

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education & Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Science
Department of Biology



Genetic Study of Patients Haemophilia A

A thesis

Submitted to the Council of college of Education for Pure Science/Diyala
University In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of
Science in Biology
(Zoology)

By

Hind Taher qader Al-najar

B.Sc.Biology

Supervised by

Assis.Prof.Dr.Hameed M.Majeed

Dr. Mothana Abdel –Qader AlMahdawy

2013

1434

1 . المقدمة Introduction

1-1 مرض نزف الدم الوراثي نوع A

يُعرف مرض نزف الدم الوراثي نوع A Haemophilia A بأنه إعتلال نزفي وراثي خطير وشائع يصيب الإنسان ، وينتقل وراثياً عن طريق جينات متنحية Recessive genes مرتبطة بالجنس ومحمولة على كروموسوم الجنس X ، ولذلك يظهر المرض في الذكور بتكرار أعلى من ظهوره في الإناث وتظهر أعراض النزف على الذكور دون الإناث اللواتي يكن بدون أعراض asymptomatic، و تبلغ نسبة الإصابة بالمرض بين المواليد الذكور واحد لكل خمسة آلاف وتحثل نسبة المصابين منهم بمرض نزف الدم الوراثي نوع A 85% (Schwartz et al., 2005, Ceskych and Habart, 2012) ، ويحدث المرض بسبب نقص في عامل التخثر

الثامن FVIII نتيجة طفرات تصيب جين عامل التخثر الثامن *FVIII gene*، وفعالياً كل المصابين بالمرض ترافقهم طفرات إنقلاب مؤذية تحدث في تتابع جين العامل الثامن *F8gene* (Rossetti et al., 2011). وترتبط شدة المرض بمستويات فعالية عامل التخثر الثامن FVIII في الدم إذ يصنف المرض إلى حاد Severe عندما تكون مستويات فعالية العامل الثامن في بلازما الدم أقل من 1% وإلى Moderate عندما تكون مستويات فعالية العامل الثامن في بلازما الدم تتراوح بين 1-5% وإلى Mild عندما تكون مستويات فعالية العامل الثامن في بلازما الدم تتراوح بين 5-35% .

يقع الجين المسؤول عن تصنيع بروتين العامل الثامن قرب النهاية الطرفية من الذراع الطويل q لكروموسوم الجنس X (Xq28) يتألف الجين من 26 منطقة تشفير (Exons) ويمتد هذا المورث على مسافة 186Kb من الجينيوم . ويعطي جزيئة رنا مراسل mRNA على طول 9KB (Hay et al., 2000; McKenna et al., 2005; Tantawy, 2010) وهذا الجين يشفر إلى بروتين العامل الثامن (Lenting et al., 1988).

يحدث مرض نزف الدم الوراثي نوع A نتيجة العيوب الجزيئية في جين العامل الثامن التي تنشأ نتيجة سلسلة واسعة من الطفرات المتغايرة المنشأ Heterogeneous. ومن هذه الطفرات هي الطفرات النقطية التي تتضمن طفرات الحذف ، وطفرة الانقلاب ، والطفرة اللاحسية وطفرات تغير قالب القراءة وعدد كبير من الطفرات التي تحدث بموقع القطع والطفرة المفقودة

(Pattinson *et al.*, 1990, Awidi *et al.*, 2010, Rossetti *et al.*, 2011)

ومن أهم الطفرات المسببة لمرض نزف الدم الوراثي نوع A هي طفرات الانقلاب Inversion في الأنترون 22 من جين العامل الثامن *FVIII gene* ، وتحدث هذه الطفرة في 45-50% من حالات المصابين بالمرض الحاد ، وطفرة الانقلاب في الأنترون 1 وتشكل 5% من المصابين بالمرض (Andrikovics *et al.*, 2003).

إستناداً الى مركز UKHCDO (UK Haemophilia Center Doctors Organization) وشبكة مختبرات وراثة الهيموفيليا (Haemophilia genetics Laboratory Network) إنه يجب أولاً تحديد شدة مرض نزف الدم الوراثي في العائلة ؛ لأنها تؤثر في نوع الاستراتيجية المستخدمة للكشف عن الخلل الوراثي المسبب للمرض ؛ لأن الشكل الحاد للمرض severe haemophiliacs يتطلب أولاً الكشف عن حالات الانقلاب في الأنترون 22 والأنترون 1 بإعتباره المدخل المساعد في تحديد الطفرات المسببة للمرض الحاد بنسبة 45-50%. ولأهمية هذه الطفرات فقد عدّ الكشف عنها حجر الأساس ، والخطوة الأولى في الكشف عن نوع الطفرات المسببة للمرض (Chetta *et al.*, 2008).

نظراً للطبيعة الجزيئية لمورث العامل الثامن (من ناحية الحجم وتعقيد التركيب) يلاحظ أن عدداً كبيراً من الباحثين حاولوا تصميم التقنيات المبدعة وتطويرها للكشف عن الطفرات ، والتنميط الجيني للمرض (Rossetti *et al.*, 2011) .

وهناك طرائق عدة للكشف منها طريقة تحليل وصمة سوزرن Southren Blot التي وصفت من قبل (Lakich *et al.*,1993) إذ لاتزال هذه الطريقة تعد من الدراسات في منطقة التتميط الجيني لإنتقال Genotyping Inversion intron 22 ، وأستخدمت خلال التسعينات وبعد ذلك إبتكر Steven Sommer في الولايات المتحدة طريقة أبسط وأكثر سرعة وأقل كلفة وأكثر رغبة إذ استخدم تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction ؛ لذلك أصبحت هذه الطريقة هي الخيار البديل في العديد من المختبرات (Liu *et al.*,1997) . وقد صممت (Rossetti *et al.*,2005) طريقة بديلة لتشخيص Inv22 genotyping وهذه الطريقة هي تغير نواتج تفاعل البلمرة المقلوب (IS-PCR) Inverse Shifting –PCR وهي نوع مختلف من تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR وتستعمل عندما يراد مضاعفة قطعة دنا غير معروفة (لايتوافر لدينا بادئ متخصص لها) مرتبطة بأحد طرفي تتابع دنا معروفة. وطبقت هذه الطريقة لأول مرة في دولة مصر العربية من قبل الباحثة (Abou-Elew *et al.*,2011) على مجموعة من المصابين بمرض نزف الدم الوراثي نوع A .

1-2 الهدف من الدراسة :

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد أهمية الطفرات الناشئة في الأنترون 1 و 22 من جين *FVIII gene* ودورها في إحداث المرض في المجتمع العراقي باستخدام تقنية IS-PCR.

Summary

The study included a total of 44 samples collected from venous blood of male patients with Haemophilia type A from laboratories of both hospital Virgin educational / Baquba and hospital child protection in medicine / Baghdad for the period from (January and until April of 2012)

Withdraw the amount of 5 mL of venous blood and 2.5 mL put in a test tube container on coagulation inhibitor Tri-sodium citrate to see the effect of disease Haemophilia A on the blood clotting time (Prothrombin time and activated Partial Thromboplastin time) and FVIII activity concentration. The was used 2.5 to extract DNA undiminished oxygen DNA to analyze the disease-causing mutation technology IS-PCR.

The results of statistical analysis showed the absence of significant differences in prothrombin clotting time to the satisfaction patients when compared with natural value (Normal value) of the measure, on the grounds that the cause of the disease is due to a lack of a clotting factors that have a relationship in the process of blood clotting with the course of procedure and prothrombin clotting time test reflects the concentration and effectiveness normal clotting factors external of the way and made these factors in liver.

As the results of the statistical analysis indicated the presence of significant differences in the time of the partial thromboplastin clotting in patients when compared with nature value (Normal value) of measurement values to the fact that test time clotting thromboplastin partial reflects laboratory-effective to stop bleeding for coagulation factors with the course of procedure, which include (FXII, FXI, FX, FIX,