



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

تعدد الأشكال لجيني عاملي التخثر الثامن والتاسع لمرض نزف الدم الوراثي نوع A و B في ديالى

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى كجزء من متطلبات
نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

صابرين عبدالعالي محمد الصعبي

بكالوريوس علوم حياة 2010

كلية العلوم / جامعة ديالى

بإشراف

أ.د. عمار احمد سلطان القره غولي

1. المقدمة Introduction

1 – 1 مرض نزف الدم الوراثي نوع A و B Hemophilia A and B

مرض نزف الدم الوراثي Hemophilia A and B هو اضطرابات نزفية نادرة مرتبطة بالكروموسوم الجنسي X وتسببها طفرات في الجينات المشفرة لعامل التخثر الثامن FVIII والتاسع FIX (Kwak وآخرون، 2020). من بين أكثر من 6000 من الأمراض البشرية التي تسببها عيوب جينية واحدة، تعد حالات نقص التخثر الوراثي من الأمراض النادرة وفقًا للتعريفات المعتمدة في الولايات المتحدة أقل من 200000 حالة على مستوى البلاد وأوروبا أقل من 5 حالات لكل 10000 شخص في عموم السكان (Khosla و Valdez، 2018). تصنف شدة مرض نزف الدم الوراثي حسب مستوى البلازما لنشاط العامل الثامن FVIII أو العامل التاسع FIX و يتم تعريف الشكل الحاد للهيموفيليا على أنه مستوى العامل >1% من المعدل الطبيعي، والشكل المعتدل لمستوى العامل يكون <5 و >40% (Blanchette وآخرون، 2014). ان المرضى الذين يعانون من الهيموفيليا الشديدة يصابون بالنزيف بشكل متكرر في المفاصل أو العضلات أو الأنسجة الرخوة دون أي سبب واضح ويمكنهم أيضا أن يعانون من نوبات النزيف التي تهدد الحياة مثل النزيف داخل الجمجمة، أما الأشخاص الذين يعانون من نقص خفيف ومتوسط في العامل نادرا ما يعانون من نزيف تلقائي، وغالبا ما يحدث النزيف لديهم بعد الجرح او الاصابة (Mannucci، 2020). يرتبط نشاط العامل بشكل عام بالخصائص السريرية ومع ذلك فإن الاعراض الظاهرية للنزيف تكون متباينة بين الأفراد الذين لديهم نفس مستويات العامل (Santagostino وآخرون، 2018). أن مرضى هيموفيليا HB يكون لديهم النزيف اقل حدة مقارنة مع مرضى هيموفيليا HA الذين لديهم نفس مستوى البلازما المتبقية (Marchesini وآخرون، 2021). ان الخارطة الجينية لجين العامل الثامن F8 تشير الى موقع هذا الجين في النهاية البعيدة للذراع الطويل للكروموسوم X (Xq28) ويشكل حوالي 186 كيلو زوج قاعدي من الحمض النووي المجيني. ويتكون من 26 اكسون Exons والتي تقوم بالتشفير لسلسلة متعدد الببتيد مكونة من 2351 حامض اميني (Batty، 2016)، أن مرض هيموفيليا A يعود إلى العديد من الطفرات المتباينة والتي تنتشر في جميع أنحاء الجين وغالبيتها تكون طفرات نقطية او طفرات اعادة ترتيب (Jamil وآخرون، 2019).

تشير الخارطة الوراثية لجين العامل التاسع F9 إلى وجوده على الكروموسوم الجنسي X أي في المنطقة Xq27.1 ، يقوم الجين بتشفير لبروتين سكري مكون من 415 من الأحماض الأمينية ، والتي تظهر عادة في البلازما ، والتي تعد مكونًا أساسيًا في سلسلة التخثر (Smolkin و Perrotta , 2017) . هذا البروتين هو بروتين سيرين يعتمد على فيتامين K ويحتوي على ستة مجالات رئيسية: بيتيد الإشارة ، والبيتيد الأولي ، ومجال الكلايسين ، ومجالان يشبهان عامل نمو البشرة (مثل EGF) ، ومجالات التنشيط والتحفيز (Balestra و Branchini , 2019) . تم تحديد أنواع مختلفة من الطفرات ، وخاصة الطفرات النقطية ، في جميع أجزاء الجين F9 ، وخاصة في الاكسون الذي يشفر لمجال سيرين بروتين (ABLA واخرون, 2018) ، أن هذه الطفرات تكون متباينة اي ان المرضى يحملون انواع لطفرات مختلفة (George واخرون, 2017) . نظرا للطبيعة الجزيئية لمورث العامل الثامن (FVIII) والعامل التاسع (FIX) من حيث الحجم والتركيب ، قام عدد من الباحثين بتصميم تقنيات جزيئية وتطويرها للكشف عن الطفرات المسببة لمرض نزف الدم الوراثي HA و HB والتميط الجيني للمرض (Villarreal-Martínez واخرون, 2020 : Janczar واخرون, 2020)، ومن الطرق الجزيئية المستخدمة في الوقت الحاضر للكشف عن التغيرات الوراثية وتحديد نوع الطفرات في جين العامل الثامن والتاسع والمسببة لمرض نزف الدم الوراثي وهي تقنية التعدد الشكلي للنيوكلويدة المفردة (Single nucleotid polymorphism technology(SNPs) وهذه التقنية عبارة عن تغيير قاعدة نيوكلويدة مفردة في تسلسل الحامض النووي ، وتشمل SNPs اكثر من 90% من الاختلافات الجينية بين الافراد في الجينوم البشري (Song واخرون, 2016) . تضم تقنية تعدد اشكال النيوكلويدة المفردة خصائص متعددة لتحليل الجينات ورسم الخارطة الجينية (Grzegorzcyk واخرون, 2021) .

1 – 2 أهداف الدراسة Aims of study

- 1 – الكشف عن التغيرات الوراثية الجزيئية على مستوى النيوكلويدة المفردة في كل من الاكسون 18 والاكسون 24 لجين عامل تخثر الدم الثامن FVIII لمرضى نزف الدم الوراثي نوع A وكذلك في كل من الاكسون 1 والاكسون 5 لجين عامل تخثر الدم التاسع FIX لمرضى نزف الدم الوراثي نوع B.
- 2 – الكشف عن بعض التغيرات الدموية ووظائف بعض انزيمات الكبد في مرضى نزف الدم الوراثي نوع A و B ومقارنة نتائجها مع نتائج الاشخاص الاصحاء .

الخلاصة

مرض نزف الدم الوراثي Hemophilia A and B هو اضطرابات نادرة في نزيف الدم ترتبط بالكروموسوم الجنسي X وتسببها طفرات في الجينات المشفرة لعامل تخثر الدم الثامن FVIII والتاسع FIX. يشفر كل من جيني F8 و F9 عاملي التخثر FVIII وFIX والذان يمثلان عاملين مهمين في عملية تكوين خثرة الدم. اجريت الدراسة الحالية على مجموعة من مرضى نزف الدم الوراثي نوع A و B في مستشفى بعقوبة التعليمي/مركز أمراض الدم محافظة ديالى ، للفترة من شهر تشرين الاول لعام 2020 ولغاية شهر اذار من العام 2021 وبلغ عدد عينات الدراسة 60 مريض (40 من نوع A و 20 من نوع B) وكان عدد عينات الاصحاء 20 عينة . تمت دراسة أربعة مواقع جينية أي منطقتين لكل جين اذ كانت القطع المدروسة للجين F8 بطول 139 زوج قاعدي و 226 زوج قاعدي ضمن الاكسون رقم 18 و الاكسون رقم 24 , بينما كانت المنطقتين الاخرى للجين F9 ذات الطول 131 زوج قاعدي و 158 زوج قاعدي ضمن الاكسون رقم 1 والاكسون رقم 5 , أظهرت النتائج تواجد المتغايرة rs1286329454 ضمن قطعة التضخيم ذات الطول 226 زوج قاعدي ضمن الجين F8 . بينما تواجدت المتغايرتين rs1927330499 و rs144314232 ضمن قطعتي التضخيم ذات الطول 131 زوج قاعدي و 158 زوج قاعدي على التوالي ضمن الجين F9 . فيما يخص القطعة المضخمة ذات الطول 226 زوج قاعدي والمتواجدة في الاكسون رقم 24 للجين F8, فقد اشارت النتائج الى وجود ثلاثة طرز وراثية مختلفة في نفس المكان المستهدف rs1286329454 في القطعة المضخمة , وهي G/G , G/A , و A/A , أبدى الطراز الوراثي المتغاير G/A تواجداً في أغلب العينات المدروسة , بينما أبدى الطراز الوراثي المتمثل G/G ميلاً واضحاً في عينات الاصحاء مقارنة بعينات المرضى , وابدى الطراز الوراثي المتمثل A/A تواجداً اكثر في عينات المرضى مقارنة بعينات الاصحاء . اظهرت نتائج التحليل الاحصائي ان تغاير الجين F8 في الموقع rs1286329454 يعد من عوامل الاستعداد لمرض نزف الدم الوراثي نوع A لوجود الطراز الوراثي المتغاير الزيجة G/A بنسبة 80 % واليالاته G و A بنسبة 52 % و 48 % على التوالي في المرضى , بينما سجل هذا الطراز نسبة 55 % واليالاته G و A بنسبة 57.5 % و 30 % على التوالي في الاصحاء . اما بالنسبة للقطعة المضخمة الاكسون رقم 18 لجين F8 لم يتم العثور على متغايرة عند مقارنة تسلسلاتها مع التسلسلات المرجعية وانما تم العثور على طفرات نقطية من نوع الانتقال والصامتة في المرضى مقارنة بالاصحاء . فيما يخص القطعة المضخمة ذات الطول 131 زوج قاعدي والمتواجدة في الاكسون رقم 1 للجين F9, فقد اشارت النتائج الى وجود ثلاثة طرز وراثية مختلفة في نفس المكان المستهدف