

دراسة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية والوراثية الجزيئية لمرضى التلاسيميا
في محافظة ديالى

نور عويد عودة و عمار أحمد سلطان

دراسة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية والوراثية الجزيئية لمرضى التلاسيميا في محافظة ديالى

نور عويد عودة و عمار أحمد سلطان

قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

الخلاصة

تهدف الدراسة الحالية إلى دراسة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية لمرضى التلاسيميا في محافظة ديالى ، وشملت الدراسة 72 مريضاً بالبيتا ثلاسيميا الكبرى خلال الفترة الممتدة من شهر أيلول 2015 ولغاية شهر أيار 2016 وكانت أعمارهم تتراوح بين (1.5 – 32) سنة وكذلك 32 شخص سليم غير مصاب بأمراض الدم الوراثية وكانت أعمارهم تتراوح بين (3- 25) سنة، وأظهرت نتائج الدراسة هناك ارتفاع في بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية إذ كان هناك زيادة كبيرة في مستوى أنزيم وظائف الكبد ALT إذ كان تركيزه في المرضى $U/L 23.74 \pm 29.53$ وفي الأصحاء كان 4.61 ± 11.67 ، وأيضا كانت هناك زيادة في مستوى الكرياتينين في المرضى $mmol/L 9.92 \pm 26.08$ وفي الأصحاء كان $mmol/L 0.89 \pm 3.96$ ، ماعدا اليوريا نلاحظ كان هناك انخفاض في تركيزها بالمرضى $mmol/L 68.06 \pm 51.54$ وفي الأصحاء كان $mmol/L 1.03 \pm 2.36$ وكان هناك زيادة في تركيز الحديد بالدم في المرضى 12.25 ± 35.43 وفي الأصحاء كان $Umol/L 9.10 \pm 20.44$ وأيضا انخفاض تركيز الكلوكون في المرضى وارتفاعه في الأصحاء $mmol/L 1.60 \pm 5.82$ و $mmol/L 82.62 \pm 19.27$ على التوالي ، نستنتج من هذه الدراسة حول بعض التغيرات الحاصلة على بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية لمرضى التلاسيميا يمكن أن تعزى إلى أمراض الكبد والقلب وكذلك إلى الفشل الكلوي والناشئ من سمية تركيز الحديد العالي والتي هي إحدى سمات مرض التلاسيميا . أما بالنسبة للدراسة الوراثية الجزيئية فتم عزل الدنا الكروموسومي من دم الأشخاص المصابين بالمرض ومن دم الأشخاص الأصحاء بأستعمال عدة الأستخلاص Genomic DNA mini kit blood protocol وكانت نقاوة الدنا المستخلص تتراوح بين 1.8- 2 وتم أستعمال بادئ واحد متخصص للكشف عن الطفرة النقطية (G-C) 5 . IVS.I باستخدام تقنية تضخيم الطفرة المعننة . ARMS – PCR

الكلمات المفتاحية: بيتا التلاسيميا ، تركيز الزائد للحديد ، اليوريا .

Studying the Some biochemical parameters and Molecular genetic study for thalassemia patients in Diyala province

Noor Owaid Ouida and Ammar Ahmed Sultan

Department of Biology – College of Education for pure Science – University of Diyala

Received 22 October 2016 ; Accepted 13 December 2016

Abstract

The present study aimed to study some Biochemical parameters in thalassemia patients in Diyala province , The study included 72 patients major beta thalassemia during the period from September until may of 2016, were the age between 1.5 to 32 years , as well as 32 healthy person with out genetic blood disease and were between the ages of 3 to 25 year , The study results showed a significant increase in the rate of biochemical parameters if there is a significant increase in the enzyme liver function ALT the concentration in patients was : 23.74 ± 29.53 U\L and in healthy was 4.61 ± 11.67 U\L , also there was an increase in the creatinine concentration patients 9.92 ± 26.08 mmol\L and in healthy was, 68.06 ± 51.54 mmol\L , the urea concentration was a decrease in of patients 0.89 ± 3.96 mmol\L and in healthy was 1.03 ± 2.36 mmol\L, there was an increase in iron concentration in patients 382.05 ± 64.37 Umol\L And in healthy was 9.48 ± 61.36 Umol\L, Decrease glucose concentration in patients and healthy height , 18.58 ± 28.59 Umol\L 9.10 ± 20.44 Umol\L respectively .the genetic molecular study show that been isolated DNA chromosomal of the blood of persons with the disease and blood healthy persons using several extraction Genetic DNA mini kit blood protocol the purity of DNA extracted between (1.8 – 2) and the use of one specialist to detect mutation raster the : IVS.I.5 (G-C) , using Amplification Refractory Mutation System (ARMS – PCR) .

Keyword: β – Thalassemia, Iron overload, urea

المقدمة

تعتبر الثلاسيميا Thalassaemia من أمراض اعتلال الهيموكلوبين الكمي التي تسبب اضطراباً بالتصنيع الحيوي لسلاسل البيبتيد في الهيموكلوبين مما يؤدي إلى اضطراب في أشكال ووظائف كريات الدم الحمراء [1] إذا ينتج هذا المرض بسبب طفرات نقطية وراثية في الجينات المسيطرة على إنتاج سلاسل البيبتيد من نوع ألفا أو بيتا وهناك نوعين رئيسيين من الثلاسيميا هي الفا ثلاسيميا α والبيتا ثلاسيميا β البيتا ثلاسيميا β -thalassaemia هي اضطراب وراثي والذي تسببه طفرات نقطية في موقع واحد أو أكثر من موقع جيني B-globin والتي تؤدي إلى انخفاض إنتاج الكلوبين B [2] مؤخرًا تم الكشف عن أكثر من 200 طفرة مختلفة تؤثر على مستويات تعبير الجين B-globin وتسبب مرض β -thalassaemia وهذه الطفرات لا تتوزع بشكل موحد، ولكن لديها خصوصية جغرافية وأصل عرقي كما يتميز هذا النوع من الثلاسيميا بوجود عدد قليل من الطفرات المشتركة وأرقام متغيرة من تلك النادرة [4] وتوجد مجموعة من الأعراض السريرية لمرض البيتا ثلاسيميا منها التعب وضيق التنفس وفقدان الشهية وضخامة الكبد والطحال وفشل القلب وتشوه العظام وتأخر في سن البلوغ، ويؤدي تطور المرض إلى نقص شديد في مستوى الهيموكلوبين في الدم والذي يتطلب نقل الدم بشكل دوري كل 3-4 أسابيع للمحافظة على نسبة عالية من الهيموكلوبين في الدم [3]. يمكن أن تقسم الثلاسيميا إلى:

1-الثلاسيميا الصغرى Thalassaemia Minor

هي شكل من أشكال البيتا ثلاسيميا وتعرف أيضاً بأسم (حامل لصفة بيتا ثلاسيميا) والتي تؤثر أعراضها على المريض [5]، وهذا النوع من الثلاسيميا يختلف عن باقي الأنواع في أن المريض يمتلك هيموكلوبين طبيعي في أليل بيتا كلوبين والأخر مصاب بمرض الثلاسيميا سواء كان شديد β^0 أو متوسط β^+ [6]، وقد تم الكشف عن المرضى الذين يعانون من هذه الأعراض من خلال الأختبارات الدموية الروتينية، ومن خلال هذه الأختبارات تم الكشف عن صغر خلايا الدم الحمراء في المرضى الذين يعانون من الثلاسيميا الصغرى لأن هناك خطر محتمل من أن تتطور هذه الأعراض إلى ثلاسيميا كبرى في حالة نقل الدم وكان الشخص الذي يعطي الدم مصاب بمرض الثلاسيميا [7].

2-الثلاسيميا الكبرى Thalassaemia Major

هي أكثر أنواع البيتا ثلاسيميا شدة وتأثير على المريض وفي هذه الحالة يتواجد عند المريض طفرة في كل جينات بيتا كلوبين والذي يؤدي بالنتيجة إلى قلة إنتاج سلاسل بيتا كلوبين [8]، إذا توجد ثلاثة أليلات هي المسؤولة عن النمط الظاهري لثلاسيميا هي β^0/β^0 و β^0/β^+ وأحياناً β^+/ β^+ [9]. أن الفائض من سلاسل ألفا كلوبين تنتشر في جميع أنحاء الجسم، وهذه الفائض من السلاسل يسبب تلف أغشية خلايا الدم الحمراء مما يؤدي إلى انحلال الدم داخل الأوعية الدموية [10]، وبالإضافة إلى ذلك هناك ضرر ودمار كبير لسلائف كريات الدم الحمراء RBC مما يسبب إنتاج كريات دم حمراء غير فعالة و يسبب فقر الدم الذي يكون خطير لأنه يوقف نقل الاوكسجين لخلايا [11]، أن بعض مرضى الثلاسيميا يموتون بسبب

دراسة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية والوراثية الجزيئية لمرضى التلاسيميا
في محافظة ديالى

نور عويد عودة و عمار أحمد سلطان

عمليات نقل الدم المتكررة والتي تسبب تراكم الحديد في أجسامهم ، وتوجد مجموعة من الأعراض السريرية لمرض البيتا ثلاسيميا منها التعب وضيق التنفس وفقدان الشهية وضخامة الكبد والطحال وفشل القلب وتشوه العظام وتأخر في سن البلوغ ، ويؤدي تطور المرض إلى نقص شديد في مستوى الهيموكلوبين في الدم والذي يتطلب نقل الدم بشكل دوري كل 3-4 أسابيع للمحافظة على نسبة عالية من الهيموكلوبين في الدم [12] . الهدف من الدراسة: الكشف عن الأنواع الشائعة من الطفرات النقطية في جين B-Globin وتقييم النواحي الكيميائية الحيوية والدموية لدى مرضى التلاسيميا في مجتمع ديالى DNA.

طريقة العمل

تم أخذ عينات مصل الدم من المرضى المصابين بمرض التلاسيميا أثناء مراجعتهم لمركز التلاسيميا في مستشفى البتول التعليمي للولادة والأطفال لغرض العلاج والعناية بهم ، وتم أخذ 72 عينة تم اختيارها من هؤلاء المرضى خلال فترة البحث من شهر أيلول 2015 إلى شهر أيار 2016 وكانت أعمارهم تتراوح من سنة ونصف – 32 سنة وبالنسبة إلى عمار الأشخاص الاصحاء كانت أعمارهم تتراوح بين (1.5 - 25) سنة وكانو خالين من أمراض الدم الوراثية ، أما المرضى فقد تم أخذ تاريخهم الطبي وكذلك إجراء فحوصات الدم عليهم في مختبر الدم في مستشفى البتول التعليمي إذا تم سحب 5ml من الدم وأجريت تحاليل الكيميائية الحيوية للنماذج في مختبر الدم في المستشفى ، وتم أخذ دم أشخاص أصحاء 32 عينة لأغراض المقارنة بأعمارهم أن دم هؤلاء الأشخاص هي نماذج سيطرة .

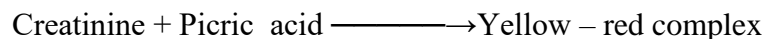
طرق قياس المؤشرات الكيميائية الحيوية :

1- قياس فعالية إنزيم Alanine amino transferase (ALT) في المصل .

تم تحديد فعالية إنزيم Alanine amino transferase في المصل باستخدام العدة التشخيصية المجهزة من شركة Randox (United Kingdom). وحددت فعالية إنزيم (ALT) بواسطة تنظيم تركيز pyruvate hydrazone المتكون مع 2-4-ثنائي نتروفنيل هيدرازين والذي يعطي لونا بنيا يمكن قياسه بواسطة جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 546 nm إذا تتناسب شدة اللون مع كمية الانزيم في المصل [13] .

2-تقدير مستوى الكرياتينين في مصل الدم

تم قياس مستوى الكرياتينين في مصل الدم بواسطة استخدام عدة التحليل المجهزة من قبل شركة Roche الالمانية ، ويستند هذا الفحص أو الاختبار اللونية الحركي على طريقة Jaffe . في المحلول القاعدي ، الكرياتينين يشكل من تجمع المركب أو المعقد الاصفر المحمر ، يتناسب معدل الصبغة الناتج طرديا مع تركيز الكرياتينين في العينة كما في المعادلة التالية .



دراسة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية والوراثية الجينية لمرضى التلاسيميا
في محافظة ديالى

نور عويد عودة و عمار أحمد سلطان

3-تقدير مستوى الكلوكوز في مصل الدم

تم قياس مستوى الكلوكوز في مصل الدم بواسطة استخدام عدة التحليل المجهزة من شركة Roche الالمانية .يقوم انزيم Hexokinase بفسفرة الكلوكوز عن طريق ATP وتكوين Glucose -6- phosphate (G6P). ولمتابعة التفاعل ، انزيم ثاني Glucose-(G6PDH) 6- phosphate dehydrogenase يستخدم لتحفيز اكسدة glucose -6- phosphate بواسطة NADP لتكوين NADPH .



يتناسب تركيز NADPH الناتج طرديا مع تركيز الكلوكوز ويمكن تقديره بواسطة تقدير الزيادة في الامتصاصية عند 340nm [14].

4-قياس تركيز اليوريا في مصل الدم

تم قياس مستوى اليوريا في مصل الدم عن طريق colorimetric method وذلك باستخدام العدة التشخيصية المجهزة من قبل شركة Human الالمانية . إذ يقوم إنزيم Urease بالتحليل المائي لليوريا وأنتاج الأمونيا وكما موضح في المعادلة ادناه:

Urease



وفي الوسط القاعدي تتفاعل أيونات الأمونيوم الناتجة من التفاعل مع Salicylate و Hypochlorite لتعطي اللون الاخضر للاندوفينول (2،2 dicarboxyl indophenols) وهذا التفاعل يحفز بأضافة Sodium Nitroprusside وكما موضح في المعادلة الاتية :



5--تقدير تركيز الحديد في مصل الدم

تم قياس مستوى الحديد في مصل الدم باستخدام عدة التحليل المجهزة من قبل شركة Roche الالمانية . وحسب طريقة فيروزين ferrozine method وفي ظل الظروف الحامضية ،الحديد المتحرر من ترانسيفيرين Lipemic العينات تكون

دراسة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية والوراثية الجزيئية لمرضى التلاسيميا
في محافظة ديالى

نور عويد عودة و عمار أحمد سلطان

أكثر وضوحا بواسطة المنظفات ، تقوم الأسكوربات بأختزال الحديد الثلاثي المصدر إلى الحديد الثنائي المصدر ثم يتفاعل مع فيروزين الناتج من المعقد اللوني .

PH <2.0

Transferrin – Fe $\xrightarrow{\text{Ascorbate}}$ apotransferrin + Fe complex

Ascorbate

Fe³ $\xrightarrow{\text{Ferrozine}}$ Fe²

Ferrozine + Fe² $\xrightarrow{\text{Ferrozine}}$ colored complex

تتناسب كثافة اللون الناتج طرديا مع تركيز الحديد ، ويتم تقديره بحساب الزيادة في الامتصاصية عند 552nm [15] .

استخلاص الدنا DNA Extraction

تمت عملية الأستخلاص بأستعمال عدة استخلاص Genomic DNA mini kit blood protocol

قياس وتقدير نقاوة الدنا المستخلص

قيس تركيز الدنا من خلال تخفيف العينة بإضافة 4951 μ من الماء المقطر إلى 51 μ من دنا العينة وقراءة امتصاص العينة للأشعة فوق البنفسجية بجهاز Spectrophotometer الذي يستعمل لقياس الكثافة الضوئية عند الطولين الموجيين 280 و 260 نانوميتر .

الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص

حضر الهلام بإضافة 1 غم من جل الأكاروز بعد قياسه بميزان حساس إلى 100 مل من TBE Buffer بقوة 1X في دورق زجاجي مدرج حجمه 500 ML ثم يوضع بعد ذلك على جهاز Hotplate stirrer مع وضع غطاء من ورق السليفلون على قمة الدورق لمنع التبخر وبدرجة حرارة 100 م إلى حين أكتمال الإذابة وشفاء الخليط بحيث لاتوجد شوائب فيه ثم يترك ليبرد بدرجة حرارة 40-50 م ويضيف اليه 51 μ من صبغة Ethidium bromide إلى الهلام الموجود في الدورق الزجاجي مع الرج المباشر لمكونات ولمدة 10 ثواني .

دراسة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية والوراثية الجينية لمرضى التلاسيميا
في محافظة ديالى

نور عويد عودة و عمار أحمد سلطان

التحليل الاحصائي

أجرى التحليل الاحصائي باستخدام برنامج الحزمة الاحصائية للعلوم الاجتماعية (statistical package for social sciences) في تعيين المعدل والانحراف القياسي اضافة إلى المتغيرات الأخرى . أن الفروقات في حالة كون الاحتمالية p ≥ 0.05 أعتبرت فروق معنوية .

النتائج والمناقشة

جدول (1) مقارنة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية بين الأصحاء والمرضى المصابين بالتلاسيميا بالنسبة للطفرة I.VS.I.5 (G-C) ولجميع الاقضية في محافظة ديالى .

Parametarats		N= 65 IVS-I-5 (G-C)		P value (T test)
		Mean	SD	
ALT U/L	Patients	30.03	24.81	0.001***
	Control	10.719	2.57	
Creatini mmol/l	Patients	26.56	10.04	0.001***
	Control	40.49	5.65	
UNB mmol/l	Patients	4.00	0.88	0.56 ^{NS}
	Control	3.49	6.71	
Glucos mmol/l	Patients	5.92	1.61	0.001***
	Control	4.52	1.36	
	Control	60.07	10.36	
Fe umol/l	Patients	35.48	11.10	0.001***
	Control	24.16	13.36	

تبين نتائج الدراسة الحالية كما في الجدول (1) مقارنة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية بين الأصحاء والمرضى المصابين بالتلاسيميا بالنسبة للطفرة I.VS.I.5(G-C) ، فقد زاد تواجد هذه الطفرة بين المرضى المصابين بالتلاسيميا بنسبة 90% وهي النسبة الأعلى بين الطفرات الأخرى ولوحظ أنتشارها في جميع أقضية محافظة ديالى ، إذا نلاحظ زيادة مستويات أنزيم ALT في المرضى بالمقارنة مع الأصحاء، إذا يعود سبب هذه الزيادة في أنزيم ALT في تحديد ما إذا كان الكبد قد تعرض إلى تلف حيث إن أمراض الكبد ترتبط مع عمليات نقل الدم المزمن في مرضى التلاسيميا والتي تسبب التهاب الكبد المزمن وأن دور الحديد الزائد في الحمل يسبب ضعف الكبد في المرضى الذين يعانون من التلاسيميا وقد لوحظ ارتفاع هذا الأنزيم في مرضى التلاسيميا ومعرفة تركيز هذا الأنزيم دليل على تشخيص وظائف الكبد في مرضى بيتا تلاسيميا [16]..

دراسة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية والوراثية الجزيئية لمرضى التلاسيميا
في محافظة ديالى

نور عويد عودة و عمار أحمد سلطان

و قيم الحديد Fe فقد أزدادت في المرضى ، و يعود سبب في زيادة الحديد بالدم إلى تراكمه في مختلف أجهزة الجسم (القلب و الكبد والكلية) وأن نقل الدم المتكرر يؤدي إلى تشوهات في كريات الدم الحمراء لذلك يتطلب التخلص من هذا الحديد الزائد في الجسم عن طريق إزالة هذا المعدن وأن هؤلاء المرضى الذين يعانون من التلاسيميا والأمراض القلبية وارتفاع ضغط الدم الرئوي تكون عملية إزالة هذا المعدن و يتطلب وقتاً طويلاً [17]

تبين من النتائج ارتفاع في مستويات الكلوكون إذ أن سبب زيادة تركيز الكلوكون في الدم بين المرضى الذين يعانون من التلاسيميا قد تصل إلى خارج نطاق المستوى العادي وتسبب آثاراً صحية ضارة بعض أنواع الخلايا مثل الخلايا العضلية والدهنية تحتاج إلى الأنسولين من أجل امتصاص الكلوكون وسوف ترتفع مستويات الكلوكون في الدم عندما تفشل هذه الخلايا في الاستجابة بشكل مناسب لانتشار الأنسولين ، ويساعد الكبد في تنظيم مستويات الكلوكون عن طريق الحد من إفراز الكلوكون بوجود الأنسولين وقد لا يحدث هذا الأختزال الطبيعي في إنتاج الكلوكون في الكبد عند الأشخاص الذين لديهم مقاومة للأنسولين وأن مقاومة الأنسولين في الخلايا العضلية والدهنية يقلل من امتصاص الكلوكون [18].

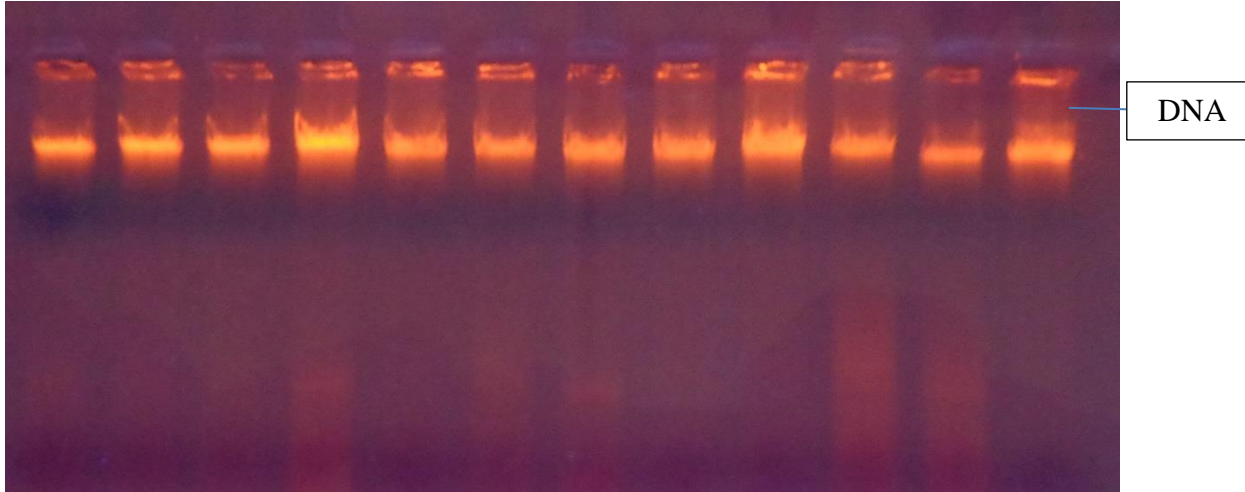
أن سبب زيادة تركيز اليوريا في الدم إلى تناول البروتينات وفي بعض الحالات المصاحبة لهدم البروتينات مثل مرض السكر غير المعالج وفرط نشاط الغدة الدرقية وفي امراض التلاسيميا ، إذ أن ارتفاع تركيز اليوريا في مرضى البيتا تلاسيميا يرجع إلى ترسيب الحديد الزائد وقصر عمر خلايا الدم الحمراء وفي حالة القصور الكلوي يؤثر نسبياً على نسبة اليوريا في الدم وفي مرضى التلاسيميا الذين يعانون من تضخم الكبد تتكون مادة الأمونيا التي يفشل الكبد في تحويلها إلى يوريا [19].

أن سبب انخفاض تركيز الكرياتينين في الدم يعود إلى انخفاض الكبير في تركيز الكرياتين في مصل الدم وقد يكون ذات صلة في انخفاض مؤشر كتلة الجسم بسبب التأخر في النمو وانخفاض في كتلة عضلات الجسم وهؤلاء المرضى الذين يعانون من مرض التلاسيميا، وأن الكرياتين هو المقياس الأكثر استخداماً في معرفة وظائف الكلية وهذا يؤدي إلى اختلال عملية الترشيح التي تقوم بها الكلية، و أن انخفاض تركيز الكرياتين في الدم يرجع إلى قصور في وظائف الكلية التي تقلل من عملية الترشيح الكبيبي وأن معدل الترشيح الكبيبي مهم سريرية لأنه مقياس لوظيفة الكلية [20].

دراسة بعض المؤشرات الكيميائية الحيوية والوراثية الجزيئية لمرضى التلاسيميا
في محافظة ديالى

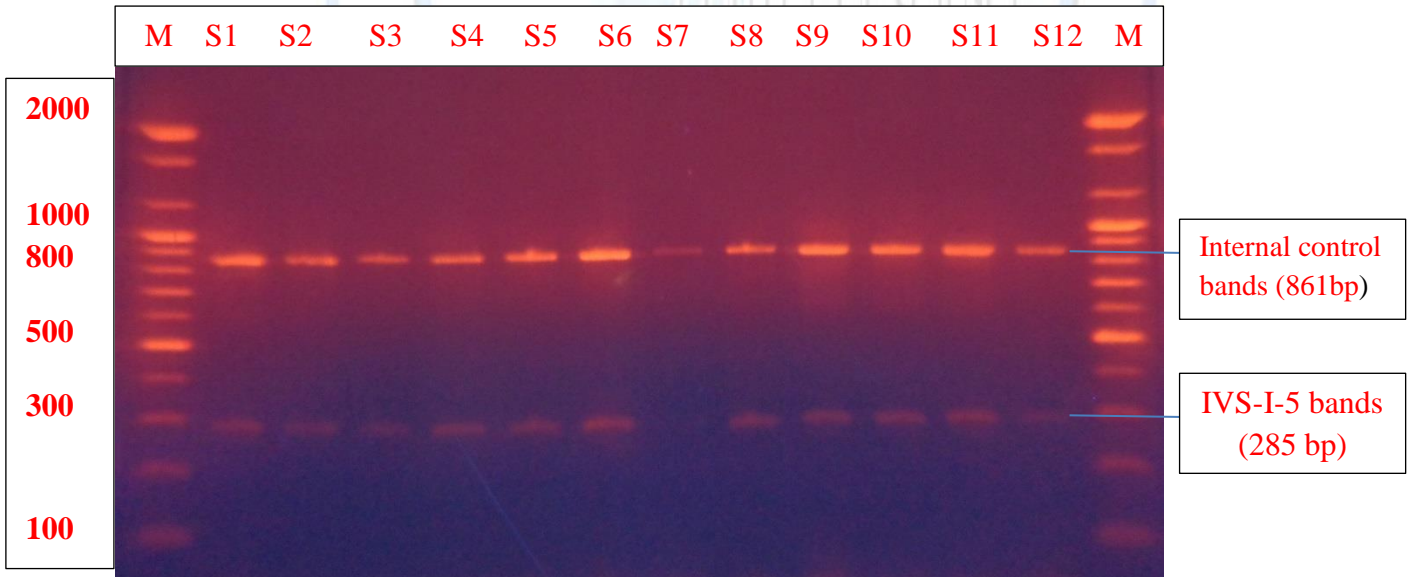
نور عويد عودة و عمار أحمد سلطان

1- نتائج عزل الدنا DNA Isolation Results



صورة (1) حزم الدنا الكروموسومي المستخلص من عينات دم الانسان والمرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1%
و فرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة ساعة واحدة

2- ناتج تضخيم الطفرة المعنّدة للطفرة IVS.I.5 (G-C)



صورة (2) تبين ناتج تضخيم الطفرة المعنّدة ARMS-PCR products للطفرة IVS-1-5 المسببة للبيتا تلاسيميا
β-thalassaemia والمرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1% و فرق جهد كهربائي 100 فولت ولمدة ساعة ونصف

المصادر

1. Munize , A ; Martines , G ; Laiahqa , J . and pasheco , P . (2000) . Beta thalassemia in chbans . American . J . Haematol . 64 (1) : 7 -14 .
2. Mok , S ; Im wong , M . and Mackinion , M .J . (2011) . " Artemisinin resistance in plasmodium falciparum is associated with an altered temporal pattern of transcription " BMC Genmics . V 12 article 391 .
3. Badens , C ; Joly , P , and Agouti , I .(2011) . Variants in genetic modifiers of β – thalassemia can help to predict the major or intermedia type of the disease . Haematologica . 96 (11): 1712 – 4 .
4. Owen , T . W ; Chan , K .D ; Dietz L ; Zehnder J . L. and schrijver I . (2010) . Comprehehsive and Efficient HBB Mutation Analysis for Detection of Hemoglobin inopathies in a pan . Ethnic popupation . Am J Clin pathol . 133 : 700-707.
5. Rund , D. and Rachmilewitz E . (2005) . Beta – Thalassemia . New Eng . J . Med . 353 (11) : 1135 – 46 .
6. Quek , L .and Thein S.L.(2007) . Molecular therapies in beta – thalassemia . Br . J . Haematol . 136 (3) : 353 – 65.
7. Kaiser , J . (2009) . Beta – Thalassemia treatment succeeds , with acaveat . science . Gene therapy . 326 : 1468 – 9 .
8. Wood J . C . (2008) . Cardiac iron across different transfusion – dependent diseases . Blood Rev . 22 (2) : 14 – 21.
9. Thein , S . L . ; Menzel S.; Lathrop M . and Garher C . (2009) . control of fetal hemoglobin : new insights emergins from genomics and clinical implication . Hum Mol Genet . 18 : R 216 – 23.
10. Tanner , M . A . ; Galanello , R . and Dessi , C . (2008) . Combined Chelation therapy in thalassemia major for the treatment of severe my ocardial siderosis with left ventricular dys function . J . Cardiovasc Magn . Reson . 10 : 12 .
11. Udo , M ; Galanello , R ; Sanna , S ; Lettre , G . Sankaran , Y . G. and Cao , A . (2008) . Genome – wide association study shows BCLIIA associated with persistent fetal

- hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta – thalassemia . proc Natl Acad Sci USA 105 : 1620 – 1625.
12. Badens , C ; Joly , P , and Agouti , I .(2011) . Variants in genetic modifiers of β – thalassemia can help to predict the major or intermedia type of the disease . Haematologica . 96 (11): 1712 – 4.
 13. Reitman , S , and frankle , S .(1957) . Amer . J . Chin . Path . 28 : 56 .
 14. Bartels , H . & Bohmer , M . (1971) . Micro – determination of creatinine . Clin Chim Acta ; 32 : 81 – 85 .
 15. Kind , P . R . N. and King . E .J.(1954) . Estimation of plasma phosphates By Determination of Hydroxylated Phenol with Amin . Antipyrine . Clin Path ., 7 : 322 – 326 .
 16. Cohn , A . R . Galanello , R , Piga A , Dipalma , A , Vullo , C . and Tricta , F . (2000) : safety profile of the oral iron chelator deferiprone : amulticentre study . Br . J . Haematol . 108 (2) : 305 -12 .
 17. Spyros Deftereos , ph D , Maria Tsironi , phD , Athanasios Aessopos , MD , PhD , Dimitrios Farmakis , phD , Stergion Tassiopoulos , phD , Ioannis Moyssakis , MD , and Markisia Karagiorga , phD . (2005) . Thalassemia Heart Diseases . A Comparative Evaluation of Thalassemia Major and Thalassemia Intermedia . CHEST ; May . Vol . 127. no. (5): 1523 – 1530.
 18. McGarry J . (2002) . " Banting lecture 2001 : dystegulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes " Diabetes 51 (1) : 7 – 18.
 19. M . Mohkam , B . S. Shamsian , A. Gharib , S. Nariman and M. T. Arzanian . (2008). " Early Markers of Renal Dysfunction in patients with Beta – thalassemia Major , pediatric Neph – rology , Vol . 23 , No . 6 , PP. 971 – 976.
 20. Z. Younus , y . Alhially and A .(2012) . Dallal Bashi , " Evaluation of Convention Renal Function Tests in β – thalassemia Major Patients in Nineveh Province " Vol . 8 , No . 1, PP . 6 -14.