Bratti, M. C. , Rodriguez, A. C. , Morera, L. A. , Cardenas, F. , Bowman , F. P. ,Shah ,K.V. , Nowick , P. A. C. .(2003). Correlates of IL-10 and IL-12 concentrations in Cervical Secretions . *J Clin Immunol.*, 23(3) : 175-183.
- Grissell ,T., Heather, P., Darren, R., Michael, J. Boyle, M., Peter, D., Bruce ,F. and Peter ,G. (2005). Interleukin-10 gene expression in acute virus-induced asthma, *Am J Respir Crit Care Med.*, 172(4), 433-439.
- Guan, E., Wang, J. Roderiquez, G, Norcross ,M. (2002). Natural truncation of the chemokine MIP-1beta /CCL4 affects receptor specificity but not anti-HIV-1 activity. *J Biol Chem*, 277 (35). 32348-52.
- Guess, J.C. and McCance, D. J. (2005). Decreased migration of langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papilloma virus Type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3\_ production . *J Virol.*, 79( 23): 14852–14862.

- Gyöngyös, E., Szalmas, A., Ferenczi A., Kónya J., Gergely L., and Veress, G. (2012). Effect of human papillomavirus HPV type 16 oncoprotein on expression of involucrin in human keratinocyte. *Viol J*, 9:36.
- Hammad, H., Smits, H.H., Ratajczak, C., Nithianathan, A., Wierenga, E.A., Stewart, G.A., Jacquet, A., Tonnel, A.B., Pestel, J. (2003). Monocyte-derived dendritic cells exposed to Der p 1 allergen enhance the recruitment of Th2 cells: major involvement of the chemokines TARC/CCL17 and MDC/CCL22. *Eur Cytokine Netw*. 14(4):219-28.
- Hatam, L.J., Devoti, J.A., Rosenthal, D.W., Lam, F., Abramson, A.L., Steinberg, B.M., Bonagura, V.R. (2012). Immune Suppression in Premalignant Respiratory Papillomas: Enriched Functional CD4+Foxp3+ Regulatory T-cells And PD-1/PD-L1/L2 Expression. *Clin. Cancer Res.*, 18 (7) :1925–1935.
- Hayden F. G., and Palese P, (2002). Influenza virus, *Clin. Virol.* (2<sup>nd</sup> ed). Washington (DC). ASM Press.
- Hennig, B.J., Frodsham, A.J., Hellier, S., Knapp, S., Yee, L.J., Wright, M., Zhang, L., Thomas, H.C., Thursz, M., Hill, A.V. (2007). Influence of IL-10RA and IL-22 polymorphisms on outcome of hepatitis C virus infection. *Liver Int.*, 27(8):1134-43.
- Hintzen, C., Haan, C., Tuckermann, J.P., Heinrich, P.C., Hermanns, H.M. (2008). Oncostatin M-induced and constitutive activation of the JAK2/STAT5/CIS pathway suppresses CCL1, but not CCL7 and CCL8, chemokine expression. *J Immunol.*, 181(10):7341-9.
- Hira, E., One, T., Dhar, D.K., EL-Assal, O.N., Hishikawa, Y., Yamanoi, A., Nagasue, N. (2005). Over expression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer.*, 103 (3) 588-598.
- Huang, D., Sherman, B., Limpicki, R. (2009). Systematic and integrative analysis of large genes lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.*, 4(1) :44-57.
- Iwabuchi, N., Takahashi, N., Xiao, J.Z., Yonezawa, S., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Hachimura, S. (2009). Suppressive effects of *Bifidobacterium longum* on the production of Th2-attracting chemokines induced with T cell-antigen-presenting cell interactions. *Immunol Med Microbiol.*, 55(3):324-34.

- Jani, T.S., Gobejishvili, L., Hote, P.T., Barve, A.S., Joshi-Barve, S., Kharebava, G., Suttles, J., Chen, T., McClain, C.J., Barve, S.(2009) .Inhibition of methionine adenosyltransferase II induces FasL expression, Fas-DISC formation and caspase-8-dependent apoptotic death in T leukemic cells.*Cell Res.* ;19(3):358-69.
- Joshi, M., Deshpande, J.D.(2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application ., *IJBR* 1 (5) :81-97 .
- Kadish, A.S., Ho ,G.Y., Burk, R.D., Wang, Y., Romney, S.L., Ledwidge, R., Angeletti, R.H.(1997). Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) Type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J Natl. Cancer Inst.*, 89,(17): 1285-1293.
- Kanodia ,S., Fahey, L. M. and Kast, W. M. (2007). Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response . *Curr. Cancer Drug Targets.*,7 (1): 79-89.
- Karim R., Meyers C., Backendorf C., Ludigs K., Offringa R., van Ommen, G. B., Melie C. J. M., van der Burg, S.H., Boer J.M. (2011). Human papillomavirus deregulates the response of a cellular network comprising of chemotactic and proinflammatory genes. *Plos One*, 6 ( 3).
- Kawashiri, .S.Y., Kawakami. A., Iwamoto,N,. Fujikawa, K., Aramaki ,T., Tamai, M., Arima, K., Kamachi, M., Yamasaki, S., Nakamura, H., Tsurumoto, T., Kono, M., Shindo ,H., Ida, H., Origuchi, T., Eguchi, K. (2009).Proinflammatory cytokines synergistically enhance the production of chemokine ligand 20 (CCL20) from rheumatoid fibroblast-like synovial cells in vitro and serum CCL20 is reduced *in vivo* by biologic disease-modifying antirheumatic drugs. *J Rheumatol.*36(11):2397-402.
- Kazi, J.U., Ronnstrand ,L.(2013) .Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) associates with FLT3 and negatively regulates downstream signaling. *Mol Oncol.*;7(3):693-703.
- Keer ,S., Luisa ,T., and Dennis, W. (2008). A detrimental role for IL-10 During host Immune responses to influenza virus infection, *FASEB J*, 22: 857.
- Kelly, J., (2007). Understanding the immune system how it works . Niaid Science Education , NIH Publication ,U.S.
- Kemp, T. J., Hildesheim, A., Piñeres ,A. G ., Williams ,M. C., Shearer ,G.M., Rodriguez, A. C. ., Schiffman, M., Burk, R., Freer ,E., Bonilla ,J., Herrero,

- R., and Pinto ,L. A.(2010). Elevated systemic levels of inflammatory cytokines in older women with persistent cervical HPV infection. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*; 19(8): 1954–1959.
- Kim S, Han S, Azam T, Yoon D, Dinarello C. (2005). Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF alpha, *Immunity*, 22 (1). 131-42.
- Kindt, N., Lechien, J., Decaestecker, C., Rodriguez, A., Chantrain ,G., Rimmelink, M., Laurent, G., Gabius ,H. And Saussez, S.(2012). Expression of macrophage migration-inhibitory factor is correlated with progression in oral cavity carcinomas. *Anticancer Res.* 32 (10) : 4499-4506.
- Kotenko ,S., Gallagher ,G., Baurin ,V., Lewis-Antes ,A., Shen, M, Shah ,N., Langer ,J., Sheikh, F., Dickensheets ,H., and Donnelly,R., (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex, *Nat. Immunol.*, 4(1), 69-75.
- Kreth, S., Heyn, J., Grau, S., Kretschmar ,H., A., Egensperger, R.,Kreth F.W.(2010). Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in human glioma. *Neuro-Oncology* 12(6):570–579 .
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák ,J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback ,R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* . 27(2-3):95-125. Abstact.
- Kukimoto, I., Takeuchi, T., Kanda ,T. (2006). CCAAT/enhancer binding protein h binds to and activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16. *Virology* .,346(1): 98 – 107.
- Kulesh, D., Clive, D., Zarlenga, D., Greene, J., (1987) . Identification of interferon-modulated proliferation – related cDNA sequences . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84(23): 8453- 8457.
- Kumar, M.M., Adurthi, S., Ramachandran ,S., Mukherjee, G., Joy, O., Krishnamurthy, H., Krishna, S., Bafna, U.D., Uma, D.K., Jayshree, R.S.(2013) .Toll-like receptors 7, 8, and 9 expression and function in primary human cervical cancer Langerhans cells: evidence of anergy. *Int J Gynecol Cancer* . ;23(1):184-92.

- Kwan, T., Benovoy, D., Dias, C., Gurd, S., Provencher, C., Beaulieu, P., Hudson, T.J., Sladek, R., Majewski, J. (2008). Genomic – wide analysis of transcript isoform variation in humans. *Nat. Genet.*, 40 (2):225 – 231 .
- Lau, Y.L. and Peiris, J.S. (2009). Association of cytokine and chemokine gene polymorphisms with severe acute respiratory syndrome. *Hong Kong Med J., Suppl 2*:43-6 .
- Lee, D. W., Kim, Y. T., Kim, S. W., Kim, S.H., Kim, J.H., Kang, M.H., Hwang, J. H. and Lim, J. b. (2009). Expression of Interleukin-5 and tumor necrosis factor alpha in cervical carcinoma. *Clin. Vaccine Immunol.*, 16( 6): 959–961.
- Lee, J.Y., Lee, H.J., Lee, E.J., Jang, S.H., Kim, H., Yoon, J.H., Chung, K.C. (2009). Down syndrome candidate region-1 protein interacts with Tollip and positively modulates interleukin-1 receptor-mediated signaling . *Biochim Biophys acta.*, 1790 (12) :1673-80.
- Li, B., Liu, S., Niu, Y., Fang, S., Wu, X., Yu, Z., Chen, S., Yang, L., Li, Y. (2012). Altered expression of the TCR signaling related genes CD3 and FcεRIγ in patients with aplastic anemia. *J Hematol Oncol.* 8;5:6.
- Li, H., Wang, X., Geng, J., Zhao, X. (2015). Clinical study of styping detection of human papillomavirus (HPV) infection with microarray from paraffinembedded specimens of cervical cancer and precursor lesions. *J Nanosci Nanotechnol .*, 15(9):6423-9428.
- Lo, M.C., Yip, T.C., Ngan, K.C., Cheng, W.W., Law, C.K., Chan, P.S., Chan, K.C., Wong, C.K., Wong, R.N., Lo, K.W., Ng, W.T., Lee, W.M., Tsao, S.W., Kwong, L.W., Lung, M.L., Mak, N.K. (2013). Role of MIF/CXCL8/CXCR2 signaling in the growth of nasopharyngeal carcinoma tumor spheres. *Cancer Lett.*, 335(1):81-92.
- Luscombe, N. M., Greenbaum, D., Gerstein, M. (2001). What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field, *Method Inform Med.*, 40(4): 346–58.
- Macgregor, P. F. and Squire, J.A. (2002). Application of microarrays to the analysis of gene expression in cancer. *Clin. Chem.*, 48 (8) :1170–1177 .
- Mariani, L., Venuti, A. (2010). HPV vaccine: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future . *J. Transl. Med.*, 8:105.
- Marks, M. A., Gravitt, P. E., Burk, R. D., Studentsov, Y., Farzadegan, H., and Klein, S. L. (2010). Progesterone and 17β-Estradiol Enhance Regulatory Responses to Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles in

- Peripheral Blood Mononuclear Cells from Healthy Women. *Clin. Vaccine Immunol.*, 17( 4) : 609–617.
- Martinez ,I.(2007). Identification of differentially expressed genes in HPV associated cancers using gene expression tissue ,and micro RNA micro array . Ph .D .thesis university of Pittsburgh . ,USA,pp.1-173.
- Mburu ,Y. K. , Egloff, A.M., Walker,W. H. , Wang ,L., Seethala ,R. R., van Waes ,C., and Ferris, R. L. (2012). Chemokine receptor 7 (CCR7) gene expression is regulated by NF- $\kappa$ B and activator protein 1 (AP1) in metastatic squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN). *J Biol Chem.*, 27; 287(5): 3581–3590.
- Mehta , D., Wurster ,A., Whitters ,M., Young ,D., Collins ,M., and Grusby ,M. (2003). IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. *J Immunol.*,170(8):4111-8.
- Misener, V.L., Gomez, L., Wigg, K.G., Luca, P., King, N., Kiss, E., Daróczi, G., Kapornai, K., Tamas, Z., Mayer, L., Gádoros, J., Baji, I., Kennedy, J.L., Kovacs, M., Vetró, A., Barr, C.L.(2008). International consortium for childhood-onset mood disorders cytokine genes TNF, IL1A, IL1B, IL6, IL1RN and IL10, and childhood-onset mood disorders. *Neuropsychobiology* .,58(2) : 71-80.
- Misson , D.R., Abdalla, D.R., Borges, A.M., Shimba ,D.S., Adad, S.J., Michelin, M.A., Murta ,E.F.(2011). Cytokine serum levels in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade II-III treated with intralesional interferon-alpha 2b. *Tumori* . , 97(5):578-84. Abstract.
- Molina, A. A., Valencia, J. F. H., Lamoyi, E., Paredes ,A. C. and Lizano, M.(2013). Role of innate immunity against human papilloma virus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. *Viruses* ., 5(11) : 2624-2642.
- Morales, V.H. B., Gutiérrez, L.X., González , J. M. A., Burguete, A., and Marina ,V. M. (2008). Correlation Between IL-10 Gene Expression and HPV Infection in Cervical Cancer: A Mechanism for Immune Response Escape. *Cancer Invest.*, 26( 10) : 1037-1043.
- Mortarino, M., Franceschi, A., Mancianti ,F., Bazzocchi, C., Genchi ,C., Bandi, C.(2004). Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania. *Parassitologia*, 46(1-2):163-7.

- Munagala , R. , Kausar, H. , Munjal, C. ,and Gupta, R. C., (2011).withaferin A induces P53 – dependent apoptosis by repression of HPV oncogenes and upregulation of tumor suppressor proteins in Human cervical cancer cell. *Carcinogenesis* 32 ( 11) :1697 – 1705.
- Myskiw, C., Arsenio, J., van Bruggen, R., Deschambault, Y.,Cao, J.(2009).Vaccina virus E3 Suppresses Expression of diverse cytokines through inhibition . *J. Virol.* , 83(13) :6757-68.
- Olea, E. G., Morales, V. H. B., Zaragoza ,O. P., Poveda, K. T., and Marina, V.M. .(2011). Molecular Mechanism and Potential Targets for Blocking HPV-Induced Lesion Development. *J Oncol.* 2012 :1-11.
- Ornellas ,P., Ornellas, A. A., Chinello, C., Gianazza ,E., Mainini V., Cazzaniga, M., Pereira, D. A., Sandim, V., Cypriano, A.S., Koifman, L., da Silva, P. C. B., Alves, G., Magni, F. (2012). Downregulation of C3 and C4A/B complement factor fragments in plasma from patients with squamous cell carcinoma of the penis. *Int Braz J Urol.* , 38 (6): 739-749.
- Parkin, J. , Cohen, B., (2001). An overview of the immune system. *The lancet.* , 357:1777 – 89.
- Pei , X. F., Sherman, L., Sun ,Y. H. and Schlegel, R. (1998) .HPV-16 E7 protein bypasses keratinocyte growth inhibition by serum and calcium. *Carcinogenesis* .,19 (8) :1481–1486.
- Pfeifer, P., Voss, M., Wonnenberg, B., Hellberg, J., Seiler, F., Lepper ,P.M., Bischoff, M., Langer, F., Schäfers, H.J., Menger, M.D., Bals, R., Beisswenger ,C.( 2013) .IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response. *Am J Respir Cell Mol Biol.*,48(4):415-21.
- Pinto, L. A., Edwards, J., Castle ,P. E., Harro, C. D., Lowy, D.R., Schiller, J. T., Wallace, D., Kopp, W., Adelsberger, J. W., Baseler ,M. W., Berzofsky, J. A. and Hildesheim ,A.(2003). Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)–16 L1 in Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus-Like Particles. *J. Infect. Dis.*; 188 : (2) 327–38.
- Poelgeest, M.I.E.van.(2007). HPV16-specific cellular immunity in health and disease. Ph .D .thesis , university of Leiden , Netherlands ,pp 1-183.

- Polanski, A. , and kimmel, M .(2007). Bioinformatics . *springer. USA* . p .1-5.
- Poveda, K.T., García A. B., Cruz M., Nava G.A .M., Román M. B., Flores E. O., González A. R., Estrada G. L., Romero K. D.,and Marina V. M. .(2012). The SNP at -592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development . *Infectious Agents and Cancer*, 7:32
- Qi ,X.F., Teng, Y.C., Yoon, Y.S., Kim, D.H., Cai, D.Q., Lee, K.J. (2011 ).Reactive oxygen species are involved in the IFN- $\gamma$ -stimulated production of Th2 chemokines in HaCaT keratinocytes . *J Cell Physiol* .;226(1):58-65.
- Renner ,.N.A., Ivey, N.S., Redmann, R.K., Lackner, A.A., MacLean, A.G. (2011). MCP-3/CCL7 production by astrocytes: implications for SIV neuroinvasion and AIDS encephalitis . *J Neurovirol* ., 17(2):146-52.
- Riezu-Boj ,J.I., Larrea, E., Aldabe ,R., Guembe, L., Casares, N., Galeano, E., Echeverria, I., Sarobe, P., Herrero, I., Sangro, B., Prieto, J., Lasarte, J.J.(2011).Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection . *J Hepatol.*,54(3):422-31.
- Roberts, K.E., Kawut ,S.M., Krowka, M.J., Brown, R.S. Jr, Trotter, J.F., Shah ,V., Peter, I., Tighiouart, H., Mitra, N., Handorf ,E., Knowles, J.A., Zacks,S., Fallon, M.B.(2010).Genetic risk factors for hepatopulmonary syndrome in patients with advanced liver disease. *Gastroenterology*.;139(1):130-9.
- Rosenthal ,D.W., Deroti, J.A., Schmidtmayerora,H., Steinberg,B.M. and Bonagora,V.R.(2004). North Shore-Long Health System . NIHRO1 DEO17227.
- Russo, G., Zegar ,C. and Giordano, A.,(2003). Advantages and limitations of microarray technology in human cancer, *Oncogene* ., 22(42): 6497–6507.
- Sahu ,N.,U., Kharkar, P.,S.(2016) Computational drug repositioning: A lateral approach to traditional drug discovery .*Curr Top Med Chem* , 16 (19):2069-2077.
- Saleh, J., Summers, L.K., Cianflone, K., Fielding, B.A., Sniderman ,A.D., Frayn, K.N. (1998).Coordinated release of acylation stimulating protein (ASP) and triacylglycerol clearance by human adipose tissue *in vivo* in the postprandial period. *J Lipid Res.*39(4):884-91.
- Santegoets, L. A.M. , van Seters, M. , Heijmans-Antonissen C., Jan ,A. K., van Beurden ,M., Ewing, P. C., Kuhne, L. C.M., Beckmann ,I., Burger, C. W., Helmerhorst ,T. J.M. and Blok, L.J. (2008) .Reduced local immunity in

- HPV-related VIN: Expression of chemokines and involvement of immune competent cells .*Int. J Cancer*: 123(3):616–622 .
- Santin , A. D., Zhan, F., Bignotti, E., Siegel, E.R., Stefania, S. C. B., Palmieri, M., Anfossi, S., Thomas, M., Burnett .A., Kay, H. H., Roman, J.J., Brien, T. J., Tian E., Cannon ,M., J., Shaughnessy, J. , Pecorelli S. (2005). Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18 – infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium : identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology.*, 331(2) : 269– 291.
- Santin, A.D., Hermonat, P.L., Ravaggi ,A., Bellone, S., Cowan, C., Korourian ,S., Pecorelli ,S., Cannon, M.J., Parham ,G.P.(2000) .Development, characterization and distribution of adoptively transferred peripheral blood lymphocytes primed by human papilloma virus 18 E7--pulsed autologous dendritic cells in a patient with metastatic adenocarcinoma of the uterine cervix . *Eur J Gynaecol Oncol.*, 21(1):17-23.
- Schena, M., (2004). Protein Microarrays ,(1 st ed)., Jones and Bartlett publishing . Massachusetta ,USA.
- Schiffman, M., Clifford, G., and Buonaguro, F.M.(2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious Agents and Cancer*, 4:8 .
- Schmittgen, T. D., Lee, E. J. and Jiang, J., Jiang ,(2007). High-throughput real-time PCR. *Methods Mol Biol.* ,429:89-98.
- Schuurhof, A., Bont, L., Siezen, C.L., Hodemaekers, H., van Houwelingen, H.C., Kimman, T.G., Hoebee, B., Kimpen, J.L., Janssen ,R.(2010) .Interleukin-9 polymorphism in infants with respiratory syncytial virus infection: an opposite effect in boys and girls. *Pediatr Pulmonol .*;45(6):608-13.
- Scott, M., Stites ,D. P., Moscicki ,A. A.B.(1999). Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immun.*, 6( 5) : 751–755.
- Sebastian ,T., and Johanson ,P. (2009). RasV12-mediated down-regulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in immortalized fibroblasts requires loss of p19Arf and facilitates bypass of oncogene-induced senescence, *Cancer Res.*, 15; 69(6): 2588-2598.
- Sen E., Samina A., and Meyers ,C. (2003).Genetic and biochemical analysis of *cis* regulatory elements within the keratinocyte enhancer region of the human

- papillomavirus type 31 upstream regulatory region during different stages of the viral life cycle .*J Virol*, 78, (2 ): 612–629.
- Sharma ,A., Rajappa ,M., Saxena A., Sharma, M.(2007). Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix . *Int J Gynecol Cancer* . ,17(4) :879-85. Abstact.
- Shiau, M.Y., Fan, L.C., Yang, S.C., Tsao, C.H., Lee, H., Cheng ,Y.W., Lai, L. C., Chang, Y.H.(2013). Human papillomavirus up-regulates MMP-2 and MMP-9 expression and activity by inducing interleukin-8 in lung adenocarcinomas. *Plos One*, 8,(1).
- Singh, S., Chhipa, R.R., Vijayakumar, M.V., Bhat, M.K. (2006).DNA damaging drugs-induced down-regulation of Bcl-2 is essential for induction of apoptosis in high-risk HPV-positive HEp-2 and KB cells . *Cancer Lett.*,236(2):213-21.
- Sperling, T., Ołdak ,M., RuÜckheim, B. W., Wickenhauser, C., Doorbar, J., Pfister ,H., Malejczyk, M., Majewski, S., Keates, A.C., Smola, S. (2012). Human papillomavirus type 8 interferes with a novel C/ EBPb-mediated mechanism of keratinocyte CCL20 Chemokine expression and langerhans cell migration. *Plos Pathgens* ., 8 ,( 7).
- Stanley, M. A. ( 2009). Immune response to human papilloma virus, *Indian J Med Res* 130(3) : 266-276 .
- Stanley, M., (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* ,24:16-22.
- Stanley, M.A ., (2012) .Epitheial cell response infection with human papilomavirus , *Clin Microbiol Rev*. Vol. 25 P. 215 – 222 .
- Tanaka ,T., Saied, A., Meng, K., George, J., Xiaohong , W., Marija J., Serafino, P., Yuri, S., Yulan, P., Ramaiah, N., Hirofumi ,D., William ,H., Kevin ,G. and Minoru ,S.(2000). Genome wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a15,000 mouse developmental cDNA microarray . , *Proc Natl Acad Sci USA*.,97(16):9127-32.
- Tanegashima, K., Suzuki, K., Nakayama, Y., Tsuji, K., Shigenaga ,A., Otaka, A., Hara ,T.(2013).CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS Lett.*;587(12):1731-5.

- Tang ,B.S., Chan, K.H., Cheng, V.C., Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.C., Chan, T.L., Wu, A.K., Hung, I.F, Leung, S.Y., Yuen, K.Y. (2005).Comparative host gene transcription by micro-array analysis early after infection of the Huh7 cell line by sever acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E. *J virol*, 79(10 ) :6170-6193 .
- Tirone, N. R., Peghini ,B. C. , Barcelos ,A. C. M. , Murta, E. F. C. , Michelin, M.A. (2009). Local expression of interferon-alpha and interferon receptors in cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Immunol Immunother* ., 58 (12) : 2003–2010.
- Tisdall , J.(2001). Beginning Perl for Bioinformatics, 384 pages,3<sup>rd</sup> ed. Springer .
- Tjong, M. Y., Vange, N., Kate ,F.J.W., Hung, S.P. T., Ter Schegget , J. , Burger, M.P.M. ,Out ,T. A. .(1999). Increased IL-6 and IL-8 levels in cervicovaginal secretions of patients with cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* . 73(2) : 285–291.Abstact.
- Torres-Poveda ,K., García, A. B., Cruz, M., Nava, G.A .M., Román ,M. B., Flores, E. O., González ,A. R., Estrada, G. L., Romero, K. D.,and Marina, V. M. .(2012). The SNP at –592 of human IL-10 gene is associated with serum IL-10 levels and increased risk for human papillomavirus cervical lesion development . *Infectious Agents and Cancer*, 7:32.
- Trimble, C. L., Clark ,R. A., Thoburn ,C., Hanson, N.C., Tassello, J., Frosina, D. , Kos, F., Teague ,J., Jiang, Y., Barat, N.C. and Jungbluth ,A. A.(2010). Human papillomavirus 16-associated cervical intraepithelial neoplasia in humans excludes CD8 T Cells from dysplastic epithelium . *J Immunol.* . 185:7107-7114.
- Trimble,C.L., Clark, R.A., Thoburn, C., Hanson, N.C., Tassello, J, Frosina, D., Kos, F., Teague, J., Jiang, Y., Barat, N.C, Jungbluth, A.A. (2013) Epithelium excludes CD8 T cells from dysplastic cervical intraepithelial neoplasia in humans human papillomavirus 16-associated. *J Immunol* 2010; 185(11):7107-7114.
- Utgaard ,J.O., Jahnsen, F.L., Bakka, A., Brandtzaeg, P., Haraldsen ,G. (1998)., Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J. Exp. Med.*, 188 (9), 1751–1756.

- Uttamchandani, M., Neo, J.L., Ong, N. Z. B., Moochhala, S.( 2009). "Applications of microarrays in pathogen detection and biodefence ." *Trends Biotechnol* ., 27(1) , 53-61.
- Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. C., de Souza ,P. R. E., Carvalho, A. de Albuquerque, T., Crovela, S .(2009) . Principles and applications of polymerase chain reaction in medical Diagnostic fields: a review . *Braz. J Microbiol.* , 40:1-11 .
- Van Damme, J., Rampart, M., Conings, R., Decock, B., Van Osselaer, N., Willems,. J., Billiau, A.( 1990) The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and beta-thromboglobulin: *in vitro* and *in vivo* comparison of NH2-terminally processed forms. *Eur J Immunol* . , 20(9):2113-2118.
- Venkatasubbarao, S. (2004) .Microarrays – status and prospects , *Trends in Biotechnol*, 22(12 ): 630-637.
- Vural, A., Oner, S., An, N., Simon ,V., Ma, D., Blumer ,J.B., Lanier, S.M.(2010). Distribution of activator of G-protein signaling 3 within the aggresomal pathway: role of specific residues in the tetratricopeptide repeat domain and differential regulation by the AGS3 binding partners Gi(alpha) and mammalian invertebrate .*Mol Cell Biol.* 30(6):1528-1540.
- Walter, M., Ralph, J., Kai, L. and Karen ,J., (2006).Auborn CCAAT/ enhancer - binding protein b represses human papilloma virus 11 upstream regulatory region expression through a promoter-proximal YY1-binding site . *J. Gen. Virol.*, 87(1): 51–59.
- Wang ,X., Gao, X., Hong ,Y., Li, X., Chen, H. (2010). Local hyperthermia decreases the expression of CCL-20 in condyloma acuminatum. *Virol.J* , 7:301.
- Wang, H., Liu ,K., Yuan, F., Berdichevsky, L., Taichman ,I. B., And Auborn ,K.(1996). C/EBPb Is a negative regulator of human papillomavirus Type 11 in keratinocytes. *J Virol*, 70, ( 7 ) 4839–4844.
- Wang, X., Hamza ,M., Wu ,T., Dionne, R. (2009). Upregulation of IL-6, IL-8 and CCL2 gene expression after acute inflammation: Correlation to clinical pain . *Pain*, 142 (3), 275-283.
- Wu, J., Ekman ,C., Jonsen, A., Sturfelt, G., Bengtsson, A.A., Gottsater ,A., Lindblad, B., Lindqvist, E., Saxne, T., Dahlback, B.(2011). Increased

plasma levels of the soluble Mer tyrosine kinase receptor in systemic lupus erythematosus relate to disease activity and nephritis . *Arthritis Res Ther.* ;13(2).

- Xu, H.L., Xu, W.H., Cai, Q., Feng ,M., Long, J., Zheng ,W., Xiang ,Y.B., Shu, X.O.(2009). Polymorphisms and haplotypes in the caspase-3, caspase-7, and caspase-8 genes and risk for endometrial cancer: a population-based, case-control study in a Chinese population.. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* ,18(7):2114-2122.
- Yang ,R., Murillo, F. M., Cui ,H., Blosser, R., Uematsu, S.,Takeda K., Akira, S., Viscidi , R.P., and Roden, R. B. S. (2004). Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells To produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J Virol.*, 78, ( 20) : 11152–11160.
- Yang ,T.M., Qi, S.N., Zhao, N., Yang, Y.J., Yuan, H.Q., Zhang ,B., Jin, S.(2013). Induction of apoptosis through caspase-independent or caspase-9-dependent pathway in mouse and human osteosarcoma cells by a new nitroxyl spin-labeled derivative of podophyllotoxin. *Apoptosis.*,18(6): 727-738.
- Yang, R., Murillo, F. M., Akira , K. L. H. S., Viscidi, R. P., Roden, R.B. S., Yutzy ,W. H., Uematsu ,S., Takeda, K. (2004). Papillomavirus type-16 virus-like particles activate complementary defense responses in key dendritic cell subpopulations . *J Immunol.* , 173(4):2624-2631.
- Yim, E.K., and Park ,J. S., (2005) .The Role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat.* ;37(6):319-324.
- Zajkowska, J., Moniuszko, A., Pancewicz, S.A., Muszynska.A., Kondrusik, M., Grygorczuk, S., Swierzbinska,R., Dunaj, J., Czupryna, P. (2011) . Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 chemokines in serum and cerebrospinal fluid in patients with tick borne encephalitis (TBE). *Adv Med Sci.* , 56(2):311-317.

الملحق

Appendix

## الملحق 1

جدول 1: موقع الجين ورمزه واسمه للجينات المناعية كلها ( 90 جيناً) مرتبة كما في  
.(SABioscience, USA) RT-PCR Array kit

اسم الجين	رمز الجين	موقع الجين
ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20). member 1	ABCF1	A01
<b>B-cell CLL/lymphoma 6</b>	<b>BCL6</b>	<b>A02</b>
<b>Complement component 3</b>	<b>C3</b>	<b>A03</b>
Complement component 4A (Rodgers blood group)	C4A	A04
Complement component 5	C5	A05
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 1</b>	<b>CCL1</b>	<b>A06</b>
Chemokine (C-C motif) ligand 11	CCL11	A07
Chemokine (C-C motif) ligand 13	CCL13	A08
Chemokine (C-C motif) ligand 15	CCL15	A09
Chemokine (C-C motif) ligand 16	CCL16	A10
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 17</b>	<b>CCL17</b>	<b>A11</b>
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)</b>	<b>CCL18</b>	<b>A12</b>
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 19</b>	<b>CCL19</b>	<b>B01</b>
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 2</b>	<b>CCL2</b>	<b>B02</b>
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 20</b>	<b>CCL20</b>	<b>B03</b>
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 21</b>	<b>CCL21</b>	<b>B04</b>
Chemokine (C-C motif) ligand 23	CCL23	B05
Chemokine (C-C motif) ligand 24	CCL24	B06
Chemokine (C-C motif) ligand 25	CCL25	B07
Chemokine (C-C motif) ligand 26	CCL26	B08
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 3</b>	<b>CCL3</b>	<b>B09</b>
Chemokine (C-C motif) ligand 4	CCL4	B10
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 5</b>	<b>CCL5</b>	<b>B11</b>
<b>Chemokine (C-C motif) ligand 7</b>	<b>CCL7</b>	<b>B12</b>
Chemokine (C-C motif) ligand 8	CCL8	C01
Chemokine (C-C motif) receptor 1	CCR1	C02
Chemokine (C-C motif) receptor 2	CCR2	C03
Chemokine (C-C motif) receptor 3	CCR3	C04
Chemokine (C-C motif) receptor 4	CCR4	C05
Chemokine (C-C motif) receptor 5	CCR5	C06
Chemokine (C-C motif) receptor 6	CCR6	C07
<b>Chemokine (C-C motif) receptor 7</b>	<b>CCR7</b>	<b>C08</b>
Chemokine (C-C motif) receptor 8	CCR8	C09
Chemokine (C-C motif) receptor 9	CCR9	C10
<b>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). beta</b>	<b>CEBPB</b>	<b>C11</b>
C-reactive protein, pentraxin-related	CRP	C12
Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	D01
<b>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)</b>	<b>CXCL1</b>	<b>D02</b>
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	D03
<b>Chemokine (C-X-C motif) ligand 11</b>	<b>CXCL11</b>	<b>D04</b>
<b>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-</b>	<b>CXCL12</b>	<b>D05</b>

<b>derived factor 1)</b>		
Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	CXCL13	D06
Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	CXCL14	D07
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	D08
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	D09
Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	D10
Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CXCL6	D11
<b>Chemokine (C-X-C motif) ligand 9</b>	<b>CXCL9</b>	<b>D12</b>
Caspase recruitment domain family, member 18	CARD18	E01
<b>Interferon, alpha 2</b>	<b>IFNA2</b>	<b>E02</b>
<b>Interleukin 10</b>	<b>IL10</b>	<b>E03</b>
<b>Interleukin 10 receptor, alpha</b>	<b>IL10RA</b>	<b>E04</b>
Interleukin 10 receptor, beta	IL10RB	E05
Interleukin 13	IL13	E06
Interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	E07
<b>Interleukin 17C</b>	<b>IL17C</b>	<b>E08</b>
<b>Interleukin 1, alpha</b>	<b>IL1A</b>	<b>E09</b>
<b>Interleukin 1, beta</b>	<b>IL1B</b>	<b>E10</b>
Interleukin 1 family, member 10 (theta)	IL1F10	E11
Interleukin 36 receptor antagonist	IL36RN	E12
Interleukin 36 , alpha	IL36A	F01
Interleukin 37	IL37	F02
Interleukin 36 , beta	IL36B	F03
<b>Interleukin 36 , gamma</b>	<b>IL36G</b>	<b>F04</b>
<b>Interleukin 1 receptor, type I</b>	<b>IL1R1</b>	<b>F05</b>
<b>Interleukin 1 receptor antagonist</b>	<b>IL1RN</b>	<b>F06</b>
Interleukin 22	IL22	F07
Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)	IL5	F08
Interleukin 5 receptor, alpha	IL5RA	F09
<b>Interleukin 8</b>	<b>IL8</b>	<b>F10</b>
Interleukin 8 receptor, alpha	IL8RA	F11
Interleukin 8 receptor, beta	IL8RB	F12
Interleukin 9	IL9	G01
Interleukin 9 receptor	IL9R	G02
Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	LTA	G03
Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB	G04
Leukotriene B4 receptor	LTB4R	G05
<b>Macrophage migration inhibitory factor</b>	<b>MIF</b>	<b>G06</b>
Aminoacyl tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein 1	AIMP1	G07
Secreted phosphoprotein 1	SPP1	G08
<b>Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</b>	<b>TNF</b>	<b>G09</b>
CD40 ligand	CD40LG	G10
<b>Toll interacting protein</b>	<b>TOLLIP</b>	<b>G11</b>
Chemokine (C motif) receptor 1	XCR1	G12
Beta-2-microglobulin	B2M	H01
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT1	H02
Ribosomal protein L13a	RPL13A	H03
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	H04

Actin, beta	ACTB	H05
Human Genomic DNA Contamination	HGDC	H06

جدول 2:- الجداول القياسية لقيم التضاعف للتعبير الجيني والقيم الحرجة (Ct) لتضاعف الحامض النووي .

Fold Change	المجموعة 2		Fold Change	المجموعة 1		رمز الجين
	Acut/Cont	Cont.		Acute	Acut/Cont	
1.87	31.2	28.6	1.21	24.9	24.5	ABCF1
1.32	31.5	29.4	1.13	24.2	23.9	BCL6
0.93	30.6	29.0	1.21	24.7	24.3	C3
13.00	33.6	28.2	0.99	22.6	22.5	C4A
4.92	32.7	28.7	178.53	32.5	24.9	C5
1.00	31.6	29.9	95.67	33.0	26.3	CCL1
2.14	31.8	29.0	1.30	26.3	25.8	CCL11
1.87	33.5	30.9	1.21	27.3	26.9	CCL13
1.74	31.6	29.1	0.99	25.3	25.2	CCL15
1.32	31.9	29.8	1.30	26.3	25.8	CCL16
5.28	34.2	30.1	1.06	25.1	24.9	CCL17
2.46	32.7	29.7	166.57	34.0	26.5	CCL18
0.44	31.7	31.2	1.06	24.8	24.6	CCL19
3.73	31.9	28.3	29.45	29.8	24.8	CCL2
1.23	30.3	28.3	0.75	24.6	24.9	CCL20
1.52	31.2	28.9	0.92	24.7	24.7	CCL21
2.30	31.1	28.2	0.99	24.8	24.7	CCL23
0.38	28.0	27.7	0.75	23.7	24.0	CCL24
1.41	30.2	28.0	0.70	23.0	23.4	CCL25
0.41	31.4	31.0	0.86	26.6	26.7	CCL26
2.64	31.1	28.0	0.92	24.9	24.9	CCL3
6.96	33.7	29.2	382.68	32.0	23.3	CCL4
10.56	34.1	29.0	166.57	31.6	24.1	CCL5
2.46	32.1	29.1	1.13	26.8	26.5	CCL7
1.23	30.2	28.2	0.99	25.7	25.6	CCL8
0.81	30.2	28.8	0.86	23.8	23.9	CCR1
5.66	33.3	29.1	0.92	25.6	25.6	CCR2
1.32	30.7	28.6	0.99	24.5	24.4	CCR3
4.29	32.6	28.8	0.92	25.5	25.5	CCR4
1.23	29.6	27.6	0.92	24.0	24.0	CCR5
2.14	31.5	28.7	0.92	24.4	24.4	CCR6
1.23	32.1	30.1	0.86	25.0	25.1	CCR7
1.52	30.8	28.5	0.86	25.5	25.6	CCR8
1.15	30.5	28.6	0.86	24.4	24.5	CCR9
0.76	31.3	30.0	0.70	24.1	24.5	CEBPB
4.92	31.8	27.8	0.99	25.7	25.6	CRP
3.25	N/A	31.6	89.26	34.1	27.5	CX3CR1
2.30	31.1	28.2	117.78	32.7	25.7	CXCL1
1.32	30.7	28.6	15.78	29.9	25.8	CXCL10
1.74	30.8	28.3	0.86	25.9	26.0	CXCL11
0.62	30.2	29.2	0.80	24.5	24.7	CXCL12

1.52	31.0	28.7	0.92	25.8	25.8	CXCL13
1.41	30.5	28.3	0.99	23.9	23.8	CXCL14
0.71	33.6	32.4	1.06	29.3	29.1	CXCL2
1.41	32.2	30.0	0.65	28.0	28.5	CXCL3
1.87	31.6	29.0	0.86	26.6	26.7	CXCL5
0.62	29.9	28.9	0.86	27.3	27.4	CXCL6
2.00	31.6	28.9	0.92	26.0	26.0	CXCL9
1.52	31.4	29.1	0.99	27.4	27.3	CARD18
3.25	31.0	27.6	0.86	26.6	26.7	IFNA2
2.00	30.5	27.8	1009.90	33.9	23.8	IL10
0.93	29.7	28.1	0.75	23.5	23.8	IL10RA
3.48	32.7	29.2	0.92	24.9	24.9	IL10RB
1.32	30.9	28.8	504.95	33.8	24.7	IL13
0.81	31.7	30.3	0.99	25.4	25.3	IL13RA1
0.66	29.6	28.5	0.92	23.2	23.2	IL17C
3.03	31.3	28	67.65	30.9	24.7	IL1A
3.25	31.7	28.3	51.27	29.9	24.1	IL1B
2.83	31.9	28.7	36.25	30.5	25.2	IL1F10
4.59	32.0	28.1	0.92	25.5	25.5	IL36RN
7.46	32.7	28.1	1.13	26.5	26.2	IL36A
1.87	31.5	28.9	0.86	24.9	25	IL37
1.15	30.1	28.2	0.99	25.8	25.7	IL36B
1.32	30.7	28.6	0.80	26.6	26.8	IL36G
3.73	31.5	27.9	0.86	25.6	25.7	IL1R1
1.62	30.9	28.5	1.06	24.0	23.8	IL1RN
1.07	31.6	29.8	1.06	27.4	27.2	IL22
17.15	33.5	27.7	0.65	25.6	26.1	IL5
0.62	30.0	29.0	0.92	25.3	25.3	IL5RA
27.86	34.1	27.6	820.30	33.9	24.1	IL8
0.35	30.0	29.8	0.75	24.3	24.6	CXCR1
1.23	31.0	29.0	0.99	23.6	23.5	CXCR2
1.52	31.7	29.4	1.21	26.6	26.2	IL9
8.00	33.9	29.2	0.86	26.3	26.4	IL9R
1.52	31.2	28.9	0.92	24.5	24.5	LTA
0.50	31.3	30.6	0.92	23.8	23.8	LTB
1.07	30.4	28.6	0.99	24.1	24.0	LTB4R
0.87	29.6	28.1	0.70	23.2	23.6	MIF
1.00	32.8	31.1	1.13	29.6	29.3	AIMP1
1.74	31.4	28.9	0.99	27.6	27.5	SPP1
4.59	32.6	28.7	29.45	28.9	23.9	TNF
0.87	31.4	29.9	0.92	25.6	25.6	CD40LG
1.87	32.0	29.4	1.21	23.6	23.6	TOLLIP
0.93	30.5	28.9	1.13	26.0	26.0	XCR1
15.1369	16.28	19.8	15.1369	16.28	19.8	B2M
515.5612	19.29	27.9	515.5612	19.29	27.9	HPRT1
1	22.9	22.5	1	22.9	22.5	RPL13A
0.6156	24.4	23.3	0.6156	24.4	23.3	GAPDH
0.6598	21.7	20.7	0.6598	21.7	20.7	ACTB
1.3195	27.9	27.9	1.3195	27.9	27.9	HGDC
1.0943	28.27	28	1.0943	28.27	28	RTC

1.3195	27.7	27.7	1.3195	27.7	27.7	RTC
1.3195	28.6	28.6	1.3195	28.6	28.6	RTC
0.3536	22.1	20.2	0.3536	22.1	20.2	PPC
2.114	18.22	18.9	2.114	18.22	18.9	PPC
0.6242	19.18	18.1	0.6242	19.18	18.1	PPC

Fold Change	المجموعة 4		Fold Change	المجموعة 3		رمز الجين
	Acut/Cont	Cont.		Acute	Acut/Cont	
2.71	24.7	23.0	0.96	27.2	22.7	ABCF1
1.79	24.6	23.5	0.45	26.5	23.1	BCL6
2.06	24.9	23.6	2.06	28.1	22.5	C3
3.12	24.1	22.2	1.92	26.6	21.1	C4A
2.53	24.7	23.1	2.20	27.4	21.7	C5
23.26	29.3	24.5	1.45	28.3	23.2	CCL1
1.79	25.2	24.1	1.27	27.7	22.8	CCL11
1.56	26.5	25.6	1.67	29.6	24.3	CCL13
2.36	25.1	23.6	1.36	28.3	23.3	CCL15
2.06	26.1	24.8	3.12	29.1	22.9	CCL16
1.45	25.8	25.0	2.91	28.6	22.5	CCL17
2.20	25.4	24.0	0.55	28.6	24.9	CCL18
1.79	25.0	23.9	1.45	28.2	23.1	CCL19
1.79	24.4	23.3	0.96	27.1	22.6	CCL2
17.63	27.7	23.3	0.73	26.9	22.8	CCL20
2.06	25.0	23.7	1.03	27.4	22.8	CCL21
1.92	24.2	23.0	1.56	27.0	21.8	CCL23
1.79	24.2	23.1	1.36	27.0	22.0	CCL24
1.67	24.0	23.0	1.56	27.2	22.0	CCL25
1.67	27.3	26.3	1.79	29.9	24.5	CCL26
1.56	24.1	23.2	1.79	27.0	21.6	CCL3
1.56	24.5	23.6	2.71	27.2	21.2	CCL4
20.25	28.9	24.3	2.53	27.7	21.8	CCL5
1.27	25.1	24.5	1.36	28.0	23.0	CCL7
2.06	24.4	23.1	0.90	27.2	22.8	CCL8
0.00	24.3	N/A	0.59	26.6	22.8	CCR1
2.06	25.7	24.4	1.79	28.7	23.3	CCR2
1.67	24.6	23.6	1.56	27.7	22.5	CCR3
1.56	24.6	23.7	1.45	27.6	22.5	CCR4
1.79	23.7	22.6	1.79	26.8	21.4	CCR5
1.79	24.8	23.7	1.56	27.6	22.4	CCR6
2.36	25.6	24.1	2.06	28.7	23.1	CCR7
1.92	25.0	23.8	1.67	27.7	22.4	CCR8
1.67	24.6	23.6	2.06	27.4	21.8	CCR9
0.90	25.5	25.4	0.59	27.3	23.5	CEBPB
1.10	23.9	23.5	2.71	27.3	21.3	CRP
2.20	27.0	25.6	2.06	30.6	25.0	CX3CR1
46.53	29.5	23.7	0.59	26.5	22.7	CXCL1
1.56	24.5	23.6	0.84	27.2	22.9	CXCL10
1.36	24.3	23.6	1.79	28.0	22.6	CXCL11
1.18	24.9	24.4	0.84	27.9	23.6	CXCL12

1.10	24.9	24.5	0.96	28.1	23.6	CXCL13
1.79	24.1	23.0	1.92	27.4	21.9	CXCL14
2.20	27.3	25.9	0.96	29.8	25.3	CXCL2
2.53	26.0	24.4	0.68	28.8	24.8	CXCL3
1.79	24.7	23.6	1.79	27.2	21.8	CXCL5
1.67	24.8	23.8	2.71	27.8	21.8	CXCL6
1.56	24.9	24.0	0.84	27.4	23.1	CXCL9
1.10	25.1	24.7	1.18	28.1	23.3	CARD18
0.90	22.9	22.8	1.27	26.6	21.7	IFNA2
17.63	27.6	23.2	0.84	26.8	22.5	IL10
0.90	23.7	23.6	1.27	27.2	22.3	IL10RA
1.18	24.8	24.3	1.36	27.9	22.9	IL10RB
23.26	28.8	24.0	0.90	27.5	23.1	IL13
1.36	24.6	23.9	1.10	27.7	23.0	IL13RA1
1.79	25.2	24.1	1.27	27.7	22.8	IL17C
13.36	26.9	22.9	1.56	26.7	21.5	IL1A
21.71	27.8	23.1	0.96	26.2	21.7	IL1B
14.32	27.9	23.8	2.91	27.9	21.8	IL1F10
1.79	24.7	23.6	1.92	27.5	22.0	IL36RN
1.18	24.3	23.8	1.92	27.9	22.4	IL36A
0.84	23.7	23.7	1.27	27.6	22.7	IL37
0.90	23.8	23.7	0.59	27.1	23.3	IL36B
0.96	24.1	23.9	0.96	27.7	23.2	IL36G
0.73	23.6	23.8	0.90	27.1	22.7	IL1R1
1.36	23.9	23.2	0.73	26.9	22.8	IL1RN
0.78	25.0	25.1	2.06	29.5	23.9	IL22
1.27	24.2	23.6	1.27	26.9	22	IL5
1.18	25.1	24.6	1.45	28.2	23.1	IL5RA
13.36	27.1	23.1	1.45	25.8	20.7	IL8
1.79	25.2	24.1	1.45	27.5	22.4	CXCR1
1.56	24.4	23.5	0.28	26.3	23.6	CXCR2
1.03	25.3	25.0	0.59	29.0	25.2	IL9
0.68	24.5	24.8	1.36	28.7	23.7	IL9R
0.90	24.6	24.5	0.84	28	23.7	LTA
0.78	25.5	25.6	0.90	28.5	24.1	LTB
1.10	24.3	23.9	1.56	27.8	22.6	LTB4R
0.96	24.1	23.9	0.68	27.1	23.1	MIF
1.45	26.4	25.6	2.53	29.7	23.8	AIMP1
1.10	24.9	24.5	1.27	27.9	23.0	SPP1
18.90	28.9	24.4	1.45	27.9	22.8	TNF
1.10	24.5	24.1	1.92	27.5	22.0	CD40LG
1.79	25.9	24.8	4.11	28.7	22.1	TOLLIP
1.27	25.6	25.0	1.92	28.0	22.5	XCR1
15.1369	16.28	19.8	15.1369	16.28	19.8	B2M
515.5612	19.29	27.9	515.5612	19.29	27.9	HPRT1
1	22.9	22.5	1	22.9	22.5	RPL13A
0.6156	24.4	23.3	0.6156	24.4	23.3	GAPDH
0.6598	21.7	20.7	0.6598	21.7	20.7	ACTB
1.3195	27.9	27.9	1.3195	27.9	27.9	HGDC
1.0943	28.27	28	1.0943	28.27	28	RTC

1.3195	27.7	27.7	1.3195	27.7	27.7	RTC
1.3195	28.6	28.6	1.3195	28.6	28.6	RTC
0.3536	22.1	20.2	0.3536	22.1	20.2	PPC
2.114	18.22	18.9	2.114	18.22	18.9	PPC
0.6242	19.18	18.1	0.6242	19.18	18.1	PPC

Fold Change	المجموعة 6		Fold Change	المجموعة 5		رمز الجين
	Acut/Cont	Cont.		Acute	Acut/Cont	
2.4967	27.6	23.4	0.27	26.1	24.7	ABCF1
2.3295	27.7	23.6	0.38	26.5	24.6	BCL6
1.3379	27.9	24.6	0.41	26.9	24.9	C3
0.8827	26.5	23.8	0.33	25.8	24.1	C4A
1.014	26.9	24.0	0.25	26.0	24.7	C5
11.4716	31.7	25.3	0.31	27.1	25.5	CCL1
0.669	27.7	25.4	90.51	N/A	25.2	CCL11
0.6242	28.7	26.5	0.44	28.6	26.5	CCL13
0.669	27.4	25.1	0.33	26.8	25.1	CCL15
0.6242	28.4	26.2	0.20	27.1	26.1	CCL16
0.6242	28.5	26.3	0.35	27.6	25.8	CCL17
6.5887	31.3	25.7	1.74	29.5	25.4	CCL18
1.5369	27.9	24.4	0.22	26.1	25.0	CCL19
2.1735	27.9	23.9	9.85	31.0	24.4	CCL2
1.0867	26.7	23.7	0.29	25.7	24.2	CCL20
0.8827	27.3	24.6	0.38	26.9	25.0	CCL21
1.2483	26.8	23.6	0.31	25.8	24.2	CCL23
0.4118	25.7	24.1	0.23	25.4	24.2	CCL24
0.669	26.7	24.4	0.50	26.3	24.0	CCL25
0.2535	29.4	28.5	0.31	28.9	27.3	CCL26
0.507	26.5	24.6	0.47	26.3	24.1	CCL3
0.4414	26.7	25.0	3.73	29.7	24.5	CCL4
37.2715	33.8	25.7	2.83	29.8	25.0	CCL5
7.5685	31.6	25.8	0.87	28.2	25.1	CCL7
1.8921	27.6	23.8	2.14	28.8	24.4	CCL8
1.1647	27.2	24.1	0.29	25.8	24.3	CCR1
0.4118	27.9	26.3	1.41	29.5	25.7	CCR2
0.473	26.8	25.0	0.47	26.8	24.6	CCR3
0.507	27.0	25.1	0.57	27.1	24.6	CCR4
0.8827	26.2	23.5	0.33	25.4	23.7	CCR5
0.717	27.1	24.7	0.35	26.6	24.8	CCR6
1.0867	28.6	25.6	2.00	29.9	25.6	CCR7
0.473	27.2	25.4	0.27	26.4	25.0	CCR8
1.014	27.8	24.9	0.31	26.2	24.6	CCR9
0.473	28.6	26.8	0.50	27.8	25.5	CEBPB
0.5434	26.7	24.7	0.71	26.7	23.9	CRP
1.8921	30.2	26.4	0.38	28.9	27.0	CX3CR1
4.3469	29.3	24.3	0.29	25.2	23.7	CXCL1
2.6759	28.7	24.4	9.85	31.1	24.5	CXCL10
0.5434	26.8	24.8	0.57	26.8	24.3	CXCL11
0.669	27.6	25.3	0.33	26.6	24.9	CXCL12

0.507	27.3	25.4	0.27	26.3	24.9	CXCL13
1.7654	27.8	24.1	0.62	26.7	24.1	CXCL14
0.8236	30.3	27.7	0.19	28.2	27.3	CXCL2
2.6759	30.9	26.6	0.71	28.8	26.0	CXCL3
0.507	26.9	25.0	0.35	26.5	24.7	CXCL5
0.4118	26.6	25.0	0.41	26.8	24.8	CXCL6
79.8932	34.5	25.3	0.57	27.4	24.9	CXCL9
1.3379	28.3	25.0	0.76	28.0	25.1	CARD18
4.3469	28.8	23.8	0.93	26.1	22.9	IFNA2
12.295	30.5	24.0	6.06	29.6	23.7	IL10
0.717	26.7	24.3	0.35	25.5	23.7	IL10RA
0.5824	27.7	25.6	0.50	27.1	24.8	IL10RB
3.7842	29.9	25.1	3.48	29.4	24.3	IL13
1.3379	28.4	25.1	0.50	26.9	24.6	IL13RA1
0.4414	27.0	25.3	0.23	26.4	25.2	IL17C
0.8236	26.7	24.1	3.48	28.9	23.8	IL1A
3.0738	29.1	24.6	25.99	31.8	23.8	IL1B
0.6242	27.3	25.1	0.41	26.8	24.8	IL1F10
0.669	27.2	24.9	0.38	26.6	24.7	IL36RN
0.8236	27.2	24.6	0.76	27.2	24.3	IL36A
0.9461	27.4	24.6	1.00	27.0	23.7	IL37
0.8236	26.9	24.3	0.23	25	23.8	IL36B
0.6242	27.1	24.9	0.35	25.9	24.1	IL36G
0.669	26.7	24.4	0.38	25.5	23.6	IL1R1
0.6242	26.8	24.6	0.44	26.0	23.9	IL1RN
0.507	28.2	26.3	0.41	27.0	25.0	IL22
0.717	27.1	24.7	0.22	25.3	24.2	IL5
0.4118	27.2	25.6	0.35	26.9	25.1	IL5RA
6.1475	29.4	23.9	4.59	28.9	23.4	IL8
1.2483	28.6	25.4	0.33	26.9	25.2	CXCR1
15.1369	31.5	24.7	0.62	27.0	24.4	CXCR2
0.9461	28.7	25.9	2.00	29.6	25.3	IL9
0.8827	28.2	25.5	0.38	26.4	24.5	IL9R
0.5434	27.3	25.3	0.35	26.4	24.6	LTA
0.4414	28.1	26.4	0.47	27.7	25.5	LTB
0.7684	27.3	24.8	0.54	26.7	24.3	LTB4R
0.5824	26.9	24.8	0.54	26.5	24.1	MIF
0.7684	29.8	27.3	0.19	27.3	26.4	AIMP1
0.4414	27.3	25.6	0.44	27.0	24.9	SPP1
5.3517	30.8	25.5	4.59	30.7	25.2	TNF
1.2483	28.4	25.2	0.54	26.9	24.5	CD40LG
0.3121	27.4	26.2	0.57	28.4	25.9	TOLLIP
0.4118	27.3	25.7	0.38	27.5	25.6	XCR1
15.1369	16.28	19.8	15.1369	16.28	19.8	B2M
515.5612	19.29	27.9	515.5612	19.29	27.9	HPRT1
1	22.9	22.5	1	22.9	22.5	RPL13A
0.6156	24.4	23.3	0.6156	24.4	23.3	GAPDH
0.6598	21.7	20.7	0.6598	21.7	20.7	ACTB
1.3195	27.9	27.9	1.3195	27.9	27.9	HGDC
1.0943	28.27	28	1.0943	28.27	28	RTC

1.3195	27.7	27.7	1.3195	27.7	27.7	RTC
1.3195	28.6	28.6	1.3195	28.6	28.6	RTC
0.3536	22.1	20.2	0.3536	22.1	20.2	PPC
2.114	18.22	18.9	2.114	18.22	18.9	PPC
0.6242	19.18	18.1	0.6242	19.18	18.1	PPC

Fold Change	المجموعة 8		Fold Change	المجموعة 7		رمز الجين
	Acut/Cont	Cont.		Acute	Acut/Cont	
1.67	24.0	19.7	1.74	24.9	22.7	ABCF1
1.27	24.7	20.8	1.00	24.7	23.3	BCL6
1.10	24	20.3	2.30	25.2	22.6	C3
0.96	22.6	19.1	2.83	24.6	21.7	C4A
1.18	23.8	20.0	7.46	26.8	22.5	C5
7.67	28.0	21.5	22.63	29.5	23.6	CCL1
4.41	27.0	21.3	1.62	25.3	23.2	CCL11
0.96	25.5	22.0	2.14	26.6	24.1	CCL13
5.06	26.9	21.0	2.00	25.2	22.8	CCL15
2.20	26.0	21.3	2.64	26.7	23.9	CCL16
1.03	25.5	21.9	1.74	25.9	23.7	CCL17
0.73	24.8	21.7	14.93	28.6	23.3	CCL18
1.27	24.3	20.4	2.14	25.6	23.1	CCL19
16.45	27.7	20.1	39.40	29.4	22.7	CCL2
0.96	23.4	19.9	1.23	24.3	22.6	CCL20
0.96	24.0	20.5	1.74	25.1	22.9	CCL21
1.27	23.7	19.8	1.87	24.5	22.2	CCL23
1.10	23.6	19.9	1.74	24.6	22.4	CCL24
0.96	23.6	20.1	2.83	24.9	22.0	CCL25
0.90	26.6	23.2	2.83	28.4	25.5	CCL26
0.96	23.9	20.4	1.62	24.6	22.5	CCL3
1.27	24.3	20.4	1.87	24.8	22.5	CCL4
28.64	28.9	20.5	8.57	27.9	23.4	CCL5
1.18	25.6	21.8	1.87	25.5	23.2	CCL7
0.96	23.1	19.6	1.52	24.5	22.5	CCL8
1.18	24.1	20.3	1.32	24.7	22.9	CCR1
1.10	24.8	21.1	3.25	26.4	23.3	CCR2
0.96	23.5	20.0	1.74	24.9	22.7	CCR3
1.03	23.6	20.0	2.64	25.2	22.4	CCR4
0.96	22.8	19.3	2.00	24.0	21.6	CCR5
11.63	27.7	20.6	1.62	24.9	22.8	CCR6
4.72	26.9	21.1	1.74	25.5	23.3	CCR7
1.03	24.6	21.0	1.62	25.3	23.2	CCR8
0.90	24.0	20.6	1.87	24.7	22.4	CCR9
0.84	26.0	22.7	3.25	27.2	24.1	CEBPB
0.96	24.2	20.7	1.52	24.6	22.6	CRP
1.56	25.8	21.6	2.30	27.2	24.6	CX3CR1
1.67	24.1	19.8	17.15	28.3	22.8	CXCL1
13.36	27.4	20.1	68.59	30.2	22.7	CXCL10
0.90	23.6	20.2	2.00	25.0	22.6	CXCL11
1.03	24.6	21.0	1.62	25.6	23.5	CXCL12

1.18	24.8	21.0	1.87	25.6	23.3	CXCL13
0.84	23.2	19.9	2.30	24.6	22.0	CXCL14
0.96	26.1	22.6	2.64	27.6	24.8	CXCL2
0.78	24.9	21.7	2.64	26.7	23.9	CXCL3
0.73	24.0	20.9	1.52	24.8	22.8	CXCL5
0.90	24.5	21.1	3.25	25.3	22.2	CXCL6
0.84	24.4	21.1	2.00	25.1	22.7	CXCL9
1.27	24.1	20.2	2.30	25.6	23.0	CARD18
0.78	22.4	19.2	14.93	26.9	21.6	IFNA2
3.12	25.0	19.8	17.15	27.8	22.3	IL10
10.85	27.0	20.0	1.23	24.3	22.6	IL10RA
0.96	24.3	20.8	3.03	25.9	22.9	IL10RB
14.32	28.2	20.8	27.86	28.9	22.7	IL13
0.96	24.5	21.0	2.14	25.3	22.8	IL13RA1
1.36	24.9	20.9	2.64	25.9	23.1	IL17C
0.96	23.5	20.0	12.13	27.0	22.0	IL1A
30.70	29.0	20.5	42.22	28.7	21.9	IL1B
1.27	24.5	20.6	2.64	25.3	22.5	IL1F10
0.90	24.5	21.1	2.46	25.1	22.4	IL36RN
0.90	23.1	19.7	2.14	24.9	22.4	IL36A
0.90	23.3	19.9	1.87	24.6	22.3	IL37
0.84	23.4	20.1	1.41	24.5	22.6	IL36B
0.96	23.9	20.4	2.64	25.4	22.6	IL36G
0.73	23.1	20.0	1.87	24.6	22.3	IL1R1
0.78	23.8	20.6	1.87	24.9	22.6	IL1RN
0.59	24.6	21.8	4.29	27.0	23.5	IL22
0.96	23.9	20.4	2.83	25.1	22.2	IL5
0.78	24.8	21.6	1.74	25.3	23.1	IL5RA
37.79	29.2	20.4	59.71	29.3	22.0	IL8
0.68	24.8	21.8	2.83	26.0	23.1	CXCR1
0.73	24.1	21.0	2.00	24.9	22.5	CXCR2
1.18	24.7	20.9	2.00	25.8	23.4	IL9
0.90	24.1	20.7	1.62	25.0	22.9	IL9R
1.03	23.9	20.3	2.00	25.1	22.7	LTA
1.27	26.1	22.2	2.46	27.0	24.3	LTB
0.96	23.6	20.1	2.14	25.0	22.5	LTB4R
1.45	24.6	20.5	2.00	25.3	22.9	MIF
0.68	25.4	22.4	6.96	28.2	24.0	AIMP1
0.73	24.7	21.6	0.650671	25.8	22.8	SPP1
11.63	28.6	21.5	0.057512	28.6	23.3	TNF
1.10	24.7	21.0	0.303549	25.4	22.7	CD40LG
1.27	25.2	21.3	0.607097	26.3	22.6	TOLLIP
1.10	25.1	21.4	0.650671	25.9	22.9	XCR1
15.1369	16.28	19.8	15.1369	16.28	19.8	B2M
515.5612	19.29	27.9	515.5612	19.29	27.9	HPRT1
1	22.9	22.5	1	22.9	22.5	RPL13A
0.6156	24.4	23.3	0.6156	24.4	23.3	GAPDH
0.6598	21.7	20.7	0.6598	21.7	20.7	ACTB
1.3195	27.9	27.9	1.3195	27.9	27.9	HGDC
1.0943	28.27	28	1.0943	28.27	28	RTC

1.3195	27.7	27.7	1.3195	27.7	27.7	RTC
1.3195	28.6	28.6	1.3195	28.6	28.6	RTC
0.3536	22.1	20.2	0.3536	22.1	20.2	PPC
2.114	18.22	18.9	2.114	18.22	18.9	PPC
0.6242	19.18	18.1	0.6242	19.18	18.1	PPC

Fold Change	المجموعة 10		Fold Change	المجموعة 9		رمز الجين
	Acut/Cont	Cont.		Acute	Acut/Cont	
1.49	23.3	21.7	1.12	23.7	19.5	ABCF1
0.06	23.7	26.8	1.82	24.7	19.8	BCL6
1.39	23.4	21.9	1.20	23.9	19.6	C3
1.72	22.7	20.9	1.28	23.1	18.7	C4A
51.27	28.6	21.9	1.04	23.8	19.7	C5
77.71	30.3	23.0	31.12	29.4	20.4	CCL1
1.72	24.4	22.6	13.55	28.2	20.4	CCL11
1.72	25.3	23.5	7.26	28.1	21.2	CCL13
1.97	24.3	22.3	1.47	24.6	20.0	CCL15
1.97	25.6	23.6	1.69	25.8	21.0	CCL16
1.84	24.6	22.7	0.97	24.6	20.6	CCL17
219.79	31.5	22.7	1.20	24.6	20.3	CCL18
0.99	23.6	22.6	1.04	24.6	20.5	CCL19
135.30	29.9	21.8	10.27	26.9	19.5	CCL2
1.21	23.0	21.7	0.79	23.2	19.5	CCL20
1.49	23.9	22.3	1.04	23.9	19.8	CCL21
1.13	23.1	21.9	1.12	23.6	19.4	CCL23
0.03	23.5	27.7	0.85	23.1	19.3	CCL24
2.27	23.6	21.4	0.52	22.7	19.6	CCL25
0.04	26.3	29.9	1.12	26.6	22.4	CCL26
1.60	23.3	21.6	0.79	23.3	19.6	CCL3
1.84	24.0	22.1	0.74	23.5	19.9	CCL4
1.49	24.2	22.6	5.13	27.0	20.6	CCL5
2.99	25.0	22.4	0.97	24.3	20.3	CCL7
1.49	23.2	21.6	1.12	23.8	19.6	CCL8
1.39	23.3	21.8	0.97	23.8	19.8	CCR1
8.46	27.1	23.0	1.04	25.0	20.9	CCR2
2.99	24.4	21.8	0.97	23.6	19.6	CCR3
3.68	24.8	21.9	1.47	24.3	19.7	CCR4
5.58	24.5	21.0	0.97	22.8	18.8	CCR5
1.72	23.8	22.0	0.91	23.8	19.9	CCR6
2.99	25.1	22.5	1.47	24.7	20.1	CCR7
1.49	24.2	22.6	1.04	24.3	20.2	CCR8
1.39	23.2	21.7	0.79	23.3	19.6	CCR9
0.11	24.7	26.9	0.56	24.3	21.1	CEBPB
2.27	23.8	21.6	0.64	23.1	19.7	CRP
83.29	31.3	23.9	1.82	26.3	21.4	CX3CR1
27.47	28.7	22.9	19.16	28.2	19.9	CXCL1
1.49	23.4	21.8	35.75	28.8	19.6	CXCL10
1.97	24.1	22.1	0.97	23.8	19.8	CXCL11
1.30	24.3	22.9	0.91	24.6	20.7	CXCL12

47.84	29.4	22.8	1.12	24.8	20.6	CXCL13
1.84	23.5	21.6	0.52	23.5	20.4	CXCL14
67.65	30.8	23.7	2.75	26.4	20.9	CXCL2
1.49	24.7	23.1	1.69	25.1	20.3	CXCL3
1.39	23.6	22.1	0.97	23.7	19.7	CXCL5
2.27	24.1	21.9	0.91	23.6	19.7	CXCL6
1.49	23.9	22.3	1.47	24.5	19.9	CXCL9
1.30	24.1	22.7	0.97	24.4	20.4	CARD18
1428.22	32.5	21.0	76.64	29.1	18.8	IFNA2
33.82	27.8	21.7	27.10	28.5	19.7	IL10
1.13	23.1	21.9	1.04	23.6	19.5	IL10RA
2.60	25.3	22.9	1.69	25.0	20.2	IL10RB
1.13	23.6	22.4	1.20	24.3	20.0	IL13
0.03	23.8	28.0	1.12	24.1	19.9	IL13RA1
2.11	24.7	22.6	1.20	24.7	20.4	IL17C
1.49	23.0	21.4	101.13	29.9	19.2	IL1A
290.02	30.6	21.4	19.16	27.7	19.4	IL1B
1.97	24.3	22.3	0.85	23.8	20.0	IL1F10
1.84	24.0	22.1	0.97	24.0	20.0	IL36RN
1.39	23.3	21.8	1.12	23.9	19.7	IL36A
1.13	23.1	21.9	0.91	23.7	19.8	IL37
1.13	23.0	21.8	0.91	23.7	19.8	IL36B
1.21	23.7	22.4	1.20	24.1	19.8	IL36G
1.39	23.4	21.9	0.91	23.5	19.6	IL1R1
1.84	23.1	21.2	1.04	23.8	19.7	IL1RN
1.06	24.5	23.4	2.39	25.6	20.3	IL22
1.21	23.2	21.9	1.20	24.1	19.8	IL5
1.30	24.3	22.9	0.97	24.6	20.6	IL5RA
1.30	23.1	21.7	19.16	27.8	19.5	IL8
1.84	24.5	22.6	0.85	24.1	20.3	CXCR1
1.60	23.6	21.9	1.12	23.9	19.7	CXCR2
1.39	24.8	23.3	1.69	25.8	21.0	IL9
1.49	24.2	22.6	1.12	24.7	20.5	IL9R
1.49	24.0	22.4	0.97	24.2	20.2	LTA
1.13	25.8	24.6	6.32	27.7	21.0	LTB
1.49	23.7	22.1	1.04	24.6	20.5	LTB4R
0.03	23.7	27.9	0.74	23.9	20.3	MIF
0.37	24.9	25.3	2.57	26.3	20.9	AIMP1
1.72	24.3	22.5	1.12	24.6	20.4	SPP1
58.89	29.6	22.7	17.88	28.9	20.7	TNF
1.49	24.0	22.4	0.69	24.2	20.7	CD40LG
2.43	24.9	22.6	1.04	24.6	20.5	TOLLIP
2.99	25.2	22.6	0.91	24.7	20.8	XCR1
15.1369	16.28	19.8	1.12	23.7	19.5	B2M
515.5612	19.29	27.9	15.1369	16.28	19.8	HPRT1
1	22.9	22.5	515.5612	19.29	27.9	RPL13A
0.6156	24.4	23.3	1	22.9	22.5	GAPDH
0.6598	21.7	20.7	0.6156	24.4	23.3	ACTB
1.3195	27.9	27.9	0.6598	21.7	20.7	HGDC
1.0943	28.27	28	1.3195	27.9	27.9	RTC

1.3195	27.7	27.7	1.0943	28.27	28	RTC
1.3195	28.6	28.6	1.3195	27.7	27.7	RTC
0.3536	22.1	20.2	1.3195	28.6	28.6	PPC
2.114	18.22	18.9	0.3536	22.1	20.2	PPC
0.6242	19.18	18.1	2.114	18.22	18.9	PPC

Fold Change	المجموعة 12		Fold Change	المجموعة 11		رمز الجين
	Acut/Cont	Cont.		Acute	Acut/Cont	
0.21	21.6	23.5	0.50	25.2	22.7	ABCF1
0.33	22.6	23.8	1.07	26.0	22.4	BCL6
0.22	22.2	24.0	0.62	25.7	22.9	C3
0.36	21.7	22.8	1.07	25.4	21.8	C4A
14.12	27.8	23.6	0.00	25.8	32.2	C5
10.70	28.5	24.7	0.76	26.8	23.7	CCL1
0.36	23.5	24.6	0.47	26.1	23.7	CCL11
0.16	23.5	25.8	0.33	27.1	25.2	CCL13
0.44	23.1	23.9	0.57	26.2	23.5	CCL15
0.10	22.0	24.9	0.66	27.0	24.1	CCL16
0.44	23.6	24.4	0.87	26.8	23.5	CCL17
30.27	29.9	24.6	0.00	26.7	31.1	CCL18
0.13	21.8	24.4	0.35	25.7	23.7	CCL19
24.59	28.1	23.1	7.46	29.4	23.0	CCL2
16.22	27.9	23.5	0.38	25.0	22.9	CCL20
0.19	22.0	24.0	0.54	25.7	23.1	CCL21
0.18	21.5	23.6	0.66	25.3	22.4	CCL23
0.22	21.3	23.1	0.71	25.2	22.2	CCL24
0.22	21.3	23.1	0.54	24.8	22.2	CCL25
0.13	24.1	26.7	0.71	28.3	25.3	CCL26
0.18	21.4	23.5	0.71	25.3	22.3	CCL3
0.38	22.6	23.6	0.81	25.6	22.4	CCL4
3.53	26.0	23.8	1.87	26.3	21.9	CCL5
0.47	23.7	24.4	0.87	26.8	23.5	CCL7
13.18	29.9	25.8	0.38	24.9	22.8	CCL8
0.44	21.9	22.7	0.50	25.4	22.9	CCR1
0.22	23.4	25.2	0.50	26.4	23.9	CCR2
0.36	22.7	23.8	0.50	25.1	22.6	CCR3
0.24	22.4	24.1	9.19	29.7	23.0	CCR4
42.81	28.5	22.7	5.66	27.9	21.9	CCR5
0.29	22.6	24.0	1.00	26.3	22.8	CCR6
17.39	28.9	24.4	6.50	29.7	23.5	CCR7
0.31	22.8	24.1	0.54	26.2	23.6	CCR8
0.41	22.4	23.3	0.71	25.7	22.7	CCR9
3.07	26.8	24.8	0.01	26.6	30.1	CEBPB
0.31	22.0	23.3	1.00	25.8	22.3	CRP
14.12	33.9	29.7	2.14	29.8	25.2	CX3CR1
10.70	27.0	23.2	4.59	28.5	22.8	CXCL1
5.35	25.5	22.7	1.41	27.0	23.0	CXCL10
19.97	28.6	23.9	0.33	24.9	23.0	CXCL11
9.99	28.0	24.3	0.47	26.1	23.7	CXCL12

1.65	25.6	24.5	0.00	25.9	30.7	CXCL13
0.25	21.5	23.1	0.54	25.1	22.5	CXCL14
6.15	29.7	26.7	0.38	27.5	25.4	CXCL2
6.59	28.8	25.7	0.33	26.7	24.8	CXCL3
0.33	22.4	23.6	0.66	25.7	22.8	CXCL5
0.15	21.5	23.9	0.62	25.8	23.0	CXCL6
3.78	26.4	24.1	0.62	26.4	23.6	CXCL9
0.00	24	31.3	0.00	25.4	29.7	CARD18
12.30	26.7	22.7	6.50	28.4	22.2	IFNA2
4.35	25.7	23.2	8.00	29.4	22.9	IL10
0.19	20.9	22.9	0.62	24.9	22.1	IL10RA
0.06	21.0	24.6	0.44	25.7	23.4	IL10RB
10.70	27.7	23.9	0.50	25.5	23.0	IL13
0.14	22.3	24.8	0.71	26.9	23.9	IL13RA1
0.19	22.0	24.0	0.66	25.7	22.8	IL17C
0.25	21.6	23.2	0.50	25.1	22.6	IL1A
28.25	27.9	22.7	8.57	28.8	22.2	IL1B
0.14	21.3	23.8	0.62	25.9	23.1	IL1F10
0.15	21.5	23.9	0.93	26.6	23.2	IL36RN
0.00	23.4	N/A	0.29	24.8	23.1	IL36A
10.70	27.3	23.5	0.33	24.9	23.0	IL37
0.21	21.5	23.4	0.35	24.9	22.9	IL36B
0.12	21.3	24.0	0.27	25.0	23.4	IL36G
3.53	25.6	23.4	0.35	24.7	22.7	IL1R1
1.54	22.1	21.1	0.57	25.3	22.6	IL1RN
9.99	29.1	25.4	0.41	26.5	24.3	IL22
13.18	27.8	23.7	0.38	24.9	22.8	IL5
0.22	22.8	24.6	0.81	26.9	23.7	IL5RA
49.18	29.0	23.0	4.92	28.1	22.3	IL8
0.25	22.2	23.8	1.07	26.6	23.0	CXCR1
1.54	23.5	22.5	0.00	26.1	N/A	CXCR2
0.00	24.9	34.8	0.23	26.0	24.6	IL9
0.22	22.6	24.4	0.31	25.7	23.9	IL9R
12.30	27.8	23.8	0.44	25.6	23.3	LTA
0.15	22.9	25.3	1.00	26.8	23.3	LTB
0.33	22.9	24.1	0.38	25.0	22.9	LTB4R
0.05	19.7	23.6	1.07	25.8	22.2	MIF
0.11	23.2	26.0	0.25	27.0	25.5	AIMP1
0.22	22.8	24.6	0.44	25.9	23.6	SPP1
4.66	26.8	24.2	6.50	29.3	23.1	TNF
0.12	22.7	25.4	0.62	27.2	24.4	CD40LG
0.38	23.0	24.0	1.62	27.1	22.9	TOLLIP
0.44	23.8	24.6	15.1369	16.28	19.8	XCR1
15.1369	16.28	19.8	515.5612	19.29	27.9	B2M
515.5612	19.29	27.9	1	22.9	22.5	HPRT1
1	22.9	22.5	0.6156	24.4	23.3	RPL13A
0.6156	24.4	23.3	0.6598	21.7	20.7	GAPDH
0.6598	21.7	20.7	1.3195	27.9	27.9	ACTB
1.3195	27.9	27.9	1.0943	28.27	28	HGDC

جدول 3 : قيم التعبير الجيني (التغير التضاعفي Fold change) لجينات المجموعة الأولى مع رمز الجين وموقعه في مصفوفة ال Real Time PCR-Array.

قيم التعبير الجيني المرتفعة عن السيطرة				
الموقع	الرمز	السيطرة	مجموعة 1	Fold change
A02	BCL6	0.003906	0.033493	8.5742
A11	CCL17	0.003906	0.033493	8.5742
A12	CCL18	0.002405	0.019237	8
B01	CCL19	0.002405	0.019237	8
B02	CCL2	0.003906	0.033493	8.5742
B03	CCL20	0.003906	0.033493	8.5742
B04	CCL21	0.003906	0.033493	8.5742
B12	CCL7	0.027205	0.615572	22.6274
C08	CCR7	0.003906	0.033493	8.5742
C11	CEBPB	0.003906	0.033493	8.5742
D02	CXCL1	0.001953	0.03125	16
D04	CXCL11	0.025383	0.615572	24.2515
D12	CXCL9	0.033493	2	59.7141
E02	IFNA2	0.003906	0.033493	8.5742
E03	IL10	0.003906	0.033493	8.5742
E04	IL10RA	0.003906	0.033493	8.5742
E08	IL17C	0.007289	0.378929	51.9842
E09	IL1A	0.003906	0.033493	8.5742
E10	IL1B	0.002405	0.015625	6.498
F04	IL36G	0.003906	0.033493	8.5742
F06	IL1RN	0.007289	0.378929	51.9842
F10	IL8	0.003906	0.033493	8.5742
G06	MIF	0.00085	0.025383	29.8571
G09	TNF	0.002405	0.019237	8
G11	TOLLIP	0.466516	0.000228	0.0005
قيم التعبير الجيني المنخفضة عن السيطرة				
الموقع	الرمز	السيطرة	مجموعة 2	Fold change
A03	C3	0.013602	0.001202	0.0884
A06	CCL1	1	0.25	0.25
B09	CCL3	0.025383	0.002405	0.0947
B11	CCL5	0.014579	0.002405	0.1649
D05	CXCL12	0.108819	0.009618	0.0884
F05	IL1R1	0.435275	0.038473	0.0884

جدول 4 : قيم التعبير الجيني (التغير التضاعفي Fold change) لجينات المجموعة الثانية مع رمز الجين وموقعه في مصفوفة ال Real Time PCR-Array.

قيم التعبير الجيني المرتفعة عن السيطرة				
الموقع	الرمز	السيطرة	مجموعة 2	Fold change
A02	BCL6	157.586485	9410.136924	59.7141
A11	CCL17	22.627417	147.033389	6.498
A12	CCL18	13.928809	68.593502	4.9246

45.2548	8779.968205	194.011721	CCL19	B01
36.7583	37640.5477	1024	CCL2	B02
8	39.396621	4.924578	CCL20	B03
18.3792	64	3.482202	CCL21	B04
0.0127	24.251465	1910.851567	CCL7	B12
21.1121	1552.093764	73.516695	CCR7	C08
8	39.396621	4.924578	CEBPB	C11
90.5097	11585.2375	128	CXCL1	D02
34.2968	35119.87282	1024	CXCL11	D04
6.498	147.033389	22.627417	CXCL9	D12
45.2548	3104.187528	68.593502	IFNA2	E02
51.9842	13307.94326	256	IL10	E03
42.2243	111.430472	2.639016	IL10RA	E04
6.498	147.033389	22.627417	IL17C	E08
27.8576	2048	73.516695	IL1A	E09
6.498	147.033389	22.627417	IL1B	E10
48.5029	630.34594	12.996038	IL36G	F04
48.5029	630.34594	12.996038	IL1RN	F06
59.7141	9410.136924	157.586485	IL8	F10
42.2243	111.430472	2.639016	MIF	G06
6.498	147.033389	22.627417	TNF	G09
0.0004	1	2702.352201	TOLLIP	G11
<b>قيم التعبير الجيني المنخفضة عن السيطرة</b>				
0.8706	32	36.758347	C3	A03
0.7071	477.712892	675.58805	CCL1	A06
0.4061	512	1260.691879	CCL3	B09
0.7579	12.125733	16	CCL5	B11
0.8706	32	36.758347	CXCL12	D05
0.0103	16	1552.093764	IL1R1	F05

جدول 5: قيم التعبير الجيني (التغير التضاعفي Fold change) لجينات المجموعة الثالثة مع رمز الجين وموقعه في مصفوفة الـ Real Time PCR-Array.

<b>قيم التعبير الجيني المرتفعة عن السيطرة</b>				
Fold change	مجموعة 3	السيطرة	الرمز	الموقع
22.6274	1351.176101	59.714111	BCL6	A02
10.0561	49.52208	4.924578	CCL17	A11
6.498	147.033389	22.627417	CCL18	A12
6.498	147.033389	22.627417	CCL19	B01
0.0312	51.984153	1663.492908	CCL2	B02
9.8492	59.714111	6.062866	CCL20	B03
97.0059	1552.093764	16	CCL21	B04
18.3792	59.714111	3.24901	CCL7	B12
6.498	147.033389	22.627417	CCR7	C08
45.2548	3104.187528	68.593502	CEBPB	C11
32	8192	256	CXCL1	D02
11.3137	55.715236	4.924578	CXCL11	D04
19.6983	337.794025	17.148375	CXCL9	D12

19.6983	3326.985815	168.897013	IFNA2	E02
59.7141	2521.383759	42.224253	IL10	E03
32	2048	64	IL10RA	E04
21.1121	1552.093764	73.516695	IL17C	E08
18.3792	59.714111	3.24901	IL1A	E09
9.8492	59.714111	6.062866	IL1B	E10
78.7932	1024	12.996038	IL36G	F04
137.187	21618.81761	157.586485	IL1RN	F06
0.0474	73.516695	1552.093764	IL8	F10
27.8576	1448.154688	51.984153	MIF	G06
59.7141	9410.136924	157.586485	TNF	G09
0.0004	1	2702.352201	TOLLIP	G11
<b>قيم التعبير الجيني المنخفضة عن السيطرة</b>				
0.8706	32	36.758347	C3	A03
0.7071	9.849155	13.928809	CCL1	A06
0.0009	1	1097.496026	CCL3	B09
0.1539	415.873227	2702.352201	CCL5	B11
0.1539	415.873227	2702.352201	CXCL12	D05
0.5	238.856446	477.712892	IL1R1	F05

University of Mosul  
College of Science



# **Bioinformatics: Effect of Human Papilloma Viruses Infection on Gene Expression Profile**

M.Sc Thesis Submitted By

**Amina Thanoon Hamid AL-Dabbagh**

**To**

Council of college of science University of Mosul in partial

fulfillment of the requirement for the degree of

Master's degree

**in**

**Biology / Microbiology**

Supervised by

**Dr. Abdulrhem Thonoon Younis AL-Ghazal**

---

**1438 A.H**

**2017 A.D**

## Abstract

Bioinformatics is a new important scientific field used to understand the nature of relationship between biology and other scientific fields then connect these fields with computer and net sites to get new information with biological sense and conclude new and unprecedented results. Human papilloma virus (HPV) is one of the most common causes of sexually transmitted disease in both men and women worldwide. HPVs are associated with a variety of clinical conditions that range from innocuous lesions to cervix cancer. Three groups of up regulated immune-inflammatory genes (25 genes with 3 replicates) that affected by human papilloma virus especially types 16, 18, 31, and 45 were subjected to this study. Bioinformatics is an emerging scientific discipline used in this study as new technology to organize, analyze, and distribute biological information of genes affected by HPVs. Data analysis of Real-time-reverse transcription PCR-array (RT-PCR-array) is one of the most sensitive and reliable method used to analyze the effect of HPV on the expression of 84 human immune genes. Gene ontology is a new bioinformatics method mainly provides typical batch annotation and gene analysis used to highlight the most important functions of up regulated genes after HPV infections. Results revealed that HPV infections up regulated 25 immune genes ranged between 6.47 fold change with CCL18 gene and 79.22 fold change with IL1RN gene. Infections with HPVs also caused down regulation of expression of 6 genes ranged between 0.16 fold change with CCL3 and 0.55 fold change with CCL1 gene. The immune-inflammatory gene expression profile for host affected with HPV was 25 up regulated genes: 6 down regulated genes. The infection with HPVs has impact on 9 key immunological pathways. Using Gene Ontology the sites affected (up and down regulated genes) by HPVs were determined on immunological pathways.

In Cytokine- Cytokine Receptor Interaction pathway 18 immune gene effected in this pathway *IL-8*, *CXCL9*, *CXCL11*, *CCL20*, *CCL17*, *CCL19*, *CCL21*, *CCL2*, *CCL7*, *CCR7*, *CCL18*, *INF- $\alpha$* , *IL-10*, *IL-10RA*, *CD40LG*, *TNF*, *IL-1A*, *IL-1B*. and Chemokine signaling pathway effected by 2 genes chemokine and chemokineR While Toll-like receptors signaling pathway effected by 6 genes in the end of this pathway *TNF- $\alpha$* , *IL-1B*, *IL-8*, *INF- $\alpha$* , *MIG*, *CXCL11( I-TAC )*. The NOD-like receptor signaling pathway shows the effect on 4 genes *IL-8*, *CCL2*, *TNF- $\alpha$* , *IL-1B*. and Asthma signaling pathway effected by 3 genes *TNF- $\alpha$* , *IL-10*, *CD10L*. while Graft-versus-host disease pathway effected by 2 genes *IL-10*, *TNF- $\alpha$* . and Rig-1-like receptor signaling

pathway shows the effected on 3 genes also *INF- α* , *IL-8*. Apoptosis pathway effected by 2 genes *TNF- α* , *IL-10* .finally T-cell receptor signaling pathway effected by 3 genes *TNF- α*, *IL-10* , *CD40LG*.