وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية العلوم
علوم الحياة

دراسة لبعض التقنيات المستخدمة في تشخيص وعلاج الثالاسيميا وللعوامل المؤثرة في مرضى الثالاسيميا- بيتا في النجف الأشرف

دراسة تقدمت بها

نورس علوان حسين البرقعاوي

إلى – كلية العلوم– جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدبلوم العالي

في التقنية الحيوية

بإشراف المدرس الدكتور

زهير محمد علي الأسدي

١٤٣١ هـ **٢٠١٠ م**

١٤٣١ هـ ٢٠١٠ م

١٤٣١ هـ ٢٠١٠ م

بسْم اللهِ الرّحْمَنِ الرّحيْمِ

(علم الإنسنَ مَا لم يَعلم)

صدق الله العلي العظيم

سورة العلق الآية (5)

إقرارالمشرف

اشهدُ بأن الرسالة الموسومة (دراسة لبعض التقنيات المستخدمة في تشخيص وعلاج الثالاسيميا وللعوامل المؤثرة في مرضى الثالاسيميا – بيتا في النجف الاشرف) أعدت تحت أشرافي في جامعة كربلاء / كلية العلوم وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدبلوم العالي في علوم الحياة / التقنية الحيوية .

التوقيع :
المشرف : زهير محمد علي جدوع
المرتبة العلمية : مدرس
العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم
التاريخ : / /

توصية رئيس قسم علوم الحياة

استناداً إلى التوصيات المتوفرة ، أرشح هذه الدراسة إلى المناقشة.

التوقيع :
الاسم :د. زهير حميد عبود
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / /

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أني قد قومت الدراسة الموسومة بـ (دراسة لبعض التقنيات المستخدمة في تشخيص وعلاج الثالاسيميا وللعوامل المؤثرة في مرضى الثالاسيميا- بيتا في النجف الاشرف) للطالبة (نورس علوان حسين) – قسم علوم الحياة – الدراسات العليا (الدبلوم العالي) / التقنية الحيوية .

التوقيع :

الاسم :

العنوان :

قرار لجنة المناقشة

نشهد اننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة اطلعنا على هذه الدراسة وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة ونعتقد بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة الدبلوم العالي في علوم الحياة / التقنية الحيوية.

(عضو)

التوقيع :
الأسم : د.علي حمود محيسن
المرتبة العلمية:أستاذ مساعد
العنوان :جامعة بابل- كلية العلوم
التاريخ : / /2010

(رئيس اللجنة)

التوقيع :
الأسم :د.صاحب علي مهدي
المرتبة العلمية:أستاذ
العنوان :جامعة كربلاء- كليةالصيدلة
التاريخ : / /2010

(عضو)
(المشرف)

التوقيع :
الأسم :م.د.زهير محمد علي
المرتبة العلمية: مدرس
العنوان : جامعة كربلاء- كلية الطب
التاريخ : / /2010

مصادقة عميد كلية العلوم – جامعة كربلاء

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه.
التوقيع :
الأسم :د.عامر عبدالأميرمحمد علي
المرتبة العلمية:
التاريخ : / /2010

الإهــداء Dedication

إلى .....

معلم الإنسانية و خير البرية... سيد الكائنات رسول الله محمد وآله (ε)...وداً واقتداءً .

التي تحت أقدامها الجنة...أمي.

نور العين وبيت الأمان...أبي.

منبع العطف والحنان...عمتي.

عضدي و قرة عيني....أخوتي.

اهدي هذا الجهد

نورس

شـــــكر وتقديـــر Acknowledgment

الحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام على محمد واله (ص) خير البرية ، واللعنة الدائمة على أعدائهم شرِّ البرية .

أما بعد ....

بدءاً أوجه شكري وتقديري إلى جامعة كربلاء / كلية العلوم / قسم علوم الحياة لمنحي فرصة الحصول على هذه الدراسة وأتقدم بالشكر الجزيل إلى المشرف على دراستي الدكتور زهير الاسدي لأرشادي وتوجيهي في أكمال دراستي على أكمل وجه.وأتوجه بالشكر إلى الدكتور ثامر الجنابي والدكتور علي الغانمي لتعاونهم معي.ويشرفني ان أتقدم بجزيل الشكر والتقدير والعرفان إلى الأشخاص الذين وقفوا الى جانبي خلال دراستي وهم خالاتي لمساندتي بالدعاء ومساعدتهن الشخصية لي وخالي محسن لأحتضاني في بيته خلال مدة دراستي وعمي حامد لتعاونه معي والدكتور جواد البرقعاوي لإسدائه النصيحة ومساعدتي مع ابنه مرتضى في تنضيد البحث وصديقاتي الحبيبات ضفاف الطرفي وعائلتها لمواقفهم النبيلة والاخوات رشا الكلابي ورغد الموسوي لما قدمتاه لي من مساعدة ودعم معنوي والى كل من ساعدني في جامعة الكوفة وأخص بالذكر الدكتور رضا العلياوي والأستاذ علي فضل البرقعاوي لتعاونهم معي والاستاذة رنا الكلابي في كلية الطب والأخ الشيخ عماد التميمي في المكتبة المركزية وكل زميلاتي في كلية العلوم والأخوات في مستشفى الزهراء للولادة والأطفال في النجف الاشرف (مركز أمراض الدم) وأخص بالذكر الدكتورة رفاه الوائلي والأخت زينب الشيباني لتعاونهنَّمعي والى كل الأشخاص الذين نطقت شفاهم بالدعاء لي .

نورس البرقعاوي

الخلاصــة Summary

اشتملت هذه الدراسة على عدد من التقنيات الحيوية المستخدمة في تشخيص وعلاج فقر دم البحر الأبيض المتوسط (الثالاسيميا) لأن هذا المرض من الأمراض الشائعة الانتشار في العالم والوطن العربي بما فيه العراق. وتضمنت هذه الدراسة ثلاثة فصول:-

الأول: اشتمل على مقدمة تعريفية عامة في مرض الثالاسيميا وبيان للهدف من هذه الدراسة.

الثاني: شملت الدراسة فيه استعراضًا للمراجع التي عنيت بالمرض. فقد تناول المرض من حيث تأريخ اكتشافه وتوزيعه الجغرافي والتركيب الطبيعي لخضاب الدم والأسباب الوراثية للمرض وتقسيم الاعتلالات الخضابية وأنواع الثالاسيميا وأعراض المرض وطرق الوقاية منه وكيفية تشخيصه من خلال تصنيف التشخيص اعتمادًا على الفحص الدموي والترحيل الكهربائي لخضاب الدم وكروماتوكرافيا السائل عاليةالفعالية وفحوصات الوراثة الجزيئية التي قسمت استناداً إلى استخدام تقنية ال (PCR) إلى فحوصات معتمدة على تقنية ال (PCR) التي تضمنت عدة تقنيات جزيئية يمكن تشخيص متلازمات الثالاسيميا عن طريقها وفحوصات غير معتمدة على تقنية (PCR) وشملت أهم التقنيات المستخدمة في هذا المجال. ثم تناولت الدراسة أهم الطرق الحيوية المستخدمة في العلاج التي شملت نقل الدم والعلاجات الساندة والتداخل الجراحي وزرع نخاع العظام وحث خضاب الدم والعلاج الجيني.

أما الثالث: فتناول دراسة إحصائية لتأثير عدد من المعايير في مرضى الثالاسيميا في النجف الاشرف اعتماداً على بيانات مأخوذة من سجلات إحصائية في مركز أمراض الدم في مستشفى الزهراء في مدينة النجف الأشرف و تمت كذلك دراسة عدد من العلاقات التي توضح أهمية وواقع المرض في المدينة وهي العلاقة بين جنس المريض وكل من الطراز المظهري للثالاسيميا بيتا والعمر وصنف الدم وصلة القربى للوالدين والعلاقة بين الطرازالمظهري للثالاسيميا بيتا وبين كل من التوزيع الجغرافي وصنف الدم.

قـائمة المحتـويات Contents

الرقم	العنوان	رقم الصفحة	
		من	إلى
الفصل الأول	المقدمة	1	2
الفصل الثاني	استعراض المراجع	3	38
(1-2)	نبذة تاريخية عن مرض الثالاسيميا	3	3
(2-2)	التوزيع الجغرافي للمرض	4	5
(3-2)	التركيب الطبيعي لخضاب الدم	6	7
(4-2)	الأسباب الوراثية للمرض	8	10
(1-4-2)	إضطرابات خضاب الدم	8	10
(2-4-2)	الأحتمالات الوراثية للمرض	11	11
(5-2)	أنواع المرض	12	14
(6-2)	أعراض المرض	15	15
(7-2)	طرق الوقاية من المرض	16	17
(8-2)	تشخيص المرض	18	33
(9-2)	علاج المرض	34	38
الفصل الثالث	تاثيرعدد من المعايير في المرضى في النجف الاشرف	39	43
الفصل الرابع	الاستنتاجات والتوصيات	44	45
المصادر	العربية والانترنت والانكليزية	46	65

قائمـــــة الأشكال List of Figures

الرقم	عنوان الشكل	الصفحة
(1-2)	تركيب خضاب الدم	8
(2-2)	معدل إنتاج الأنواع المختلفة لخضاب الدم خلال المراحل العمرية للأنسان	8
(3-2)	جميـع التزاوجـات الممكنــة و نسـب ظهور المرض في الأبناء	13

قـائمة الجـداول List of Tables

الرقم	عنوان الجدول	الصفحة
(1-2)	التوزيع الجغرافي للمجتمعات العرقية التي يزداد فيها خطر الثالاسيميا	5
(2-2)	العلاقـة بـين الجينـات ونسـبة أنتـاج السلاسل ألفا من غلوبين الـدم والحالـة المرضية الناتجة عنها	9
(3-2)	أدلة خلايا الدم الحمراء فـي المرضـى المصابين بالثالاسيميا	20
(1-3)	العلاقة بين جنس المريض والطراز المظهري للثالاسيميا – بيتا.	39
(2-3)	العلاقـة بـين منـاطق السـكن والطـراز المظهري للثالاسيميا – بيتا.	40
(3-3)	توزيـــع المرضـــى حســـب العمـــر والجنس.	41
(4-3)	توزيع المرضـى حسـب صـلة القرابـة بين الوالدين والجنس.	42
(5-3)	توزيـع المرضـى حسـب صـنف الـدم والجنس.	42
(6-3)	توزيـع المرضـى حسـب صـنف الـدم والطراز المظهري للثالاسيميا – بيتا.	43

List Of Abbreviations

A	
ADA	Adenosinedeaminase
ARMS	Amplification Refractory Mytation system
ASO	Allel_specific oligonucleotide
B	
BMT	Bone marrow Transplantition
C	
CBC	Complet blood count
CIEF	Capillary Iso electric focusing
D	
DHPLC	Denaturing high performance liquid chromatography
dNTP	deoxyribonucleosidtriphosphate
E	
ES	Embryo stem cell
F	
FDA	food and drug Administration

H	
HbA	Adult haemo globine
HbA2	Haemoglobin A2
HbF	Fetal Haemoglobin
HPLC	High performance liquid chromatography
HSC	Hematopoietic stem cell
I	
IEF	Iso Electric Focusing
IPS	Induced pluripotent stem cell
L	
LCR	Locus control region
M	
MCH	Mean cellular Hemoglobin
MCV	Mean corpuscular volume
P	
PCR	Polymerase chain reaction
R	
RBS	Red blood cell
RDW	Red cell distribution width
S	
SAS	Statistical Anlysis system
SNPs	Single Nucleotide polymorphisms

الفصل الأول

المقدمة

المقدمـــة

تعد الاضطرابات الوراثية في خضاب الدم البشري التي تقع ضمن إضطرابات الجين المفرد (Single gene disorder) من الاضطرابات الشائعة التي تصيب حوالى ٥% من مجموع سكان العالم الذين يحملون واحدة أو أكثر من الطفرات في الجينات المسؤولة عن تصنيع خضاب الدم في الجسم (Jord et al . ,2000) . وتعد الثالاسيميا (فقر دم البحر الأبيض المتوسط) من أهم إضطرابات الدم الوراثية التي تؤثر في جسم الأنسان ، لأن خضاب الدم يتألف أساساً من نوعين مختلفين من البروتين هما ألفاغلوبين (alfa globin) وبيتاغلوبين (beta globin) اللذان يرتبطان مع صبغة الهيم لتكوين الجزيء الكامل لخضاب الدم . وإن أي خلل وراثي يعيق إنتاج هذه البروتينات في الجسم بصورة كافية لأحد أو كلا البروتينين سيؤدي الى ان خلايا الدم تصبح غير قادرة على نقل الاوكسجين الكافي لينتج عن ذلك فقر الدم (anemia) التي تحصل في الطفولة المبكرة وتستمر خلال الحياة (Najmabadi et al ., 2001; Patrinos et al ., 2004) .

إن السبب في حدوث الثالاسيميا يعود إلى إختزال نسبة تصنيع واحدة أو أكثر من السلاسل المتعددة الببتيد لغلوبين الدم الذي يمثل تغيرات كمية غير طبيعية في تصنيع خضاب الدم لذا فهو يختلف عن الأعتلالات الخضابية (Haemoglobiopathis) التي تمثل إضطرابات نوعية لخضاب الدم (Mohan,2000) . وإعتماداً على نوع الخلل الوراثي ونوع الجين المتضرر ، يمكن أن تكون هناك عدة أنواع من الثالاسيميا ، ومن أكثر الأنواع المهمة سريرياً والشائعة هي (ألفا- ثالاسيميا) و(بيتا- ثالاسيميا) و(بيتا / گاما- ثالاسيميا) (Cappellini et al ., 2003) ,ومن خلال دراسة توزيع مرض الثالاسيميا في العالم يظهر إنه بالإضافة إلى مدن البحر الأبيض المتوسط التي سجلت فيها الإصابات بالثالاسيميا في بادئ الأمر وسمي المرض ً بأسمها ، يلاحظ إن المرض منتشر في معظم بقاع العالم بما فيها وطننا العربي ، بالإضافة إلى الهجرة المستمرة لبعض المجتمعات البشرية من منطقة إلى أخرى في العالم مما يساعد في انتشار المرض (Vullo et al ., 1995; AL.Akawi et al .,2009). أما في العراق فالمرض منتشر في أغلب محافظاته حيث سجلت أكثر الأعداد في بغداد والبصرة والموصل و سجلت أعداد إصابات في محافظات أخرى كالنجف وكربلاء والديوانية وغيرها . وان هذه الأعداد هي آخذة بالازدياد سنوياً حتى وصل العدد عام ٢٠٠٩ م حوالى (١٢٠٠٠مريض) وذلك يعود لعدة عوامل مختلفة أهمها شيوع زواج الأقارب ، وقلة الوعي الصحي إضافة إلى نقص في العناية الطبية وتوفير مستلزمات العلاج مثل دواء أكسجيد (exjade) وهو عبارة عن حبوب بديلة للحقن المؤلم

للديسفيرال لاسيما ان اغلب المرضى من عوائل فقيرة لا تقوى على تحمل تكاليف العلاج (AL- Assadi,2007; Net.2) .

وهدفت هذه الدراسة إلى :-

١- تسليط الضوء على التقنيات الحيوية الحديثة المستخدمة في تشخيص وعلاج الثالاسيميا في العالم .

٢- دراسة إحصائية لتأثير عدد من المعايير في مرضى الثالاسيميا في النجف الاشرف من خلال مراجعة سجلات مركز أمراض الدم في مستشفى الزهراء للولادة والأطفال واستنتاج العلاقات الإحصائية والاستدلالية من البيانات المستحصلة من هذه السجلات .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

(٢- ١) نبــذة تأريخيــة عــن مرض الثالاسيميا

اشتق مصطلح (Thalassemia) من الكلمة الإغريقية (Thalassa) وتعني البحر ومن كلمة (aemia) وتعني فقر الدم للتعبير عن الحالات التي تعاني من فقر الدم في المدن القريبة من ساحل البحر الأبيض المتوسط لذلك كان الاعتقاد السائد هو أن هذا المرض يصيب سكان المدن الساحلية فقط ولذلك سمي بفقر دم البحر الأبيض المتوسط وأول من استعمل هذا المصطلح هما الباحثان Whipple and Bredford في عام ١٩٣٦م ; Weatherall&Clegg ,1972 (Jord et al ., 2000) وفي عام ١٩٢٥م وصف طبيب الأطفال (Thomas Cooley) النوع الخطر لفقر الدم في الأطفال الأيطاليين الأصل ،وسميت لاحقاً الحالات الشديدة من الثالاسيميا بأسمه (Coolye's anemia) (Kiss et al .,2000) .

بحثت الطبيعة الوراثية للمرض أولاً من قبل Mintrobem وزملائه في عام ١٩٤٠ م حيث وصفوا فقر الدم الخضابي غير الاعتيادي في مجموعة من المرضى الايطاليين وفي عام ١٩٤٩م أصبح واضحاً أن Cooley's anemia هو الحالة متجانسة الزيجة (homozygous state) لجين مندلي سائد جزئياً (Wolf & Ingator ., 1963; ELeftheriou, 2003).

وفي عام١٩٥٧م اكتشف Kunkel مكونَّ الخضاب الصغير الطبيعي (hemoglobin A_2) ووجد انه مرتفع في الشخص المصاب بالثالاسيميا الصغرى (Thalassemia Minor) . وفي عام ١٩٥٩م وجد الباحثان Ingram ، Stretton إن هناك نوعين رئيسين من (Thalassemia) وهما ألفا وبيتا (Ingram ,1959) وفيما بعد تركزت الأبحاث في علم أمراض الخلية (cytopathology) على دراسة حالات ثالاسيميا بيتا بأستعمال تقنيات لقياس تصنيع سلسلة الغلوبين في كل المتلازمات الثلاسيمية (Thalassemia disorders). اضافة الى أن التكنولوجيا الحيوية الجزيئية أصبحت الآن قادرة على مساعدة المرضى عندما يتم التعرف على الأخطاء الوراثية وطبيعة الطفرات وتوزيعها في مجتمع العالم (Kayisli et al. , 2005) .

(٢ – ٢) التــوزيع الجغرافي للمــرض

على الرغم من أن الثالاسيميا شائعة في الدول المحيطة بالبحر الأبيض المتوسط لاسيما ايطاليا واليونان إلا إنـــه يكون موجوداً في أي منطقة يكون فيها مرض الملاريا مستوطـــناً (الشرق الأوسط ، الهند وشمال شرق آسيا) لأن الحالة متباين الزيجة (heterozygous) للثالاسيميا تجهز تأثير وقائياً ضد الملاريا (Rubin & Reisner, 2009) .

واصبحت الثالاسيميا عالمية الانتشار نتيجة الهجرة من مناطق اكتشافها الأولى : اليونان ، ايطاليا ، ساردينيا ، قبرص ، تركيا . (Vullo et al ., 1995) وأوضحت الدراسات أن تكرار الجين (gene frequency) للثالاسيميا بيتا في تلك المدن يكون بحدود (٥-٢٥%) (Al- Awamy, 2000) .

واظهرت الدراسات انتشار المرض في العديد من بلدان العالم منها ماليزيا . (Tan et al. , 2001) وألمانيا (Cario et al. , 1999) وإيران . (Rahimi et al ., 2006 , Fakher et al ., 2007). و المملكة المتحدة (Karnon et al. , 1999) و الولايات المتحدة (Lorey, 2000) .

أما في البلدان العربية فان المرض مسجل في المدن العربية التي تقع على حوض البحر الأبيض المتوسط فضلاً عن العديد من البلدان العربية الأخرى منها السعودية ، الأردن ، مصر ، لبنان ، اليمن (Awad 1999; Al-Akawi et al.,2009) . أما في العراق فقد ذكرت الدراسات انتشار المرض في عدد من محافظات القطر ويشكل انتشارها (٥-٥,٤%) من مجموع المجتمع العراقي (Awqati ,1998;AL-ALassadi, 2007; Net .2), وتكون هذه الاضطرابات أكثر شيوعاً في مجاميع عرقية محددة مما يظهر تأثير العرق من خلال تقصي المجتمعات (Weatherall , 1997; Davies et al. , 2000) والجــدول الآتي يوضح المجتمعات التي يزداد فيها خطر الثالاسيميا .

جــدول رقـم (٢ – ١)

التوزيـــع الجغرافي للمجتمعات العرقية التي يزداد فيها خطر الثالاسيميا

مناطق الأصل	Thalassemia
• **شمال أفريقيا**	% 20
• **مناطق البحر الأبيض المتوسط مثل سردينيا ، ايطاليا ، إسبانيا ، البرتغال ، اليونان ، قبرص ، تركيا ، مصر ، الجزائر ، ليبيا ، تونس ، مراكش ، مالطا .**	%16
• **الشرق الأوسط مثل : إيران ، العراق ، سوريا ، الأردن العربية السعودية ، دول الخليج العربي ، لبنان ، فلسطين ، (العرب ، اليهود(إسرائيل)) الكويت .**	%10
• **شمال شرق آسيا مثل : الهند ، أفغانستان ، الباكستان ، اندونيسيا ، بنغلادش ، تايلند ، مينمار .**	%7-5
• **الصين ، فيتنام ، الفلبين ، ماليزيا ، كمبوديا ، لاوس**	% 5
• **البلدان الكاريبية**	% 3
• **بلدان أمريكا الشمالية**	%1

Gynaecologists of Canada and (CCMG) The Canadian College of Medical Geneticists , 2008.

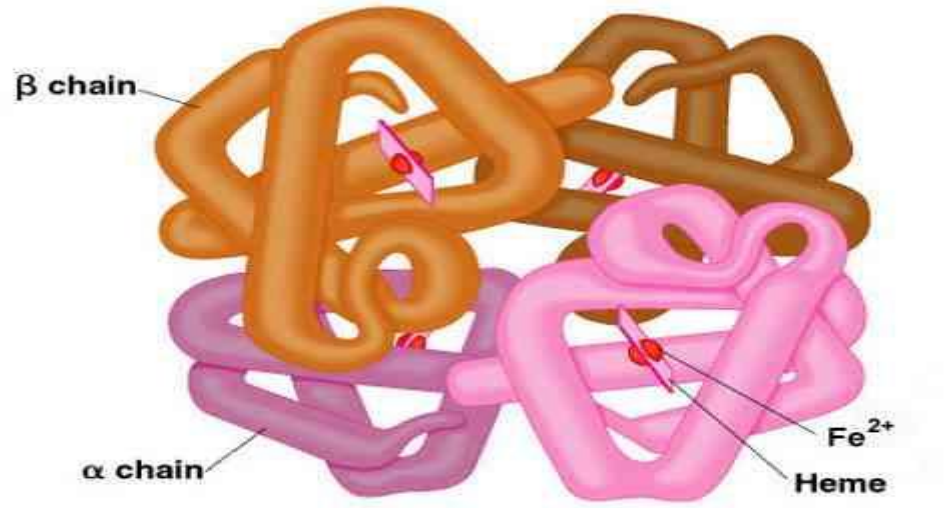
(٢-٣) (التركيب الطبيعي لخضاب الدم) (Hemoglobin)

يعد خضاب الدم Hemoglobin (الهيموغلوبين) من البروتينات الناقلة في بلازما الدم تقوم بالأرتباط الجزيئات أو الأيونات وحملها من عضو إلى آخر فضلاً عن قيامها بنقل المركبات الوسطية بين الأعضاء والأنسجة ، وخضاب الدم يرتبط في خلايا الدم الحمراء بالأوكسجين عندما يمر الدم خلال الرئتين ويحمله إلى الأنسجة المحيطة حيث هناك يتحرر الأوكسجين ليقوم بأكسدة المواد الغذائية لتوليد الطاقة (المظفر ،٢٠٠٠).

يتألف خضاب الدم من جزئين :- الأول يدعى هيم الذي يضم إضافة إلى الحديد حلقة البيرول الرباعية التي تتكون من حامض السكسينك والغلايسين بفضل انزيم δ - Amino laevulinic acid dehydrase.

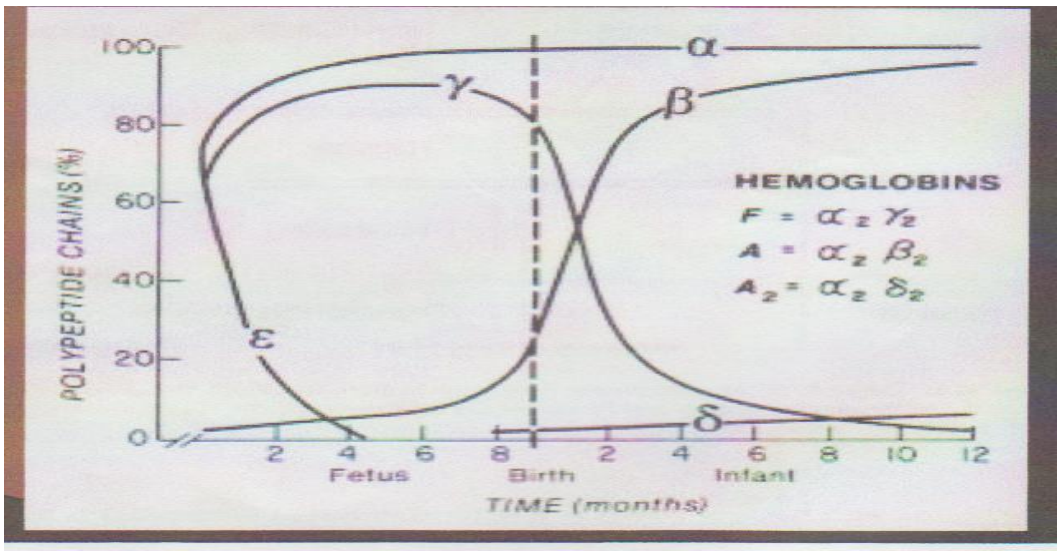
أما الجزء الثاني فهو بروتين يدعى الغلوبين الذي يضم سلسلتين أحدهما ألفا وتتألف من 141حامضاً أمينياً . والثانية تدعى بيتا وتتألف من 146 حامضاً أمينياً يشكل حديد خضاب الدم ثلثي حديد الجسم أما الباقي فهو حديد جاهز للاستقلاب.

وتحصل الكرية الحمراء غير الناضجة على الحديد من الترانسفرين او بطريقة مباشرة من الخلايا الشبكية بطريقة تدعى Rapheocytiosis وان ارتباط سلسلتي الغلوبين مع مجموعة الهيم التي تحوي ذرة الحديد و التي ترتبط مع الأوكسجين يسمح لجزيء الخضاب بإنجاز الوظيفة الحيوية لنقل الأوكسجين بواسطة الكريات الدموية الحمراء إلى كافة أنحاء الجسم (بازرباشي ،١٩٩٠) . ويوضح الشكل رقم (٢-١) تركيب خضاب الدم .



شكل (٢ -١) يبين تركيب خضاب الدم (Klug& Cummings.,2002) .

يتكون (haemoglobin A) في البالغين والذي يكون رباعي الأبعاد (Tetramer) من سلسلتي ألفا وسلسلتي بيتا (Alfa2 , Beta2) ويشكل نسبة ٩٧ % أما الكميات الصغيرة من خضاب الدم الجنيني (HbF) مؤلفة من سلسلتي گاما وسلسلتي الفا(Gama2, ALFA2) فيشكل نسبة اقل من ١% اما في النوع HbA_2 المؤلف من سلسلتي ألفا وسلسلتي دلتا (delta2 ,Alfa2) فيشكل نسبة (٢,٥%) (Levison et al ., 2008). ويوضح الشكل(2-2) معدل أنتاج الأنواع المختلفة لخضاب الدم خلال المراحل العمرية للإنسان.



شكل رقم (٢-٢) يوضح معدل أنتاج الأنواع المختلفة لخضاب الدم خلال المراحل العمرية للإنسان (بازرباشي ،١٩٩٠)

(٢-٤) الأسباب الوراثية للمرض

(٢-٤- ١) يمكن تقسيم اضطرابات خضاب الدم إلى قسمين :-

(٢- ٤-١- ١)Structural abnormalities:- وهي اضطرابات غير طبيعية تركيبية تمثل تغيراً في جزيئة خضاب الدم .

(٢-٤-١-٢) Thalassemias :- هي مجموعة من الحالات التي يكون فيها خضاب الدم طبيعياً تركيبياً لكنه يختزل في كميته (Jord et al .,2000), الثالاسيميا متلازمة الجين المفرد (Single gene disorder) التي تعبر من خلال الأبوين إلى الأبناء بواسطة مايسمى بالطراز المتنحي الذاتي الوراثي (autosomal recessive) و (autosomal disease) الذي يؤثر على الرجال والنساء على حد سواء ، فالأفراد الذين يرثون الجين الناقص من كل من الأب

والأم يصابون بالثالاسيميا ذات الأعراض السريرية وفي حالة الثالاسيميا بيتا يشار إلى المرض بـ (homozygous Beta- thalassemia) الذي يشير إلى Thalassemia Major أو فقر دم البحر الأبيض المتوسط أو فقر دم كولي . أما الإفراد الذين يرثون جيناً طبيعياً من أحد الأبوين وجيناً ناقصاً من الآخر فالحالة هنا تسمى (heterozygous B- thalassemia) ويشار إلى المرض بهذه الحالة بمصطلحات أخرى مثل thalassemia trait أو thalassemia minor , تكون الأعراض أقل ظهوراً في هذه الحالة .

وهناك أكثرمن٢٠٠ طفرة تؤثر على الوظيفة الطبيعية لجين Beta - globin وهي قابلة للفحص ويتأثر تصنيع الغلوبين بنوع الطفرة بدرجة كبيرة مما يؤدي إلى تدرج خطورة مرض الثالاسيميا (Davies et al , 2000 ; Weatherall & clegg ., 2001 ; ELeftheriou , 2003 ; Rubin & Resiner , 2009) , وفيما يخص الاسباب الوراثية لنوعي المرض الفا وبيتا:

أ- **الثالاسيميا ألفا Alfa Thalassemias** : تقوم أربعة جينات موجودة على الكروموسوم رقم ١٦بتكوين سلسلتي ألفا لجزئية خضاب الدم ، مما يعني قيام كبتكوين ٢٥% من السلستين وان أي خلل وراثي ينتج عنه حذف أحد هذه أو كلها يؤدي إلى

مايسمى بالثالاسيميا ألفا ,والجدول رقم (٢-٢) يوضح العلاقة بين الجينات ونسبة أنتاج السلاسل ألفا من غلوبين الدم والحالة المرضية الناتجة عنها.

جدول رقم (٢-٢) يوضح العلاقة بين الجينات ونسبة أنتاج السلاسل ألفا من غلوبين الدم والحالة المرضية الناتجة عنها .

الجين	أنتاج سلسلة ألفا (%)	الحالة المرضية للفرد

ألفا ألفا / ألفا ألفا	١٠٠	طبيعي
- ألفا /ألفا ألفا	٧٥	حامل للمرض
--/ألفا ألفا (--/ألفا ألفا)	٥٠	حامل للمرض مصاب بفقر دم خفيف وزيادة طفيفة في كريات الدم الحمراء.
--/- ألفا	٢٥	مصاب بالمرض / أنيميا حادة
--/- –	٠	مميت للأجنة في الشهور الأولى من الحمل

(شكارة ، ٢٠٠٢)

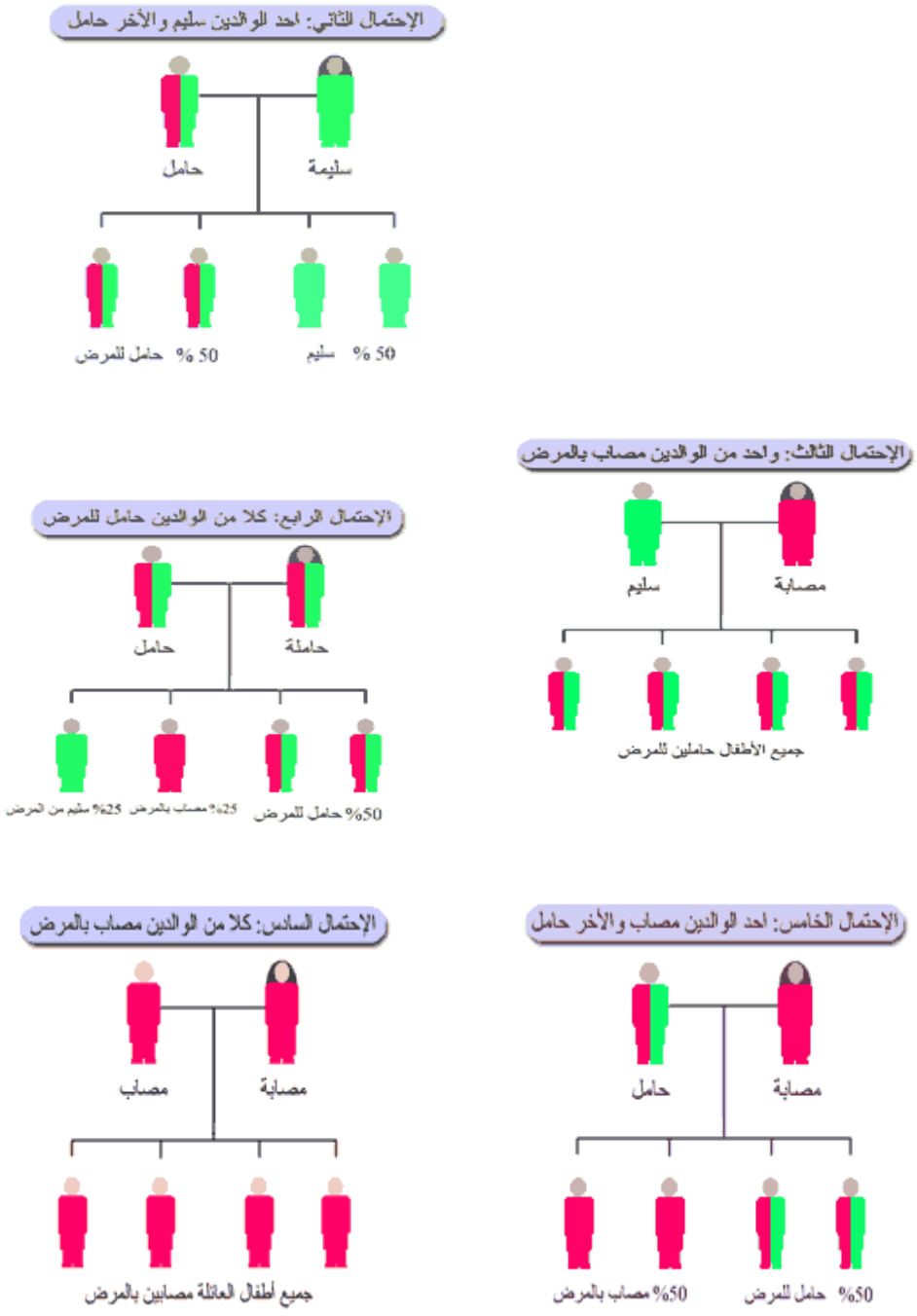
ب- **الثالاسيميا بيتا Beta- thalassemia :-** يعد هذا النوع أكثر خطورةً وانتشاراً من الثالاسيميا ألفا لأن إنتاج السلاسل بيتا يكون من جينين فقط يوجدان على الكروموسوم رقم ١١ وان أي خلل وراثي في أحد هذين الجينين أو كليهما تنتج عنه حالات مرضية بدرجات متفاوتة من الخطورة من الثالاسيميا – بيتا ، ينتج النقص في الجين من التغيرات المفردة في الزوج القاعدي (الطفرة النقطية point mutation) التي تكون بسبب فقدان قطع من الجين أو حدوث حذف (deletion) ويكون موقع الطفرة في منطقة الحفاز(promoter) من الجين او مناطق مشفرة اخرى وقد تؤدي الطفرات الى خلق شفرة إنهاء غير ملائمة مما ينتج عنه نقص في

الاستنساخ للجين كلياً ($Beta^{\circ}$) أو جزئياً ($Beta^{-}$) وأحيانا تؤثر الطفرة في جين Delta - globin المجاور مما يسبب الحالة Beta - Delta thalassemia.

(Afifi , 1985 ; Cao et al ., 1989 ; Fattoum et al ., 1991 ; Ngo & lee , 1994; Pearson et al ., 1996; Perrotta et al ., 2000 ; Ledingham et al ., 2000 ; ELeftheriou ., 2003 ; Rahemi et al ., 2006 ; Rubin & Reisner ., 2009 ; Net.1).

(٢-٤- ٢) الاحتــمالات الوراثية للمرض

يوضح الشكل (٢- ٣) الآتي الاحتمالات الوراثية لحدوث المرض



شكل (٢ – ٣) يوضح الاحتمالات الوراثية لحدوث المرض (Net.3)

(٢ - ٥) أنـــــواع الثالاسيميا Types of thalassemia

الثالاسيميا تقسم إلى :-

١- الثالاسيميا ألفا التي يكون فيها نقص في إنتاج الغلوبين- ألفا

٢- الثالاسيميا بيتا التي يكون فيها نقص في أنتاج الغلوبين – بيتا ;El-Hazmi,1992)
. Hoffbrand et al; 1999 ;Ledingham et al,2000; Eleftheriou,2003)

(٢-٥-١) الثالاسيميا – ألفا

يصاب الإنسان بهذا النوع من الثالاسيميا أذا حدث العطب (الطفرة) في أحد جينات الغلوبين ألفا وبحسب عدد المورثات المصابة بالعطب تلاحظ أنواعاً متعددة من الثالاسيميا ألفا :-

أ- carrier Alfa - Thalassemia

تحدث هذه الحالة عندما يكون الخلل في جين واحد وفيها لا تظهر على المريض أعراض سريرية .

ب- Alfa - Thalassemia trait

تحدث هذه الحالة عندما يكون الخلل في جينين وفيها يحدث فقر دم ناقص الصباغ المعتدل (hypochromic anemia) .

جـ - Haemoglobin H

تحدث هذه الحالة عندما يكون الخلل في ثلاث من الجينات الأربعة وفيها يصاب المرضى بفقر دم شديد أحياناً يتطلب نقل الدم لهم ،و تكون كريات الدم صغيرة لاتظهر بأشكال محددة .

د- Hydrops Fetalis

تحدث هذه الحالة عندما يكون الخلل في الجينات الأربعة لسلاسل الغلوبين ألفا ويكون الطفل مصاباً بها منذ الولادة مع فقر دم خطير وقد يموت الجنين في الرحم piomelli & Loew)

., 1991 ; Gardinia & Hilgartner., 1992 ; Rund& Rachmilewitz .,1995
.;Haslett et al ., 1999 ; Rubin & Reisner ., 2009)

(٢- ٥-٢) الثالاسيميا – بيتا

يعد هذا النوع اكثر خطورة من سابقه وتصنف الثالاسيميا بيتا اعتمادا على درجة خطورتها إلى :-

أ- الثالاسيميا الصغرى أوسجية الثالاسيميا

Thalassemia minor or thalasseemia trait

في هذا النوع من الثالاسيميا بيتا لا يكون النقص في بروتين بيتا كبيراً بحيث يؤدي الى مشاكل في الوظيفة الطبيعية لخضاب الدم ، والشخص المريض في هذه الحالة يحمل سجية وراثية (genetic anemia) للثالاسيميا وهو عادة لايعاني من مشاكل صحية لكنه قد يعاني من فقر دم معتدل كما في ثالاسيميا ألفا المعتدلة وغالباً مايخطأ الطبيب في تشخيص هذا المرض لتشابهه مع فقر دم نقص الحديد Iron deficiency anemia في شكل خلايا الدم الحمراء الصغيرة . (piomelli & loew ,1991; Rund & Rachmilewitz,1995 ; Net -1) .

ب- الثالاسيميا بيتا الوسطى

Beta- Thalassemia Intermedia

وهو نوع معتدل الخطورة إذ يمكن أن يصنف بين النوعين الاول والنوع الثالث من حيث الخطورة ويبقى المريض بالثالاسيميا المتوسطة على قيد الحياة من دون أن ينقل اليه الدم ,ويكون أغلب المرضى بصحة جيدة تماماً حتى بعد سنتين من العمر ثم يظهر عندهم بعد ذلك فقر دم معتدل يصبح خطراً في ما بعد . (Ngo et al ., 1994 ; Rund & Rachmilewitz, 1995 ; pearson et al .,1996 ; Rubin & Reisner , 2009) .

جـ- الثالاسيميا الكبرى أو فقر دم كولي

Beta- Thalassemia Major or Coolye's anemia.

و يمثل هذا النوع الحالة الخطرة من الثالاسيميا حيث يحدث فيه نقص كامل لبروتين سلاسل الغلوبين بيتا في خضاب الدم ويتسبب في فقر دم خطير مهدد للحياة ومعتمد على نقل الدم ويتسبب أيضاً في تضخم الطحال وتشوه العظم و تظهر كريات الدم ناقصة الصباغ

(hypochromic Macrocytosis) وتظـــهر خلايا دم حمـــراء صغـــيرة (Microtosis)نتيجة لفقر الدم كما تظهر حالة تعدد الاصطباغ او الحؤول اللوني (polychromia) وتظهر أحيانا كريات دم بيضاء غير ناضجة (immature leukocytes).

(piomell& loew , 1991 ; Giardina & Hilgartnerm , 1992 ; Rund & Rachmilewitz.,1995; Vullo et al ., 1995 ; Ledingham et al ., 2000; Net .1).

بالإضافة إلى (الثالاسيميا ألفا وبيتا) هناك اضطرابات أخرى وهي تحدث عندما يكون جين (الثالاسيميا ألفا وبيتا) مع جين طافر أو غير طبيعي وهي :-

E – beta thalassemia (٣ -٥-٢)

خضاب الدم E (HbE) هو من أكثر أنواع خضاب الدم غير الطبيعي الشائعة ويوجد عادة في مجتمعات شرق الولايات المتحدة مثل جورجيا والاباما . وهذه الحالة ناتجة من اتحادBeta- Thalassemia وخضاب الدم E فينتج عن ذلك E- beta thalassemia وهو فقر دم معتدل الخطورة وأعراض هذه الحالة مشابهة لـ Beta- Thalassemia intermedia .

Sickle beta thalassemia (٤ -٥-٢)

هذه الحالة ناتجة من اتحاد خضاب الدم S (Hbs) مع Beta -thalassemia ويكون خضاب الدم غير طبيعي ويوجد في المصابين بفقر الدم المنخلي (Sickle Cell disease) ويوجد هذا النوع في دول البحر الابيض المتوسط مثل ايطاليا وتركيا (Atwen & forget ., 1987 ; Waye et al ., 1991 ; Olivieri.,1999. .Mentzer & Khan ., 2001 ; AL- Akawi et al ., 2009 , Net . 1)

(٢-٦) أعــراض المرض

يعاني المرضى من فقر دم خطر في المدة بين الشهر الثالث والشهر السادس الاولى من العمر ،ويلاحظ فيهم ايضاً تضخم الكبد والطحال (hepatosplenomegaly) بسبب (haemopoeisis) وتوسع عظام الوجه بسبب زيادة غير طبيعية في عدد الخلايا في النخاع (marrow hyperplasia) مع ضعف وشحوب غير طبيعي ,ويحصل عندهم عبء اضافي من الحديد (Iron over load) بسبب نقل الدم المتكرر,بالاضافة الى ان هؤلاء المرضى يعانون من مشاكل قلبية كبرى تسبب الموت في المصابين بالثالاسيميا الكبرى منهم (Khider., 1990; Vullo et al ., 1995 ; Haslett et al ., 1999 ; Awad ., 1999 ; Bartfay ., 2000 ; Hahalis et al ., 2001 ; Nahla ., 2001 ; Levison et al ., 2008) .

أن تأثير فقر الدم على المريض يحدث نتيجة لنقص قدرة الدم على حمل الأوكسجين وتتناسب شدة هذه الأعراض مع مستوى الخضاب وسرعة فقر الدم ، ويؤثر ذلك في كافة الأجهزة في الجسم مثل جهاز الدوران ،جهاز الهضم ، جهاز العصبي ، جهاز التناسلي ، جهاز التنفس (بازرباشي ، ١٩٩٠) .

(٢-٧) طرق الوقاية من المرض

(٢-٧-١) فحوصات قبل الولادة

أذا كان الوالدان يحملان صفة الثالاسيميا بيتا فمن الممكن أن يتم فحص الجنين للتأكد من سلامته من المرض خلال الأسبوعين العاشر والحادي عشر من الحمل . ويتم الفحص بأخذ عينة من المشيمة (chrionic villous) وتحليلها بواسطة فحص الحامض النووي DNA لمعرفة إذا ما كان الجنين مصاباً بالثالاسيميا أم لا ، وكذلك يجب معرفة نوع الطفرة الموجودة في العائلة مسبقاً لكي يستطيع الأطباء الكشف عنها . وكما هو الحال في جميع الفحوصات الطبية فقد تكون هناك بعض المضاعفات واحتمال الإجهاض من جراء سحب العينة بنسبة (١%) من المشيمة

أو عن طريق سحب السائل الامينوني الموجود حول الجنين والذي يؤخذ في المدة بين الأسبوعين (١٤- ١٧) من الحمل ويكون إحتمال الإجهاض في هذه الحالة ٠,٥ %.

(Cheng et al,2003 ;Eleftherio, 2003)

(٢-٧- ٢) فحوصات قبل الزواج

يمكن الكشف عن أي شخص لمعرفة ما اذا كان حاملاً للمرض بطريقة سهلة حيث ينصح بأجراء تحليل لكل من له أصول عرقية من منطقة الخليج العربي وجنوب السعودية واليمن والمناطق الشمالية من السعودية ومناطق حول البحر الأبيض المتوسط وان كان من الأفضل أن يجرى هذا التحليل لكل من يريد الزواج بغض النظر عن أصوله العرقية لمعرفة سلامته من الإصابة بالثالاسيميا .

(٢-٧- ٣) منــع زواج الأقارب

كلما زادت نسبة زواج الأقارب زادت نسبة الإصابة بالمرض وقد اتفقت على هذا الامر كل الدراسات التي أجريت ، وتنتشر هذه الزيجات في الحضر والريف منذ زمن بعيد لاسيما زواج الأقارب المبكر بصرف النظر عن النواحي الصحية ذلك أن سببه الأول في الريف المحافظة على الإرث والأرض والمواشي أي أنها أسباب اقتصادية بحته أما أسبابه المدنية فهي المحافظة على المستوى الاجتماعي للأسرة لاسيما في المجتمعات الغنية وان كانت الأرقام تظهر أن نسبة

زواج الاقارب في المجتمع الحضري اقل مما هي عليه في المجتمع الريفي ومن ثم فان ضحاياه اقل .لذلك فان من الضروري ان تكون هناك استشارات وراثية عند الزواج أو قبل الحمل بشكل خاص عندما تزداد درجة القرابة (السيد و كوثراني ، ٢٠٠٧) .

(٢-٧- ٤) تقنية إختبار الأجنة وراثياً

يمكن الوقاية من هذا المرض باستخدام هذه التقنية قبل الحمل حيث تمكن العديد من الآباء والأمهات حاملي الصفات الوراثية المتنحية من إنجاب أطفال أصحاء خالين من مرض الثالاسيميا ، وذلك بعمل الاختبار الوراثي المبكر للأجنة قبل ترجيعها للتعلق بالرحم من خلال برنامج طفل الأنبوب والتخصيب المجهري ، حيث بعد تخصيب البويضة بالحيوانات المنوية

ينقسم الجنين بطبيعته إلى عدد من الخلايا المستقلة كل واحدة تشبه الأخرى . ولذا يمكن اختبار خلية واحدة وراثياً لتعكس التركيبة الوراثية الكاملة للجنين كوحدة واحدة ولهذا يتم الاختبار على خلية واحدة من العلقة تؤخذ بمساعدة الأجهزة الدقيقة الميكروسكوبية بدون أحداث أي ضرر للجنين ثم يبدأ تحليل مكونات نواة الخلية لاكتشاف عيوب الكروموسومات المعيبة بطريقة مسح دقيقة للأمراض الوراثية ومن ضمنها الثالاسيميا (صاحب،٢٠٠٥).

(٢- ٨) *تشـــخيص الثالاسيميا*

الثالاسيميا كأي مرض آخر يحتاج في تشخيصه إلى عدة مراحل مهمة هي تأريخ المرض والأعراض ، الفحص السريري ، الفحوص المختبرية .

(٢- ٨ - ١) الفحوصات السريرية Clinical Examination

تعتمد الفحوصات السريرية على نوع الثالاسيميا فإذا كانت من النوع البسيط (الثالاسيميا الصغرى) فقد لا تظهر لدى المريض أية أعراض أو قد تظهر علامات شحوب بسيطة عليه بسبب فقر دم بسيط وذلك خلال السنة الأولى من العمر . إما الثالاسيميا المتوسطة فإن

المصاب تظهر عليه علامات فقر دم في أوقات متأخر قد تصل إلى العقد الثاني من العمر . أما الثالاسيميا الكبرى فينتج عنها فقر دم شديد يعتمد على نقل الدم المنتظم بصورة أساسية وبخلاف ذلك يكون الموت هو مصير المريض إضافة إلى أعراض أخرى مثل التغير في شكل العظام وخصوصاً عظام الوجه والوجنتين حيث تصبح ملامح الوجه مميزة لهذا المرض كما يحدث ضعف في الشهية وتأخر في النمو وإصابات متكررة بالالتهابات وضعف عام وتضخم الكبد والطحال التي يمكن تحديدها من خلال الفحص السريري .

(piomelli & loew , 1991 ; Gardinia & Hilgartner , 1992;Rund& Rachmilewitz ., 1995 ; Haslett et al .,1999; Awad , 1999 ; Nahla , 2001; Tyagi et al ., 2003 ; net.1).

(٢- ٨ - ٢) الفحوصات المختبرية

(٢ - ٨- ٢ -١) الفحوصات الدموية *Haematological examination*

يتضمن الإختبار الإبتدائي عدّ خلايا الدم الكامل Complet blood count (CBC) إختبارات الذوبانية والتقدير الكمي لـ HbA_2 , Hbf فاذا كان خضاب الدم غير طبيعي يتم

تشخيصه باستخدام تقنيات يوصى بها لهذا الغرض . هذه التقنيات تتضمن ترحيل كهربائي في اس هيدروجيني (٦,٢-٦) وفصل سلاسل الغلوبين و Iso Electric Focusing (IEF)

إضافة إلى الاختبارات المتضمنة اختبارات الثباتية والحرارة التي يوصى بها لفحص HbS غير المستقر أو HbS مع تغير ألفة الأوكسجين .

(Oucn & Rognerud. , 1993 ; Papadea& Cate. , 1996 ; Eastman et al ., 1996 ; Mario et al. , 1997 ; Fisher et al . , 1997; Fucharoen et al. , 1998 ; Rioux et al .,1999 ; Campbell et al . , 1999)

عَدّ خلايا الدم الكامل **Complete Blood Count (CBC)**

يتضمن فحص (CBC) :- تقدير نسبة خضاب الدم , عَدّ الخلايا الدموية الحمراء (RBC) (RDW)،

Red Cell Distribution width (RDW) , Mean Corpuscular Volume (MCV) , Red Blood Cell Number .

ويعد معدل حجم الكريات (MCV) مؤشراً تشخيصياً عندما تصنف الثلاسيما بصورة عامة كأنيميا ناقصة الصباغ hypochromic anemia وأنيميا صغيرة الكريات (Microcytic anemia) علما أن كل الفحوصات الدموية المُشغلة آلياً تجرى بقياس (MCV) الذي يكون دقيق ويقدر بالفيمتوليتر(Femtoliter) وفي اغلب البالغين يكون بحدود FL (~ ٨٠ _ ١٠٠) (Watherall& Clegg. , 2001) .

بصورة عامة أن الإصابة بالثالاسيميا تقلل من معدلات مؤشر (MCV) واقترحت الدراسات إن (MCV) بنسبة FL (٧٢) هو الأنسب لتشخيص يمكن قبوله لمتلازمات الثالاسيميا وإن الوصول إلى نتيجة أن (MCV) الطبيعي FL (≥٨٠) و (MCH) Mean Cellular Hemoglobin Pg(٢٧) هي قاعدة لأغلب حالات الثالاسيميا ولا تتطلب إختبار ثالاسيميا إضافي (Lafferty et al. , 1996 ; Old , 2003) .

مدى توزيع الخلايا الحمراء Red Cell Distribution width (RDW)

وهو مقياس لدرجة التغيير في مدى توزيع الخلايا الحمراء . فمثلاً تكون بعض أسباب أنيميا الكريات الصغيرة Microcytic anemia هو نقص الحديد Iron deficiency الذي يميز بزيادة في (RDW) بينما في الثالاسيميا تميل إلى إنتاج مجتمع من الكريات الحمر الصغيرة بنفس الدرجة وبدون الزيادة في (RDW) في .Thalassemia minor (hedlund,1980) .

لكن هذا الفحص لايعد مؤشراً وحيداً عملياً في التشخيص .لذلك فان عدّ RBC يستعمل كملحق تشخيصي بسبب أن الثالاسيميا تنتج (Microcytic anemia) مع زيادة في عدد RBC ، ويحدث تناقص في تركيز خضاب الدم بحسب درجات المرض(Lafferty et al. , 1996).

جدول رقم (٢ - ٣)أدلة خلايا الدم الحمراء في المرضى المصابين بالثالاسيميا بيتا.

Red blood cell index	**mean**	**range**
Hb g/dl	6.8	3.9-9.3
MCH pg	20.9	15-26
MCV FL	65.8	57-75

(Eleftheriou,2003).

من الفحوصات المختبرية الدموية الأخرى هو إختبار تحديد نسبة Inclusions (Hb H) حيث يشير (HbH) إلى خضاب دم (Tetramer) غير ذائب يتشكل من أربعة سلاسل - Beta globin , ففي حالة الثالاسيميا ألفا عندما يكون هناك نقص في إنتاج سلاسل Alfa –globin يؤدي الى زيادة HbH وإن سبب هذا الترسيب هو أكسدة خضاب الدم مما يجعله مرئياً مجهرياً . ويمكن أن يجرى هذا الاختبار داخل المختبر (in vitro) بتثبيته وباستخدام التصبيغ للخلايا بصبغات مثل (New Methylen blue) أو (Brilliant cresyl blue) .

حيث تحتوي عينات الدم المفحوصة للمرضى المصابين بالثالاسيميا ألفا على جسم واحد (One inclusion) على الاقل لكل (١٠٠٠- ١٠٠٠٠) خلية (Hall et at.,1995) .

وقد ذكرت الدراسات إن اختبار H body غير حساس بدرجة ١٠٠% ولذلك غياب H bodies لا يعني أن يكون الشخص حاملاً للثالاسيميا ألفا .ومن ثم فالدراسات الجزيئية هي التي تؤكد أو تظهر حامل حالة الثالاسيميا ألفا من عدمها (SOGC , 2008) .

(٢-٨-٢-2)الترحيل الكهربائي لخضاب الدم Hemoglobin electrophoreses

يعد الترحيل الكهربائي الطريقة الفضلى لفصل ومعرفة طبيعة الإعتلالات الخضابية (Schmidt et al . , 1974 , Schneider , 1978 ; Majhi et al , 2007).

وهو اختبار متخصص لتشخيص أنواع محددة من الإعتلالات الخضابية (haemoglobinopathis) التي تنتج عن خضاب الدم التركيبي ومتلازمات الثالاسيميا , اضافة الى إنه يفحص حالة حامل المرض لبعض الأمراض المهمة (El hazmi. et al. , 1994 ; Adekile & Haider. , 1996) .

إكتشاف وتشخيص هذه الإمراض بالفحوصات المختبرية لعينات الدم لا يمكن الاعتماد عليه من خلال (CBC) فقط وإنما يتطلب ترحيلاً كهربائيا أو(HPLC) liquid chromatography high performance (skogerboe et al .,1992) .

ويستخدم الترحيل الكهربائي لخضاب الدم لمعرفة متغيرات Hb (Hb varient) . مثل HbA2, HbA, Hbf, HbE, HbD, Hbc.(majhi,2007,SOGC,2008) أن الترحيل الكهربائي لخضاب الدم يتم في محلول منظم قاعدي (السيليلوز أسيتيت)وهو الوسط الرئيسي المستعمل إذ إنه يزيد الانفصال السريع لـ Hbc,HbF,HbA والأنواع الأخرى من خضاب الدم الطافر (Schimdt et al . ,1974;Schneider,1978;Majhi et al.,2007).

ويمكن التشخيص بالترحيل الكهربائي بإستعمال جل الآگار والستريت آكار في الأس الهيدروجيني (٨،٦) و(٦)على التوالي (Maeder&conley,1959;Majhi et al;2007) وأن الترحيل الكهربائي لخضاب الدم في الأس الهيدروجيني (٨،٦) بإستعمال منظم (barbitone) مع قوة أيونية M (٠٥،٠) وفولتية ثابتة V (٢٠٠-٣٠٠) يؤدي إلى فصل HbA و HbA_2 وبعض المتغيرات الشائعة مثل Hbs و Hbc بالاعتماد على شحنات السطح و في هذا الأس الهيدروجيني تكتسب جزئيات HbA شحنتين سالبتين أو أكثر منHbs وHbA_2 واربع شحنات سالبة من Hbc بالاعتماد على تعاقب الأحماض الأمينية في الغلوبين . نتيجة لذلك تتحرك HbA في هذا الأس الهيدروجيني إلى أقصى الانود (الطرف الموجب) في الحقل الالكتروني ، وإذا ظهر في العينة التالية غيابHbA فان هذا يدل على وجود اماHbA_2 او

Hbs اللذين ينتجان نفس الشحنة مما ينتج مشكلة تشخيصيه (Majhi et al. , 2007)، و تعتمد هذه الطريقة على تفاعلات معقدة لخضاب الدم مع المحلول المنظم (الأس الهيدروجيني القاعدي) المرحل كهربائياً وسند الأكار.(Schmidt et al., 1974 ; Schneider.1978) .

وبأستعمال وسط (الستريت آگار) ذي الطبيعـــة الحامضيـة في الأس الهيدروجيني (٦) HbA و Hbs يكتسبان شحنات السطح الموجبة ويتحركان باتجاه الكاثود (الطرف السالب) و يبقى Hbc يحمل شحنات سالبة ويتحرك باتجاه الأنود (Majhi et al. , 2007) .

تطـورت طـرق الترحيل الكهربـائي تجاريـاً لتسمـح بالفصـل بـالأُس الهيدروجيـني (٨,٤) القاعـدي بـالأس الهيدروجينـي (٦,٢) الحامضـي علـى جـل الأگـاروز (Agarose gel) حيث أن ذلك يعطي الخلفية الملائمة للسماح بتحديد خضاب الدم الموجود بواسطة

طريقـة مطيافيـة (densitometric Scanning) ولجعـل حـزم خضـاب الـدم مرئيـة يـتم التصبيـغ بـ Amino black و Acid Violet أو صبـغات أخـرى مشابهـة (&Papadea cate , 1996).

وهناك بعض العوامل التي تؤثر على نتائج الترحيل الكهربائي لخضاب الدم مثل الأُس الهيدروجيني وتركيز المحلول المنظم للترحيل الكهربائي و الرطوبة المحتواة في الغشاء والفولتية المستعملة . وقد ثبت من خلال نتائج الدراسات تأثير المحاليل المنظمة على نتائج الترحيل الكهربائي لخضاب الدم لانها عنصر مهم عند إجراء الترحيل الكهربائي لمتغيرات خضاب الدم (Liu & Jiang , 2001).

تعد هذه التقنية (الترحيل الكهربائي) بطيئة وغير دقيقة في تحديد الكميات الواطئة من متغيرات Hb (مثل HbA2) او في فحص متغيرات Hb الأخرى مثل (HbH) , إذ يكون الفحص ناقصاً غير متقن باستعمال (densitometric Scanning) في الجل المرحل . (Papadea , 1996) , في الوقت الذي يكون فيه تشخيص (HbA2) مفضـلاً فـي تشخيـص Beta -thalassemia (Homozygous). (Majhi et al , 2007) بالمقارنة مع تقنيات (HPLC) (Papadea & Cate , 1996) .

من تقنيات الفصل الأخرى المعتمدة على الترحيل الكهربائي المستخدمة في تشخيص حالات الثلاسميا هي :-

التبئير الكهربائي المتناظر (IEF) Iso electric focusing

وهي تقنية ترحيل كهربائي استعملت لمعرفة وقياس كمية Hbs . (Campbell et al . , 1999) . إن وسط (IEF) مصنوع بشكل متعادل حيث إن خضاب الدم يهاجر في أُس هيدروجيني متدرج إلى الموقع الذي شحنته صفر , وإن ترتيب هجرة خضاب الدم بالـ (IEF)

هي نفسها في الترحيل الكهربائي القاعدي مع عزل HbC من HbE و HbS من HbD HbGبالإضافة إلى تحليله HbA و Hbf بنقاء (Turpeinen et al. , 1995) .ومع إن

هذه التقنية مستنفذة للوقت (Campbell et al ., 1999) إلا إنها تتصف بعزل فائق وإن الحزم الضيقة المستحصلة منها تسمح بقياس كمي دقيق ومحدد أكثر من الترحيل الكهربائي القياسي (Turpeinen et al ., 1995) .

ومن تحويرات تقنية (IEF) تقنية أخرى تعرف بالتبأير الكهربائي الشعري (CIEF) Capillary IEF وتستعمل هذه التقنية لقياس كمية متغيرات خضاب الدم مثل HbA و HbF (Cotton et al . , 1999) .

ويتم هذا الفصل بهذه الطريقة بالإعتماد على نقطة التعادل الكهربائي Iso electric point لخضاب الدم وذلك يزيد من إمكانية استعادة النتائج المتطابقة .

(Hempe & Graver , 1994 ; Mario et al ., 1997 ; Cotton et al. , 1999) وبمقارنة CIEF مع كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (Cation – exchange chromatography) للتحليل الكمي والنوعي لمتغيرات Hb وجد إن البيانات الكمية بين الطريقتين ترتبط بعلاقة تطابق عالية وإن CIEF تعطي إلى حدما أفضل عزل لمتغيرات Hb

غير الإعتيادية (HbD و HbC) (Mario et al. , 1997) ومع أن تقنية الترحيل الكهربائي الشعيري الممنطق(Capillary Zone electricphoresis)هي تقنية أسرع وأكثر حساسية وأكثر انتقاءً للكشف عن تغيرات خضاب الدم .(Lin et al ., 1999). إلا إن التكلفة العالية لهذهِ الطريقة تحد من استخدامها لذلك يبقى الترحيل الكهربائي مع السليلوز أستيت طريقة روتينية للتحري في المختبرات السريرية (Jenkins et al , 1997)(**٢- ٨-٢- ٣)**

كروموتوگرافيا السائل عالية الفعالية

(HPLC)High performance Liquid chromatography

وهي طريقة ممتازة للتقصي الابتدائي عن متغيرات خضاب الدم والاعتلالات الخضابية (oucn & Rogerud , 1993 ; papadea & ومن ضمنها الثالاسيميا ألفا وبيتا

cate , 1996 ; Eastman et al ., 1996 ; Rioux et al., 1997 ; Mario et al ., 1997 ; Fisher et al ., 1997 ; Fucharoen et al ., 1998 ; Campbell et al ., 1999 ; Marouf et al ., 2002 ; Melo et al 2009).

وتعين كميات HbA_2 ,HbF ,HbE ,Hbc ,HbS ,HbH في البالغين والأطفال حديثي الولادة وفي الأبوين الحاملين للمرض (Wasi , 1983 ; Fucharoen et al ., 1998 ; Eastman et al ., 1996 ; Meloe et al ., 2009; Sirichotiyakul et al ., 2009 ; Hoppe , 2009) .

و تعد هذه الطريقة حساسة ودقيقة لفحص خضاب الدم غير الطبيعي وذات فائدة تفوق فائدة التقنيات الكروموتوغرافية الأخرى في ميزتي السرعة والدقة وإمكانية النسخ العالية بالإضافة لتحليلها عدداً كبيراً من العينات لذا زاد العمل بصورة واسعة في السنوات الأخيرة (Samperi , 1990 ; sirichotiyakul et al ., 2009) .

تعتمد هذه التقنية على جهاز فصل أوتوماتيكي باستخدام الفصل بالتبادل ألايوني Cation exchang HPLC – يطلق عليه (VARIANT) ; (Wasi , 1983 ; Eastman , 1996) Melo et al ., 2009)

هذا الجهاز الآلي تستخدم فيه محاليل منظمة (الصوديوم فوسفيت) وصمم خصيصاً لظروف خاصة وتستخدم فيه ايضاً مضخات ومكابس ثنائية ودرجة ميل محددة لتسمح لمحلولين منظمين مختلفين بالعبور خلال العمود الحاوي على الراتنج (Resin) لزيادة القوة الأيونية خلال مدة بين خمس وست دقائق وتحفظ العينات الدموية للمحافظة عليها ثابتة بدرجة (١٢) درجة سيليزية الى أن يتحقق منها اوتوماتيكاً في مجرى التحليل و تحدد الكثافة الضوئية بواسطة جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometry) الذي يقرأ على الأطوال الموجية ٤١٥ و ٦٩٠ نانومتر (oucn & Rahnerud , 2001) .

أن عمل قياس كمي لـ HbA_2 غير ممكن بوجود متغيرات خضاب الدم الأخرى مثل HbE و HbG وHbo و Hbs لذا أستعملت مجموعة من التطبيقات Micro anion exchang column للتخلص من هذه الاعاقة (White et al. , 1993 ; suh et al , 1996 ; Fucharoen et al. , 1998 ; Cotton et al . , 1999).

وطورت هذه التقنية بشكل كبير حيث أستخدمت معها أداة الرؤية ثلاثية الأبعاد 3D-visualization لإستخراج النتائج بشكل معلومات تمثل بيانياً وتوضح الطرز المظهرية

للثالاسيميا ألفا وبيتا بأشكال فراغية تفسر هذه الطرز نظرياً وسميت هذه الأشكال بـ (Fast Map DB) (Melo et al ., 2009) .

وكذلك طورت طريقة (Denaturing HPLC (DHPLC التي تفصل فيها جزيئات DNA المزدوج التي تختلف بزوج قاعدي واحد وهذه الطريقة طبقت في حقل البايلوجي الجزيئي ومن تطبيقاتها فحص النيوكليوتيد المفرد متعدد الأشكال(SNP_s) Single nucleotide polymorphisms)لان الاختلافات في الزوج القاعدي الواحد تؤدي إلى تنوع المعلومات الوراثية في المجتمعات واستخدمت هذه التقنية في تحاليل(Y-chromosome) وأستخدمت ايضاً كثيراً في الطب في تشخيص الطفرات التي تسبب عدد من الأمراض . (Robinson, 2003) .

(٢-٨-٢-٤) فحــوصات الوراثة الجزيئية

Molecular genetics examination

أ- الفحوصات الجزيئية المعتمدة على تقنية PCR .

عند إجراء الفحوصات المهمة في تشخيص الثالاسيميا ، يكون الهدف هو التعرف على نوع الطفرة أو الحذف الموجودين في الجين المسؤول عن إنتاج بروتين الغلوبين (globin gene) وذلك من خلال الحصول على عينات DNA من خلايا الدم البيضاء أو النخط بالسحب من المشيمة أو من أي نسيج يمكن استخدامه للتشخيص ، والطفرات التي يبحث عنها والتي تسبب متلازمات الثالاسيميا – ألفا أوبيتا هي الطفرات النقطية بصورة أساسية وقد استعملت تقنية تفاعل السلسلة للبوليميريز (Polymerase chain reaction PCR) بشكل واسع باستعمال مجسات خاصة (allele- specific probes) وبواديء خاصة (allele- specific primers) لتشخيص

الطفرات التي تتضمن غالباً حذف سلاسل الغلوبين المتضمنة HbD , HbE, Hbs , والثالاسيميا بيتا وألفا

(Newton et al.,1989; Najmabadi et al ., 2001 ; Karimi et al ., 2002 ; Kham et al ., 2004 ; Fakher et al ., 2007; AL-Akawi et al ., 2009 ; sirichotiyakul et al ., 2009)

و استخدمت تقنية (PCR) لتضخيم تتابعات DNA في عام ١٩٨٦م لعينات DNA البكتريا *Mycobacterium tuberculosis* المسببة لمرض السل عندما عزلت من الرئة والنسيج اللمفي لأحدى المريضات وكان هذا أول استخدام لهذه التقنية حيث سمحت لقطع DNA أن تتضخم بساعات قليلة وبكميات صغيرة جداً .

وقد أحدثت هذه التقنية تغيراً ملموساً في علم البيولوجي الجزيئي والآن هي أهم تقنيات الوراثة الجزيئية المستخدمة . (Yan et al .,2000)

أن الأساس في عمل(PCR) هو التفاعل المحفز بواسطة إنزيم DNA polymerase الذي يعمل بوجود :-

١- قالب DNA مفرد الشريط يستنسخ منه شريط DNA الجديد .

٢- باديء حاوي على المجموعة الحرة ($\overline{3}$- OH) التي تستقبل النيوكليوتيدات الجديدة .

والبواديء المستخدمة في تقنية (PCR) هي قطع قصيرة يتراوح طولها بين (١٧ – ٢٥) نيوكليوتيد التي تكون مكملة للتتابع المعروف على القالب والمحلول الحاوي على الحامض النووي الهدف يجب أن يحتوي على أنزيم DNA polymeras و dexyribonucleosid(dNTPs) وأيونات المغنسيوم والأملاح الأخرى الضرورية للتفاعل في تقنية PCR وتعمل هذه التقنية بعدد من الخطوات المتسلسلة معتمدة على تغير درجة الحرارة . (Hartl&Jones , 1998 ; Connell , 2002 ; Crocker & Murray 2003 ; Al – Akawi et al ., 2009).

ولهذه التقنية استخداماتها الكثيرة في تشخيص الطفرات وفي معرفة الأساس الجزيئي لها وإيجاد الجين أو أي تتابع معين لذلك كان لها دور مهم في الطب في مجال تشخيص الأمراض .

(Tsuchihashi & Dracopoli , 2002 ; Bhardwaj et al ., 2003; Kham et al ., 2004 ; Sirichotiyakul et al ., 2009) .

وهناك عدة تقنيات جزيئية معتمدة على (PCR) يمكن إستخدامها في تشخيص متلازمات الثالاسيميا منها :-

١- تقنية تضخيم الطفرات المقاومة

Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

وتدعى أيضا PCR Amplification of specific Allele) أو (ARMS-PCR)

(Newton etal.,1989; old et al.,1990; ye et al.,2001; fakher etal.,2007).

وهي تقنية شائعة الاستعمال طبقت لفحص طفرات الثالاسيميا- بيتا، واستخدمت في العراق للتشخيص الجزيئي للطفرات الوراثية المسببة للثالاسيميا-بيتا فشخصت في إحدى الدراسات الطفرات (IVS nt.1,IVS1 nt.5,IVS1 nt.6,IVS1 nt.110, codon39,IVS2 nt.1,IVS2 nt.745) (AL-Assadi , 2007).

وهذه التقنية طريقة مباشرة لتشخيص وتوصيف الطفرات النقطية والحذوفات والإدخالات الصغيرة في جينوم DNA و تستخدم كذلك في تشخيص الطفرات المتجاورة في مزيج عينات DNA كما تستخدم في تشخيص الطفرات المتجاورة في مزيج عينات DNA والطفرات غير المعروفة، وهي طريقة سريعة وتظهر النتائج خلال ساعات قليلة وقابلة للنسخ ورخيصة الثمن.

(Newton etal.,1989; old etal.,1990; Najmabadi etal.,2001; Stephen,2002; fakher etal.,2007; AL-Assadi,2007).

وفي هذه التقنية تستخدم بواديء تصمم متوافقة مع تتابعات خاصة وتكون هذه البواديء قليلة النيوكليوتيدات مؤلفة من ٣٠ قاعدة وتحتوي على القواعد G,C بنسبة ٥٠% وتستخدم بواديء أخرى إضافية للسيطرة ضرورية لتفاعل PCR. وتعتمد تقنية (ARMS) على مبدأ أن Taq polymerase ليس له فعالية الأنزيمات القاطعة الخارجية بالاتجاه ٣ إلى ٥ لذلك ينتج ازدواج غير ملائم (mismatch) بين النهاية ٣من البادئ و القالب-AL). Assadi,2007)

٢. تقنية الترحيل الكهربائي المتدرج الماسخ

Denaturing gradient gel Electrophoresis(DGGE)

استخدمت هذه التقنية في تقصي طفرات الثالاسيميا- بيتا وألفا والطفرات غير المعروفة ومتعددة الإشكال (Fernande etal.,1993; Fakher etal.,2007) .وتعتمد في عملها على بروتوكول معين تستخدم فيه قوة كهربائية (200)فولت و (٦)أمبير في (٥) ساعات, و تستخدم فيه مشابك كيميائية (chemical clamps) لكن هذه الطريقة مكلفة جداً بسبب تطلبها لتعاقب GC المكون من (٣٠-٨٠) نيوكليوتيد الذي يجب أن يرتبط إلى النهاية ٥ لأحد البواديء إضافة إلى أن متطلبات تجهيزها الأخرى معقدة إذ يجب أن تراعى الدقة المتناهية في تقدير كميات المركبات الكيماوية للجل والمحلول المنظم وبواديء PCR والظروف الملائمة لعملها (Fernande etal.,1993) .

٣. تقنية تفاعل السلسلة للبوليمريز المختص بالثغرة Gap-pcr

طبقت هذه التقنية لتشخيص الحذوفات في طفرات الثالاسيميا ألفا وبيتا وازدواج جين ألفا والحذوفات المختلفة و تستخدم ايضاً في تشخيص اعتلالات خضاب الدم مثل تشخيص Hb Leper. (Craig et al, 1994; Tan etal.,1994; chong etal.,2000; Liu et.al.,2000; Weatherall & Clegg ,2001 ; Fakhere etal. ,2007; Hoppe,2009) .

تعتمد هذه التقنية على مبدأ تصميم بواديء لتضخيم DNA المباشر صعب التضخيم لإحتوائه على حذوفات فهذه البواديء صنعت خصيصاً لتشخيص هذه الحذوفات الجانبية لأن هذه الحذوفات تكون صغيرة مثل حذف ٦١٩ زوج قاعدي وهو السبب الشائع للثالاسيميا بيتا في آسيا, خاصة في التتابع الطافر مقارنة مع النوع البري (Wild type). فالباديء يلتحم مع تتابع الحذف لتشكيل ناتج إضافي. ويراعى في تصميم الباديء تخصصه في الحذوفات حيث أن حذوفات الثالاسيميا بيتا تختلف عن حذوفات الثالاسيميا ألفا.

(Faa etal., 1992; Tan etal., 1994; Craig et al, 1994; Chong etal., 2000; Liu etal., 2000; Fakher etal., 2007).

٤. تقنية تحليل الأنزيمات القاطعة نواتج (PCR)

Restriction enzymes analysis of PCR product

أستخدمت هذه التقنية في تشخيص الطفرات المسببة للثالاسيميا بيتا أو ألفا وتشخيصها قبل الولادة و استخدمت ايضاً في تشخيص خضاب الدم تعد طريقة ثانوية في بعض الأحيان.

(Hartle et al. 1989; Dod et al., 1992; Tan etal., 2001; Fakher et al., 2007).

فالأنزيمات القاطعة الداخلية Restriction endonucleases enzymes تنتج بواسطة الأنواع البكتيرية كميكانيكية حماية ضد DNA الغريب وكل انزيم من هذه الانزيمات يميز تتابع DNA المتخصص ويقطع DNA المزدوج في هذا الموقع وتوجد الآف من الأنزيمات

القاطعة الشائعة يعتمد عليها لتشخيص التتابع الخاص لمنتجات (PCR) ومن ثم يتم ترحيلها كهربائيا بالجل ليصبح بالامكان تحديد وجود الطفرات الجزيئية أو غيابها.

(Dod etal., 1992; Hartl & Jones, 1998; Tan etal., 2002)

هذه الطريقة بسيطة ورخيصة نسبياً وفعّالة وتقود إلى نتائج واضحة إلا إنها تتطلب وجود عينات سيطرة لتلافي الخطأ فضلاًعن إنها محددة بطفرات خاصة وتعتمد على بروتوكول PCR. ولهذه الطريقة استخدامات أخرى كاستخدامها في التشخيص السريع للفايروسات البشرية (Dod etal., 1992; Tan etal., 2001; Fakher etal., 2007).

٥. تقنية النيوكليوتيدات المحدودة الاليلية المتخصصة

Allele-Specific oligonucleotide (ASO)

تستخدم هذه التقنية لتشخيص الطفرات للثالاسيميا بيتا أو ألفا و تستخدم في تشخيص أمراض خضاب الدم ايضاً.

(Hartle et al., 1989; Tsuchihashi & Dracopoil, 2002; Kham et al, 2004; Fakher et al., 2007)

تهجن(ASO) إلى جين غلوبين ألفا وبيتا ثم تضخم بـPCR ومن ثم تثبت على مرشحات النايلون بواسطة وصمة سوذرن ثم يفحص التهجين الموجب بواسطة التصوير الإشعاعي الذاتي تحت الظروف القياسية وتقارن النتائج المستخرجة مع السيطرة الموجبة والسالبة للطفرات.

وهي طريقة بسيطة يمكن الاعتماد عليها عند مقارنة الناتج مع السيطرة الموجبة والسالبة، وتطبق هذه الطريقة عندما تفشل الطرق الأخرى أو تكون مناسبة للطفرات المتحرى عنها وذلك لتجنب الفعالية الإشعاعية في الطرق المعتمدة على الفحص الإشعاعي الخطرة إضافة إلى أن هذه التقنية ذات كلفة عالية.

(Hartle et al., 1989; Tsuchihashi & Dracopoil, 2002; Kham et al, 2004;) .Fakher et al., 2007)

ب- الفحوصات الجزيئية غير المعتمدة على تقنية. Non-PCR based analysis (PCR)

١. التهجين Hybridization

هي تقنية تعتمد على تعاقب القواعد النايتروجينية للأحماض النووية (DNA,RNA) الهدف التي تلحم إلى مجس مكمل لينتج الازدواج القاعدي إعتماداً على قاعدة التكامل بين خيطي شريط جزيء DNA. وتستعمل هذه الطريقة لمعرفة موقع الطفرة، لان الطفرات نفسها في حالات الثالاسيميا تكون كبيرة وتحتوي على حذف غير ظاهر الأعراض وتستخدم في حالة كون الجين غنياً جداً بقواعد C,G التي تجعل عمل PCR التقليدي صعباً على الرغم من أن طرق التهجين تستهلك وقتاً أكثر (Helen, 2002).

٢. وصمة سوذرن Southern blotting

وهو تحليل شائع الاستعمال ويسمى ايضًا Southern transfer و Southern analysis وسميت بهذه الأسماء نسبة لمكتشفها لأول مرة عام ١٩٧٥م البروفسور Edwin.M.Sotheren.

تستخدم هذه التقنية في التشخيص قبل الولادة للأزواج الحاملين للثالاسيميا ألفا، وتشخيص الأمراض الوراثية الأخرى قبل الولادة.

. (Hancock et al, 1999; Yan etal., 2000; Crocker &Murray., 2003)

تتلخص طريقة عملها في تقطيع DNA إلى قطع بواسطة واحد أو أكثر من الإنزيمات القاطعة ثم تفصل القطع بالترحيل الكهربائي للجل ثم تمسخ القطع المفصولة وتنقل إلى وسط صلب مثل (النايتروسليلوز أو غشاء النايلون) ثم تنقل قطع DNA مفردة الشريط ويوضع الغشاءفي محلول التهجين ويعلم المجس إشعاعياً أو كيميائياً ثم يربط المجس إلى قطعة من

قطع DNA على الغشاء مما ينتج تتابعات متكاملة. ويغسل الغشاء لإزالة أي مجس غير مرتبط والمجس المرتبط يفحص بواسطة جهاز فحص الأشعة المنبعثة ذاتياً أو باستخدام طرق أخرى (Hancock et al, 1999; Yan et al,2000; Helen,2002).

وقد طور برتوكول تقنية وصمة سوذرن لتجنب المشاكل للطرق التقليدية وذلك باستخدام مجسات غير فعالة إشعاعيا فأصبحت تسمى non-readioactive Southrnblotting hybridization, وهي طريقة دقيقة ومضبوطة في تشخيص الثالاسيميا ألفا. وطورت الأنواع المختلفة من الجزيئات الحيوية التي ترتبط إلى الغشاء الساند وهناك عدة أنواع منها: Radioactive Labelled و Colormetry Lablelled و Flurecent Lablled material ويعتمد نجاح هذه التقنية على اختيار نوع المجس وكيفية التعليم. ووجد إن الجزيئات غير المعلمة اشعاعياً تزيد من الثباتية والتي منها biotin و digoxigenin مقارنةً بالجزيئات الأخرى.

ومن هذه التقنية وعلى المبدأ نفسه أشتقت تقنيات أخرى مثل نورذرن و ويسترن لفحص RNA والبروتين على التوالي اضافة الى ان هناك عدة تطبيقات لوصمة سوذرن منها تجهيز المعلومات حول التنظيم الفيزيائي لتتابعات متعددة النسخ في الجينوم المعقد وفي تجارب الاستنسال مع جينات حقيقية النواة واكتشاف الانترونات ودراسة تركيب وموقع الجينات وفي الخرائط الجينية لتحديد رتبة الجينات على طول الكروموسوم الأمر الذي جعلها مهمة في تشخيص الإمراض الوراثية و من ضمنها الثالاسيميا (Crocker & Murray, 2003).

٣. التوسيم بالبقعة Dot/Slot blotting

وتستعمل لتحديد الطفرات النقطية المسببة للثالاسيميا وتحضيرها يعتمد على نوع الغشاء المستعمل حيث يستعمل النايلون غير المشحون والنايتروسليلوز وتعتمد على مبدأ استخدام الآلاف من جزيئات مجسات DNA القصيرة التي تربط إلى المواد الداعمة – السليكا- وقد طورت هذه التقنية على المبدأ نفسه الى تقنية الشرائح الجينية Gen chip technology. وهذه التقنية غالية الثمن مما يحد من استخدامها(Helen, 2002; Keser et al., 2005) .

٤. تقنية دراسة تتابع الحامض النووي DNA Sequensing

في هذه التقنية يتم دراسة تتابع القواعد النايتروجينية في جزيئة الحامض النووي المعزول من الأشخاص المراد تشخيص المرض فيهم ومقارنته مع التتابع الأصلي السليم للجين المفحوص لغرض تحديد الاختلاف في التتابع الذي يعكس صورة الطفرة المشخصة أن وجدت (Helen , 2002 ; Fakher et al ., 2007)

(٢-٩) العــلاج :

العلاج المستخدم يتضمن :-

(٢- ٩-١) نقل الدم Blood transfusion

يعد نقل الدم المعبأ المنتظم ضرورياً للمحافظة على مستوى خضاب الدم بمعدل(١٢)g/dl حيث ينقل الدم لمنع الموت المتسبب عن فقر الدم في الطفولة ويسمح بنمو طبيعي وتطور خلال مرحلة الطفولة (Eleftheriou,2003 ;Cappellini et al., 2003; Net -1) و ترافق عملية نقل الدم أحيانا بعض المخاطر منها :-

أ- الفايروسات مثل فايروسات hepatitis B and C، فايروس العوز المناعي (HIV) .

ب- البكتريا أما من دم الواهب ، مثل *Treponema pallidum* أو تلوث الدم خلال الجمع من الواهب .

جـ- الابتدائيات (protozoa) مثل .*plasmodium* spp .

د- تراكم الحديد (Iron over load) يواجه المريض خطر تراكم الحديد الذي يجعله عرضة للإصابات البكترية مثل *Salmonella* spp . لذلك يجب أن يفحص الطفل بواسطة (Bacteria culture, Blood film) ويستخدم علاج مضاد للميكروبات مثل gentamicine ومضادات أخرى (Busch et al ., 2003 ; Frank& Berkowitz,2007). **(٢ - ٩ - ٢)**

العلاجات الساندة Supportive treatment

أ- العلاج بالديسفيرال وحامض الاسكوربك Desferrioxamin و Ascorbic acid

لعدم وجود طريقة طبيعية للتخلص من الحديد في الجسم يستخدم هذا العلاج ، إذ يزداد الحديد في خلايا الدم فيسبب (Iron over load) فيصبح عنصراً سمياً للأنسجة والأعضاء لاسيما الكبد والقلب لان الفائض من الحديد ينتج عنه الموت المبكر للمريض من جراء فشل عضوي ، وللمساعدة في إزالة الحديد الفائض يعطى المريض (Iron chelation therapy) وهو دواء يقدم للجسم يرتبط مع الحديد الفائض ويزيله من خلال البول أو الغائط .

وقبل عدة سنوات فقط إنفقت ادارة الغذاء والدواء(FDA) (Food and Druy administrator) على استعمال العقار الكيمياوي ألكلابي (Desferal) الذي يكون حقنه مؤلماً وصعباً لذا تستعمل محقنة خاصة وفي تشرين الثاني ٢٠٠٥م وافقت (FDA) على عقار فموي (Exjade) وهو حبة أو كبسولة تذوب في الماء تعطى عن طريق الفم .
(pearson et al., 1996; Net-1) ثم أنتج منتج لأفراز الحديد عن طريق الجهاز البولي وهو (١٠٠) ملغم من Ascorbic acid تعطى للمريض علماً إن الجرعات الكبيرة من Ascorbic acid تنتج سمية العديد من المرضى الذين يحدث لهم (over load) Aydinok . (et al ., 1999; pearson,1996)

ب- حامض الفوليك Folic ***acid***

يعطى حامض الفوليك للأطفال المصابين بـ (Thalassemia major) للزيادة في فعالية تكوين كريات الدم الحمر (Erythropoiesis) ، إذ أن نقص Folic acidو $Vit. B_{12}$ في الثالاسيميا بيتا يكون موجوداً و ينصح بالإضافات (Supplements) مع Folic acid و $VitB_{12}$. (Sarya et al .,1984) , في حين ان مرضى الثالاسيميا الذين لاينقل لهم الدم بصورة منتظمة تحدث لهم زيادة في استهلاك الفولات (Folates) لذا تعطى لهم (Supplements) بكمية (1)Mg/dmy إذا حدث النقص (cappellini et al. , 2003) .

(٢ - ٩ -٣) التداخل الجراحي

استئصال الطحال Splenectomy

أغلب المرضى بالثالاسيميا بيتا (homozygous) يستلزم أن يجرى لهم استئصال الطحال في أوقات من حياتهم (Pearson et al, 1996 ; AL hashimy , 2002) .

والسبب الرئيسي لاستئصال الطحال هو إختزال متطلبات الدم التي تزداد بوجود فرط الطحالية (hypersplenism). إن استئصال الطحال ضروري أيضاً عندما يتضخم الطحال الذي يمثل السبب في الإرهاق الجسمي ,وينتج من فرط الطحالية حالات مرضية عديدة منها النقص غير الطبيعي في عدد الصفائح في الدم الجاري في الجسم (Thrombocytopenia) وقلة العدلات (Jassim, 1989; Al- hashimy ,2002).

يكون استئصال الطحال بعد خمس سنوات من العمر وبعد العملية الجراحية للأطفال يستمر إعطائهم عقارات واقية من المرض مثل (Penicillin) (Puenmococcal Vaccine). (Pinna et al,1988; Weatherall et al .,1996). ويجب أن ترافق المضادات الحيوية المريض دائماً لعلاجهِ في الوقت المحدد في حالة الحمى أو الخمج أو عضة حيوان ، كما يجب على المريض عدم الانتقال في أماكن انتشار الملاريا لأن هذا المرض يمنح قوة لفرط الطحالية (Cappellini et al ., 2003) .

(٢-٩-٤) زرع نخاع العظم Bone marrow transplantation (BMT)

وهو أحد طرق العلاج المستخدمة لعلاج حالات الثالاسيميا الكبرى بعد التشخيص المبكر للمرض (Barth,2000;Read,2000;Mentzer&clegy,2000) . كما إن هذه الطريقة يمكن أن توفر نسبة شفاء تتجاوز ٨٠٪ من الحالات . (Simone et al .,2001). وبدأت المحاولات لعلاج الثالاسيميا بهذه الطريقة عام ١٩٨١ م مع أكثر من ١٥٠٠حالة وهذه الطريقة تتضمن أخذ نخاع العظم من الإفراد الأصحاء (الواهبون) الذين يهبون نخاعهم إلى المرضى (المستلمون) ، ويدمر نخاع المرضى أولا بواسطة الأدوية أو بالإشعاع بعملية تدعى التكييف(conditioning)

ويؤخذ النخاع الصالح عادة من عظم الورك للواهب ثم يعطى كسائل في مجرى الدم للمرضى بطريقة مشابهة لنقل الدم المنتظم للمرضى و يعالج (BMT) نخاع العظم في المرضى بينما تبقى الجينات المتأثرة للثالاسيميا متوارثة في الأبناء.(Eleftheriou,2003) وحالياً يتم توليد(Induced pluripotent stem cell (ips من خلايا الأرومة الليفية للإنسان المصاب

بالثالاسيميا بيتا وبعد توليدها تصبح ذات قوة علاجية فائقة اذا ما استخدمت في العلاج (BMT) لمرضى Thalassmia Major . (Takahoshi et al ., 2007) . وذلك يتم بالحث المباشر لعدة عوامل استنساخ في خلايا المعدة المتمايزة للإنسان المصاب بالثالاسيميا بيتا حيث تظهر هذه الخلايا تشابهاً كبيراً لخلايا (ES) embryo- derived .

. (Takahoshi et al ., 2007 ;Park et al 2008)

وتجعل هذه الخلايا حياة المصاب بالثالاسيميا أقرب ما تكون إلى الطبيعية وتتم عملية التوليد لخلايا(ips)على وفق بروتوكول متقدم (Okita et al ., 2007) .

(٢-٩-٥) حث خضاب الدم الجنيني HbF induction

وتعتمد على مبدأ التقليل من حالة اللاتوزان في سلاسل الغلوبين مثل الأدوية التي تزيد من أنتاج سلسلة گاما وكذلك تقليل سلسلة ألفا الحرة لأن تلك الأدوية تكبت الفعالية لنخاع العظم وتحفز أنتاج سلسلة گاما ومن هذه الأدوية 5- azacytidine و hydroxyuria ومشتقات butyric acid وتستخدم هذه الأدوية في حالة الثالاسيميا الكبرى لاطالة المدة بين عدد مرات نقل الدم للمرضى أما في الثالاسيميا المتوسطة فيكون دورها هو تأجيل الحاجة إلى نقل الدم والتقليل من ألم العظام وتضخمها . (Migliaccio et al ., 2008 ; ELeftheriou,2003).

(٢- ٩ -٦) المعالجة الجينية Gene therapy

يعد العلاج الجيني هو الحل النهائي للثالاسيميا الكبرى ويتضمن هذا العلاج نقل الجينات الصحيحة إلى الخلايا الجذعية في نخاع العظم ; Yan et al ., 2000 ; Ellis et al ., 1997) persons et al ., 2001 ; cappellini , 2003 ; ELeftheriou ,

2003 ; Malik & .Arumugam et al ,2005)

وكان الاستعمال الحقيقي للعلاج الجيني في عام ١٩٩٠ وذلك بمعالجة الطفل الذي يعاني من مرض نقص المناعة الوراثي نادر الوجود (genetic immuno deficiency disease) الذي يسبب نقص الأنزيم(ADA) Adenosinedeaminase والذي يسبب خطر الإصابة بالسرطان المبكر والبعض منه قد يؤدي إلى الموت في الأشهر الأولى من الحياة (Joseph, 1997) .

يتم الاختبار للعلاج الجيني للثالاسيميا بواسطة نماذج الفئران المريضة بالثالاسيميا بيتا الخطرة . وذلك عن طريق نقل (HSc_s) hematopoietic stem cells

بالاعتماد على نواقل فايروسية مثل (retrovirus) أو (oncoretrovirus) أو Lentivirus

التي أظهرت نتائج جيدة وهذه النواقل تنظم التعبير للجينBeta – globin بمستويات علاجية . , (Ellis et al ., 1997 ; per sons et al ., 2001 ; persons et al 2003 ; Malik & Arumugam , 2005) لان هذه النواقل تحمل جين globin-Beta كما في الإنسان والبروتينات لمنطقة (LCR) (Locus control region) إلا أن العمل مع هذه النواقل لايخلو من مشاكل عدم الثباتية والتركيز الواطئ والتعبير المتغير , (Imren et al. , 2002; persons et al . , 2003 ; cappellini et al. , 2003 ; Malik & Arumugam , 2005)

وحققت هذه الدراسات نجاحاً في الفأر أكثر من الإنسان حيث كانت في الانسان مخيبة للآمال بإستخدام النواقل الفايروسية بسبب أخلاقي واستغراقها مدة طويلة كما أن التأثير السريري يكون ذا دلالة واطئة ; (Cowan et al. , 1999 ; Wu et al . , 2000 . Helen , . 2002)

يتم التعديل الجيني للثالاسيميا بعدة مراحل تتضمن تحاليل خضابية بعد الحصول على عينات الدم من الفئران بعمر ٢- ٤ أشهر وتجري هذه التحاليل باستخدام محلل خلايا الدم المستخدم للحصول على عدّ الدم الكامل (Complet blood count (CBC ، وتعمل شريحة الدم المحيطي لاستخدامها في هذه التحاليل وأجراء الترحيل الكهربائي لتقدير كميات خضاب الدم

الناتج ., (Sabatino et al ., 1998 ; Persons et al ., 2003 ; Malik & Arumugam 2005)

, ومن ثم يتم تحديد إنتاج الخلايا الحمراء الخيمرية Hematopoietic Chimerism بواسطة تحليل سوذرن , . Persons et al) .

أن التلاعب الجيني يكون أما in vitro أي خارج الجسم الحي واما in vivo داخل الجسم الحي ، وفي التطبيقات خارج الجسم الحي تزال الخلايا وتزرع قبل بدء التلاعب الجيني والاستبدال وهذه الوسيلة ممكنة للمعالجة المتضمنة زرع خلايا مثل الخلايا الدموية التي تكون سهلة النقل والزرع أما في داخل الجسم فأن عوامل التحوير تقدم مباشرة إلى المستقبل .

ومما يؤخذ على هذا النوع من العلاج كلفته العالية في التطوير والاستعمال وصعوبة ايجاد الهدف الصحيح ليكون التعبير بشكل واضح ومازالت الابحاث مستمرة ولكنها تبقى على مستوى البحث ولم تطبق بشكل علاج روتيني لحالات الثالاسيميا
(Hancock et al ., 1999 ;Helen , 2002) .

الفصل الثالث

تأثير عددمن المعايير في مرضى الثالاسيميا في النجف الأشرف

(٣-١) دراسة تأثير عدد من المعايير في الأصابة بالثالاسيميا – بيتا في مدينة النجف الأشرف :

لغرض التعرف على تأثير عدد من المعايير مثل جنس المريض, منطقة السكن ، و صنف الدم على الطراز المظهري للثالاسيميا وتوزيع المرضى حسب صنف الدم و الجنس و صلة القربى بين الوالدين.جمعت البيانات من ملفات المرضى في مركزأمراض الدم في مستشفى الزهراء للولادة والأطفال في محافظة النجف الأشرف، وشملت الدراسة 217 مريضًا ممن يراجعوا المركز بصورة دورية,وتم تحليل هذه البيانات إحصائيا,وإجراء عدد من العلاقات لبيان تأثيرهذه المعايير المدروسة وتوزيع المرضى باستعمال البرنامج الإحصائي SAS 2001 .

وشملت الدراسة العلاقات التالية :-

(٣-١-١) العلاقة بين جنس المريض والطراز المظهري للثالاسيميا- بيتا:

صنف المرض اعتمادا على الفحوصات السريرية والمختبرية للمرضى إلى كبرى و وسطى وصغرى بحسب تدرج شدة المرض.وتم إجراء العلاقة بين تلك الطرز و جنس المريض.وأظهرت نتائج الدراسة ان عدد الذكور هو127 (58.5 %) وعدد الأناث 90 (41.5 %) لجميع الطرز المظهرية. وفي الطراز المظهري (كبرى) كان عدد الذكور 78 (61%) وعدد الأناث 50 (55.5%) والتي كانت الأعلى من باقي الطرز المظهرية،ففي الطراز المظهري (وسطى) كان عدد الذكور47 (37%) والأناث 50 (43%) . امافي حالة الطراز المظهري (صغرى) فكان عدد الذكور 2 (2%) والأناث 1 (1.5%) . أما نسبة المرضى من كلا الجنسين للطرز المظهرية كبرى ، وسطى ، صغرى هي 59% ، 39.6 % ، 1.4% على التوالي. جدول رقم (٣-١). وبين التحليل الأحصائي عدم وجود فرق معنوي ($P \geq 0.05$) بين الأصابة بالثالاسيميا وجنس المريض لجميع الطرز المظهرية ووجود فرق معنوي ($P \leq 0.05$) بين الطرز المظهرية للثالاسيميا.وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Helen,2002;Eleftheriou,2003) في أن المرض غير مرتبط بالجنس.

جدول رقم (٣-١) العلاقة بين جنس المريض والطراز المظهري للثالاسيميا - بيتا

الجنس	الطراز المظهري للثالاسيميا- بيتا						المجموع	
	كبرى		وسطى		صغرى			
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
الذكور	78	61	47	37	2	2	127	A 58.5
الأناث	50	55.5	39	43	1	1.5	90	A 41.5
المجموع	128	A 59	86	B 39.6	3	C 1.4	217	100

*** القيم التي اعطيت حروف انكليزية مختلفة يوجد بينها فرق معنوي او عالي المعنوية.**

*** القيم التي اعطيت حروف انكليزية متشابهه لايوجد بينها فرق معنوي.**

(٣-١-٢) العلاقة بين مناطق السكن والطراز المظهري للثالاسيميا – بيتا:

قسم المرضى حسب مناطق سكنهم الى سكنة مركز و سكنة أقضية ونواحي وحسب الطرز المظهرية للمرض . وتبين ان عدد المرضى من جميع الطرز المظهرية من سكنة المركز 182 (83.9 %) في حين كان عدد سكنة الأقضية و النواحي 35 (16.1 %). وتبين ان عدد المرضى في المركز كان 102 (79.7 %) ، 78 (90.7 %) و 2 (66.7 %) للطرز المظهرية كبرى ، وسطى ، صغرى على التوالي . جدول رقم(٣-٢) وأظهر التحليل الأحصائي أن هناك فرقا عالي المعنوية (P≤ 0.01) بين مناطق السكن لجميع الطرز المظهرية ويعزى ذلك الى ان معظم الحالات هي من سكنة المركز حيث يراجع مرضى الأقضية و النواحي لمراكز خارج مركز المحافظة.

جدول رقم (٣-٢) يوضح العلاقة بين مناطق السكن للمرضى والطراز المظهري للثالاسيميا– بيتا.

مناطق السكن	الطراز المظهري للثالاسيميا-بيتا						المجموع	
	كبرى		وسطى		صغرى			
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
المركز	102	79.7	78	90.7	2	66.7	182	A 83.9
الأقضية والنواحي	26	20.3	8	9.3	1	33.3	35	B 16.1
المجموع	128		86		3		217	

*** القيم التي اعطيت حروف انكليزية مختلفة يوجد بينها فرق معنوي او عالي المعنوية.**

*** القيم التي اعطيت حروف انكليزية متشابهه لايوجد بينها فرق معنوي.**

(٣-١-٣) العلاقة بين الفئات العمرية للمرضى والجنس :

تم تقسيم المرضى الى خمسة فئات عمرية من كلا الجنسين . و تبين ان أعلى نسبة من الذكور و الأناث من الفئة العمرية الاولى 101 (46.5 %) و أدنى نسبة كانت من الفئة العمرية الخامسة 2 (0.9 %) . حيث تقل النسبة بازدياد الفئة العمرية . وتبين من النتائج ان أعلى نسبة للذكور المصابين كانت من الفئة العمرية الثانية 60 (70.5%) وأدنى نسبة هي من الفئة العمرية الخامسة 1 (50%) . في حين كانت أعلى نسبة للاناث المصابات من الفئة العمرية الاولى 52 (51.5%) و أدنى نسبة من الفئة العمرية الرابعة 2 (40%) . جدول(٣-٣).وأظهر التحليل الأحصائي وجود فرق عالي المعنوية (P≤ 0.01) بين الفئتين الأولى والثانية والفئات الأخرى . وهذا قد يعكس امكانية تشخيص المرض بعمر مبكر وقلة اعداد المرضى كلما تقدم العمر والذي قد يكون بسبب انتقال بعض المرضى الى محافظات اخرى او وفاة العديد منهم

بسبب المضاعفات المرافقة للمرض والتي قد تكون بسبب التهاون وعدم الالتزام بالبرامج العلاجية المقررة.

جدول رقم (٣-٣) يوضح توزيع المرضى حسب العمر و الجنس .

الفئة العمرية/سنة	الجنس				المجموع	
	عدد الذكور	%	عدد الأناث	%	العدد	%
10-2	49	48.5	52	51.5	101	A 46.5
20-11	60	70.5	25	29.5	85	A 39.2
30-21	14	58	10	42	24	C 11.1
40-31	3	60	2	40	5	B 2.3
50-41	1	50	1	50	2	C 0.9
المجموع	127		90		217	

*** القيم التي اعطيت حروف انكليزية مختلفة يوجد بينها فرق معنوي او عالي المعنوية.**

*** القيم التي اعطيت حروف انكليزية متشابهه لايوجد بينها فرق معنوي.**

(٣-١-٤) العلاقة بين صلة القرابة بين الوالدين والجنس :

تم تقسيم المرضى الذكور و الاناث من ناحية صلة القربى للوالدين (أقرباء،أباعد) وتبين ان أعلى نسبة لكلا الجنسين 178(82 %) للذين هم من آباء أقرباء في حين ان نسبة المرضى الذين هم من آباءأباعد كانت 39 (18%) . وكانت أعلى نسبة للذكور المصابين هي من الذين هم من آباء أقرباء 106 (83.5 %) في حين كانت النسبة للذين هم من آباء أباعد21 (16.5 %) . أما في الأناث فكانت أعلى نسبة للآتي هن من آباء أقرباء 72 (80 %) في حين كانت النسبة للآتي هن من آباء أباعد 18 (20 %) . و أظهر التحليل الأحصائي وجود فرق عالي المعنوية ($P \leq 0.01$) للمرضى بين صلتي القرابة للوالدين للذكور و الأناث على حد سواء . وتبين من التحليل الأحصائي عدم وجود فرق معنوي ($P \geq 0.05$) بين الذكور و الأناث من صلتي القرابة (أقرباء, أباعد) . وهذا يوضح تأثير صلة القرابة على زيادة نسبة حدوث المرض بغض النظر عن جنس المولود . (السيد و كوثراني ,٢٠٠٧) (جدول ٣-٤).

جدول رقم (٣-٤) يوضح توزيع المرضى حسب صلة القرابة بين الوالدين للمرضى والجنس

صلة القرابة	الجنس				المجموع	
	عـــــدد الذكور	%	عـــــدد الأناث	%	العدد	%
أقرباء	106	C 83.5	72	C 80	178	A 82
أباعد	21	16.5	18	20	39	B 18
المجموع	127		90		217	

*** القيم التي أعطيت حروف انكليزية مختلفة يوجد بينها فرق معنوي او عالي المعنوية.**

*** القيم التي أعطيت حروف انكليزية متشابهه لا يوجد بينها فرق معنوي.**

(٣-١-٥) العلاقة بين صنف الدم للمرضى والجنس :

تم توزيع المرضى حسب فصيلة الدم(OBA) والجنس وتبين ان أعلى نسبة من المرضى لكلا الجنسين كانوا من فصيلة (O 77(35.4 % و أدنى نسبة ممن هم من فصيلة (AB 21 9.7%). في الذكور كانت أعلى نسبة هي من فصيلة (A 43 (33.9% و أدنى نسبة هي من فصيلة (AB 14 (11.2 %أما الاناث فكانت أعلى نسبة من فصيلة (O 35(39.9% وادنى نسبة من الفصيلة (BA7 (7.8 %) . جدول(٣-٥) .وأظهر التحليل الأحصائي عدم وجود فرق معنوي (P≥ 0.05) بين مجاميع الدم لكلا الجنسين اضافة الى الذكور والأناث كل على حدة .وهذا يتفق مع ما بينه (AL-Assadi,2007) .

جدول رقم (٣-٥) يوضح توزيع المرضى حسب صنف الدم والجنس

فصيلة الدم	الجنس				المجموع	
	عـــــدد الذكور	%	عـــــدد الأناث	%	العدد	%
A	43	33.9	24	26.7	67	A 30.9
B	29	21.8	23	25.6	52	A 24
O	42	33.1	35	39.9	77	A 35.4
AB	14	11.2	7	7.8	21	A 9.7
المجموع	127		90		217	

*** القيم التي اعطيت حروف انكليزية مختلفة يوجد بينها فرق معنوي او عالي المعنوية.**

*** القيم التي اعطيت حروف انكليزية متشابهه لايوجد بينها فرق معنوي.**

(٣-١-٦) العلاقة بين صنف الدم للمرضى والطراز المظهري للثالاسيميا – بيتا:

تم تصنيف المرضى حسب فصيلة الدم و الطراز المظهري للثالاسيميا بيتا وتبين ان أعلى نسبة للمرضى من جميع الطرز الوراثية كانت من فصيلة (35.4%)77 O و أدنى نسبة من فصيلة (9.7%) 21 AB. أمافي حالة الطراز المظهري (كبرى) فكانت أعلى نسبة للمرضى من فصيلة (38.3%) 49 O وأدنى نسبة من فصيلة (7.8%) 10 AB . أما في الطراز المظهري (وسطى) فكانت أعلى نسبة من فصيلة (% 37.2) 32 A. و أدنى نسبة من فصيلة (12.8%)11 AB .جدول (٣-٦). أظهر التحليل الأحصائي عدم وجود فرق احصائي معنوي (P≥ 0.05) لفصائل الدم لكلا الطرازين (كبرى و وسطى)وهذا يعني عدم وجود ارتباط بين فصيلة الدم و الطرازين المظهريين (كبرى و وسطى) وهذا يتفق مع ماتوصل اليه (Al-Assadi,2007).

جدول رقم (٣-٦) يوضح توزيع المرضى حسب صنف الدم و الطراز المظهري للثالاسيميا – بيتا .

اصناف الدم	الطراز المظهري للثالاسيميا-بيتا						المجموع	
	كبرى		وسطى		صغرى			
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
A	35	A 27.3	32	A 37.2	-	-	67	30.9
B	34	A 26.6	18	A 20.9	-	-	52	24
O	49	A 38.3	25	A 29	3	100	77	35.4
AB	10	A 7.8	11	A 12.8	-	-	21	9.7
المجموع	128		86		3		217	

*** القيم التي اعطيت حروف انكليزية مختلفة يوجد بينها فرق معنوي او عالي المعنوية.**

*** القيم التي اعطيت حروف انكليزية متشابهه لايوجد بينها فرق معنوي.**

الفصل الرابع

الاستنتاجات والتوصيات

الأستنتاجات

أوضحت هذه الدراسة أن:-

١- الفحوصات الدموية والفحوصات الجزيئية أحدهما مكملة للأخرى في تشخيص المرض.

٢- مرض الثالاسيميا هو من الأمراض غير المرتبطة بالجنس أي يصيب الذكور والأناث على حد سواء ،وان اختلفت فصائل دمهم .

٣- المرضى بالثالاسيميا يقل عددهم كلما تقدم بهم العمر.

٤- المرض متوارث وتزداد نسبة حدوثه كلما إزدادت درجة القرابة بين الوالدين أي أن التناسب طردي بين نسبة حدوث المرض ودرجة القرابة.

التـوصيــات

١ .*اجراء الفحص الوراثي الطبي لتشخيص مرض الثالاسيميا قبل الزواج للتأكد من خلو الطرفين من حمل صفة المرض وذلك في مراكز فحص* الراغبين في الزواج وتعتمد التقنيات الحيوية الجزيئية للتشخيص المبكر للمرض او خلال فترة الحمل.

٢ .تكثيف الحملات الدعائية والأعلامية عن المرض من خلال نشر برامج التوعية حول مخاطر المرض وحث المجتمع على الحد من زواج الأقارب كونه أحدالعوامل المهمة في شيوع المرض وأزدياد أحتمالية حدوثه كلما زادت درجة القرابة.

٣ .المساعده النفسيه لحاملين المرض حتى ينظروا لأنفسهم كأشخاص أصحاء وليس كمرضى وتشجيعهم على أن يكونوا أعضاء نافعين في المجتمع وتعويدهم على الصبر وألأحتمال ليستطيعوا التغلب على تحديات الحياة عن طريق المراكز المتخصصه التي تكون مؤهلة من الناحية الطبية وألأنسانية.

٤ .الأهتمام بالبرامج العلاجية كنقل الدم والعلاجات الساندة مثل الديسفيرال والفوليك أسيد،والأهتمام بالتغذية عن طريق تفادي بعض الأكلات التي تؤدي الى زيادة نسبة الحديد في الجسم كاللحوم الحمراء والكبد، ومن المهم شرب الشاي للمريض بعد الأكل لمنع أمتصاص الحديد في الجسم وأجراء ألمعالجة الجراحية التي تتضمن أستئصال الطحال وزراعة نخاع العظم وأجراء دراسات مستقبلية متطورة في مجال التعديل ألجيني.

٥- من المهم توفير التقنيات الحديثة لتشخيص المرض بدقة وعلاجه بنجاح.

المصـــــــادر العربيــة

1- بازرباشي ، محمد بديع .(1990م). الوجيز في أمراض الدم . ص : 83 , 88- 93 جامعة العرب الطبية في بنغازي / ليبيا .

2- السيد و كوثراني ، علي وسماح . (2007 م).الأمراض الوراثية والإعاقة العقلية والتشوهات العيوب الخلقية عند الأطفال وكيف نعالجها . الطبعة (1) ص:91-99. بيروت – لبنان .

3- شكارة ، مكرم ضياء . (2002 م).علم الوراثة . الطبعة الثانية . ص : 80 ، 263 .

4- صاحب ، سمير عباس . (2005م) . تقنية اختبار الأجنة وراثياً تحول دون أمراض الأنيميا المنجلية والثلاسيميا مجلة اليوم الإلكتروني العدد (11607) الصفحة الطبية .

5- المظفر ، سامي . (2000 م) . كيمياء البروتينات الطبعة (1) ص :72, 136. كلية العلوم / جامعة بغداد .

مصـــادر الانترنيت

1- Net .1 http :// www . Thalassemia . org 2009.
2- Net .2 http:// www . alnoor . se / article. asp

مقال للكاتبة إبتهال بليبل 2009 .

References

- Adekile, A.D.& Haider, M.Z. (1996). Genetic epidemiology of sickle cell anemia and alfa/beta Thalassemia in Kuwait. J Kw med Asso;28:104-110.

- Afifi ,A.M.(1985). National plan for the management of thalassemia major hypertransfusion intensive desferroxia mine therapy in Egypt. In: Ed by M Akosy. GFB Bridwood. Hypertransfusion and Iron chelation in thalassemia. Berni Hans Huber Publication : 19 – 29 .

- AL-Akawi, MD. PhD, Zeyad J.; Hala, S. Al-Remawi, MD, MRCP; Khadijeh J.Al-Namarneh, MSc.(2009). The relationship between the type of mutation in the globin gene and the type and severity of sickle /beta-thalassemia disease in Jordanian patients. Saudi Med J ; 30 (7): 967-968.

- AL-Assadi, Zuhair Mohammed Ali. Dr.(2007).Molecular Detection of some Mutations Associated with Beta-Thalassemia in Iraq. Univ. of Baghdad - Iraq.

- AL-Awamy, B.H. (2000). Thalassemia syndromes in Saudi Arabia , Saudi medical Journal ;10: 8-10.

- AL-Awqati, N. Angstiniotis M. (1998). International News, Help needed in Iraq. TIF News ;23: 15.

- AL-Hashimy, J.Q. (2002). Motality of homozygous beta-Thalassemia. The first scientific conference on Thalassemia and Haemoglobinopathies in Iraq : 48.

- Atweh, G.f.& forget,B.G. (1987). Clinical and molecular correlations in the sickle/beta-Thalassemia syndrome. AMJ Hemato ;24:31-36.

- Awad, M.H. (1999).Homozygous Beta-Thalassemia in Mosul .PhD Thesis Univ. of Mosul. Iraq.

- Aydinok, y.; Nisli, G.; Kavakik; Coker C.; Kantarm,Cetingul, N.(1999). sequential use of defeiprone and desferrioxamine in primary school Children with Thalassemia major in Turkey . Acta-Haemotol ;102(1): 17-21.

- Bartfay, W.J. (2000).Iron-overlaod cardiomyopathy: evidence for a free radical-medal . Bio Res Nurs.,2(1) :49-59.

- Barth, E.; Malorgio, C.& Tamarop. (2000). Allogenic bone marrow transplantation in hematologic disorders of childhood: New tends and controversies. Haematologica ;85(11): 2-8.

- Bhardwaj , U . ; Zhang , Y .H .& MacCabe , E . R . (2003).Neonatal hemoglobinopathy screening : Molecular genetic technologies . Mol Gent metab.;80:129-137.

- Busch, M.p. ; KLeinman , S.H. & Nemo, G.J. (2003). Current and emerging in factious risks of blood transfusions . JAMA ; 289: 959-962.

- Campbell, M.; Henthorn, J.S.& Davies, S.C. (1999). Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemaglobinopathy screening. Clin chem.;45:969-975.

- Cao, A.M; Gossene, S. & Mpirast, u. (1989) . Beta Thalassemia mutations in Mediterranean population. British Journal of hematology.;71 :312.

- Cappellini, N.; Cohen, A.; Eleftherio, A.; Piga, A.; and Porter, J.(2003).Guidelines for the clinical management of Thalassemia, Cyprus, TIF April.

- Cario, H.; Stahnke, k .& Kohne, E .(1999). Beta-Thalassemia in Germany. Klin pediatr ; 211(6): 7- 431.

- Carey, B.W.; et al ,(2008). Ips cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. Stem cell. In press.

- Chan, L .L .& Lin, H .P.(1999). Cure of Beta-Thalassemia major by umbilical cord blood transplantation. A case report of Malaysias first cord blood transplantation J. Trop. Pediat.;45(4):5 - 243.

- Cheng Po-Jen, MD.; Da-Chang Chu, PhD; Chien-Hong Lee, MS; Ho-Yen Chiueh, MD; Yu-Ting lin, RN & Yung-Kweisoong, MD.(2003). Prenatal Diagnosis of Alfa-Thalassemia of Southeast Asian Deletion with Non-Radioactive Southern Hybridization-Chang Gung Med J ; 26: 5 - 20.

- Chong, S.S; Boehm, C.D.& Higgs Dr., Cutting, G.R.(2000). Single tube Multiplex-PCR Screen for common deletional of alfa-thalassemia. Blood ;95:2 - 360.

- Connell, Jee. (2002). RT-PCR Protocols. Cork, Irland.

- Cotton, F. ;Lin, C.; Fontaine. B.; Gulbis, B.; Janssens, J.& Vertongen, F. (1999).Evalution of capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobins A_2 and F. Clin chem ; 45;237-243.

- Cowan, K.H.; Moscow, J.A.& Hung, H.; et al. (1999). Paclitaxel chemotherapy after autologous stem-cell transplantation and engraflement of hematopoietic cells transduced with a retrovirus containing the multidrug resistance complemantary DNA (MDR1) in metasttic breast cancer patients. Clin Cancer Res.; 5: 1619-1628.

- Craing, J.E.; Barnetson, R.A.; Prior, J.; Raven, J.L.& Thein, S.L.(1994). Rapid detection of deletion causing delta beta Thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. Blood; 83:82 - 1673.

- Crocker, John & Paul, G. Murray. (2003). Molecular Biology in cellular pathology. Birmingham, UK.

- Davies, SC. ; Cronin, E.; Gill ,M.; Greengross, P.; Hicman , M. &normand , C. (2000). Screening for 1 sickle 1 cell disease and thalasaemia: asystematic review with supplementary research. Health Technol Assesstls-Source1; 4: 1-99.

- Dod, C.; Krisnamoorthy, R.; lamb, J.& Rochette, J. (1992). Rapid analysis of – alfa 3.7 thalassemia and alfa-alfa-alfaanti3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. BrJ Haematol ; 82:11-105.

- Eastman, J.W.; Wong, R.; Liao, C.& Morales, D. (1996). Automated HPLC Screening of new borns for sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. Clin chem. ; 42:704-710.

- Eleftheriou, A.(2003). About thalassemia. TIF publications, Nicosia, Cyprus.

- EL-Hazmi, M.A. (1992). haemoglobinopathies , Thalassemia and enzymopathies in Saudi Arabia. Saudi medical J.; 13(6): 99-488.

- EL-Hazmi, M.A.; Warsy, A.S.; AL-Swailem, A.R.; AL-Faleh, F.Z.& AL-Jabbar, F.A. (1994). Genetic compounds. Hbs. Thalassemia and enzympoathies : spectrum of interaction. J Trop pediatr ; 40: 149-156.

- Ellis, J. P.; Pasceri, Kctan – Un.; Xwu, A.; Harper, P.; Fraser, F.& Grosveld. (1997). Evaluation of beta-globin gene therapy constructs in single copy transgenic mice. Nucleic Acid Research. ; 25 : 1296-1302. by oxford university press.

- Faa, V.; Rosatelli, M.C.; Sardu, R. ; Melini ,A.; Toffo C.& Cao, A. (1992). A simple electrophoretic procedure for fetal diagnosis of beta-thalassemia due to short deletions. Prenat Diagn ; 12:8-903.

- Fakher, Rahimi; Kaeikhaei, Bijan; Akbari & Mohammad Taghi.(2007). Application of diagnostic methods and molecular diagnosis of hemoglobin disorders in Khuzestan province of Iron. Indian Journal of human genetics; (13)1:5-15.

- Fattoum, S.F. ; Guemira & Conar; et al. (1991). Beta-thalassemia Hbs-beta-thalassemia and sickle cell anemia among Tunisian. Hemoglobin ; 15:11-21.

- Fernandez; Eric; Thierry Bienvenu; Fraricos Desclaux & et al. (1993). Use of chemical clamps in denaturing Gradient Gel electrophoresis: Application in the detection of the most frequent Mediterranean beta-thalassemia mutation.; 3:122-124. by cold spring harbor laboratory.

- Fisher, SI.; Haga, J.A.; Castleberry S.M.; Hall, R.B.& Thompson, W.C. (1997). Validation of an automated HPLC method for quantification of Hbs. Clin chem.; 43:1667-1668.

- Frank, E.& Berkowitz FE. (2007). Pediatric infectious disease – case.; 60:172-173. Emory university school of medicine.

- Fucharoen, S.; Winicha goon, P.; wised panichkiy R,Sae-Ngow, B.; Sriphanich, R.; oncoung, W.; etal. (1998). Prenatal and post natal diagnosis of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. Clin chem.; 44:740-748.

- Genetics committec of the society of obstetricians and gynaecologists of Canada (SOGC) (2008).Carrier screening for thalassemia and hemoglobinopathies in Canada. ;218:950-959.

- Gardinia, P.& Hilgartner, M. (1992). update on thalassemia. Pediatr Rev; 13:55-62.

- Guidelines for the investigation of the alfa and beta thalassemia traits. (1994). The thalassemia working party of the BCSH general hematology task force. J clin pathol ; 47:95-289.

- Hahalis, G.; Manolis, A.S.; Gerasimiddou, I.& et al.(2001)Right ventricular diastolic function in beta-thalassemia major : enchocardio- graphic and clinical correlates. Am. Heart L; 141(3):34- 428.

- Hall, R.B. ; Haga, J.A.; Guerra, C.G.; Castleberry, S.M.& Hickman, J.R. (1995).optimizing the detection of hemoglobin H disease. Lab med; 26:736-741.

- Hancock, J.T. & et al (1999) molecular genetics. Biomedical sciences explained.

- Hartle, P.T.; Osborne, & L. Mason. (1989). Prenatal diagnosis of hemoglobinothies by using polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes. Clinical chemistry ; 35,(9).

- Hartl, Daniel, J.& Jones, Elizabeth W. (1998) . Genetics Principles and Analysis. Forth edition. London. UK.

- Haslett, C.H.; Clilvers, E.R.; Hunter, J.A.& Boon, N.A. (1999). davidson's principles and practice of medicine 18th ed U.S.A : Churchill living stone : 68-799.

- Hedlund, B. hemoglobins of human embryos, fetuses, and neonates. (1980). In: Fairbanks VF, ed. Hemoglobinopathies and thalassemia. New York : Brianc. Decker, 1980: 7-14.

- Helen, M. (2002). ABC of clinical genetics. Third edition. Manchester, UK.
- Hempe, J.M.& Graver, R.D. (1994). quantification of hemoglobin variants by capillary isoelectric focusing. Clin chen ; 40:2288-2295.
- Hoffbrand, A.V.; Lewis, S.M. & Tuddehans, E.G. (1999). Postgraduate haematology. 4th ed. Oxford : Butter worth and heine man ; 14-91.
- Hoppe, Carolyn C. (2009). newborn screening for non-sickling hemoglobinopathies hematology . American society of hematology education program book.
- Imren, S. Payen, E.; Westerman, K.A& et al. (2002). Permanent and panerythroid correction of murin beta thalassemia by multiple lentiviral integration inhematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci U.S.A ; 99:14380-14385.
- Ingram, V.M & stretton, A.O.(1959).Genetic basis of the thalassemia disease nature ; 184:9-1903.
- Jassim, A.L. (1989).Epidemiological study of thalassemia and its complication in Ibn- Al-Balady hospital. M. Sc. Thesis, Univer. Of Baghdad. Iraq .
- Jenkins, M.A; Hendy, J& Smith, I.I. (1997). Evaluation of hemoglobin A2 quantition assay and hemoglobin variant screening by capillary electrophoresis J. capillary Electrophor; 4:137-143.

- Jorde; Carey; Bamshad.(2000).Medical genetics. Second edition; Chapter (3): 33-35.
- Joseph, Henry. (1997). biotechnology Un zipped promises and realities. Washington, D.c.
- Karimi, M.; yarmohammadi, H.; Farjadian, S. & et al. (2002). Beta-thalassemia intermedia from Southern Iron: IVSII-I (G:A) is the prevalent thalassemia intermedia allel. Hemoglobin ; 26:54-147.
- Karnon, J.; Zeuner, D.; Brown, J.; Ades, A.f.; wonke, B.& model, B.(1999). lifetime treatment costs of beta-thalassemia major. Clinlab hematol ; 21(6):85-377.
- Kayisli, O. G.; Keser,I.; Canatan, D.; sanlioglu, A.; Ozes, O. N.; & Luleci, G. (2005).Identification of a novel framshift mutation [codon3 (+T)] in Turkish patient with beta thalassemia intermedia. Turk. J. med. Sci; 35:175-177.
- Keser, Ibrahim Keser; Esra man GUOGLU; Ozlem GUZELOGLU KAYISLI; fatma KURT & et al. (2005). Prenatal diagnosis of beta thalassemia in Antalya province. Turk J med Sci.; 35 : 251-253.
- Kham, S.K.; Quah, T.C.; Loong, A.M.& et al. (2004). A molecular epidemiologic study of thalassemia using new born's cord blood in a multiracial Asian population screening program. J Pediatr hematol oncol; 26:817-819.
- KHAN, Shaheen, N. (2000). Molecular characterization of beta-thalassemia in Pakistan. University if the Punjab.

- Khider, H.H.(1990). Iron status in beta-thalassemia major in mosul. Ann coll med mosul ; 16:5-12.
- Kiss, T.L.; ALI, M.A.; Levine, M.; & Lafferty, J.D.(2000). Analgorithm to aid in investigation of thalassemia trait in multicultural populations. Archives of pathology and laboratory medicine.
- Klug ,William S.& Cummings, Michael R. (2002). Essentials of Genetics .Fifth Edition .USA.
- Lafferty, J.D.; Crowther, M.A. & Ali MA-Levine, M.L. (1996). the evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassemia and non-thalassemia microcytosis. AmJ Clin pathol ; 106:201-205.
- Ledingham, J.G.; Warre1, D.A. & weatherall, D.J. (2000). Concise oxford text book of medicine 1st ed. New York : oxford university press , Inc:45- 234.
- Levison, David, A.; Robin, Reid; Alasttair, D. Burt, David, J.Harrison, & Stewort flleming. (2008). Muir's text book of pathology. Fourteenth edition: 212.
- Liu, X.T.; Old J.M. Milek, Fisher, C.A.; weatherall, D.J. & Clegg, J.D.(2000). Rapid detection of alfa-thalassemia deletion and alfa-globin triplication by multiplex polymerase chain reaction. BrJ haematol ; 108:9-295.
- Liu, Z.E.& Jun, HAI- hong JIANG.(2001). The Effect of different membrane buffers on hemoglobin Electrophoresis. Laboratory hematology ;7:101-102.

- Lin,C.; Cotton,E.; Fontaine, B. ;Gulbis, B. & Jand Vertongen, F. (1999). Capillary zone electrophoresis an additional technique for the identification of haemoglobin variants. Hemoglobin ; 23: 97-109.

- Lorey, L.(2000). Asian immigration and public health in California : thalassemia in newborns in California . J. pediat hematol oncol ; 22(6): 6-564.

- Maeder, V.J.& Conley, C.L. (1959). electrophoresis of hemoglobin's on ager gel. Frequency of hemoglobin Dina Negro population. Bull John hop hos; 195:77.

- Majhi , Shankhar ; Ameet Aishra ; Kishun Deomeht ; Nirmal Baralond & pramod shrestha.(2007). Detection of beta thalassemia (homozygous) by hemoglobin electrophoresis on agar gel and citrate agar medium : a case report. Nepal medical college Journal ; 9(1).

- Malik, punam & paritha, I. Arumugam .(2005). gene therapy for beta thalassemia. Hematology the American society of hematology. Children hospital Los Angeles.

- Mario, N.; Baudin, B.; Aussel, C.; Giboudeau, J.(1997). Capillary isoelectric focusing and high performance cation – exchange chromatography compared for the qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants clin chen ; 43:2137-2142.

- Marouf, R.,TM.; Dsouza, & AD. Adekile. (2002). Hemoglobin electrophoresis and hemoglobinopathies in Kuwait. Med principles pract ; 11:38-41.

- Melo, L.M. ;Stori, P.H.; Mangonaro, C.R. ;valencio, C.;Traina Jraina Junior & C.R.B Demingos. (2009). Three-dimensional visualization of human hemoglobin phenotypes with HPLC. Genetics and molecular research ; 8(1): 354-363 . Brasil.

- Mentzer, W.C.& Kan, Y.W. (2001). Prospects for research in hematologic disorders : sickle cell disease and thalassemia . JAMA ; 38:108-112.

- Migliaccio Anna Rita; Dant Rotili; Angela Nebbioso; George Atweh & Antonello mai. (2008). Histone deacetylase inhibitors and hemoglobin F induction in beta thalassemia.

- Mohan, Harsh.(2000).Pathology practical book. Second edition. PVT.LTP:210.

- Nahla, W.H. (2001). Growth assessment in thalassemic patients in Mousl. Diploma, thesis. University of Mousl. Iraq.

- Najmabadi, H.; Karimi- Nejad, R.; Sahebjam, S. & et al.(2001) The beta-thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. Hemoglobin ; 25:96-285.

- Ngo, K . Y. & Lee, J. (1994). Utilization of denaturing gradient gel electrophoresis for diagnosis of beta thalassemia and ascertainment of new mutations. American journal of human genetics; 55:44.

- Newton, C.R.; Graham, A.; Heptinstall,L.E.; Powell, S.J.; Summers, C.; Kalsheker, N.& et al. (1989). Analysis of any point

mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMAS). Nucleic Acidsres ; 17:16-2503

- Old, J.M.; Verawalla, N.J.& westherall, D.J. (1990). Rapid detection and prenatal diagnosis of beta-thalassemia studies in Indian and Cypriot population in the UK. Lancet ; 7-336:834.
- Old, J.M. (2003). Screening and genetic diagnosis of hemoglobin disorders. Blood Rev; 17:43-53.
- Olivieri,N.F. (1999). The beta-thalassemia. N England ; 341:99-109.
- Oucn & Rognerud, C.l. (1993). Rapid analysis of hemoglobin variants by cation- exchange HPLC. Clin chem.; 39:820-824.
- Oucn & Rognerud C.L. (2001). Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs HPLC. Clin. Chem. Acta ;313:187-194.
- Papadea & Cate, J.C. (1996). Identification and quantification of hemoglobins A,F,S, and C by automated chromatography. Clin Chem ; 42:57-63.
- Park, I.H.& et al. (2008). Induction pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. Science; 321:1218-1221.
- Patrinos, G. P.; Giardine, B.; riemer, C.; Miller W.; Chui, D. H.; Anagnou, N. P.; Wajcman, H.; and Hardison , R.C.(2004) Improvements in the Hb var database of human hemoglobin

variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. Nucleic Acids Research ; 32:537-541.

- Pearson, H.A.; Cohen, A.R,; Giardian, P.V.; and Kazazian, H.H. (1996). The changing profile of homozygous beta-thalassemia : Demography, ethnicity, and age distribution of current north American patients and changes in twodecades. J. pediatr.,; 136: 540-545.

- Perrotta, S.; Cappellini ,M.D.;Bertold, O.F.; Iolascon, G.D.; Agruma, L.; Gasparini, P.; Sicilian, M.C.; and Iolascan, A. (2000).Osteoporosis in beta-thalassemia major patients . Br. J. haematol1.; 111:461-466.

- Persons ; Derek, A.& Esther, R. Allay. Nobukuni sawai, philipw. Hargrove, Thomas P. Brent, Hideki Hanawa, Arthurw. Nienhuis and Brain P. Sorrentino. (2003). Successful treatment of murine beta-thalassemia using in vivo selection of genetically modified , drug-resistance hematopoietic stem cells blood; 102, (2): 506-513.

- Persons, D.A.; Allay, E.R.; Sabatino, D.E.; Kelly, P.; Bodine, D.M. & nienhuis, A.W. (2001).Functional requirements for phenotypic correction of murine beta-thalassemia : implications for human gene therapy . blood ;97:3275-3282.

- Pinna, A.D.; Argiolu, F.; Moroniu, L.& Finna, D.C. (1988). Indication and results for splenectomy for Beta-Thalassemia in two hundred and twenty one pediatric patients Surg-Gynecol obstet ;167:109-114.

- Piomelli, S.& Loew, T. (1991). Management of Thalassemia major. (Cooley's anemia)Hcmatol oncol clin North Am ;5:69-557.
- Rahimi, Z. A.; Vaisi Raygani, A.; Merat, M.; Haghshenass, N.; Gerard, R. L.; Nagel, R.& Kerishnauoorthy.(2006). Thalassemic Mutations in Southern Trans. IJMS Iran J Med Sci. June; (31) 2:70-73.
- Reed, W.; Walters, M.& Lubin, B,H. (2000). Collection of sibling donor cord blood for children with thalassemia. J. Pediat. Hemotol Oncol ; 22(6): 4-602.
- Rioux, J.; Godart, C.; Hurtel, D.; Mathis, M.; Bimet, C.; Bardakdjian, J.& et al. (1999). Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. Clin Chen ;43:34-39.
- Robinson, richard (2003). Genetics. Vol. (2) USA.
- Rubin, Emanuel.& Howard, M., Reisner. (2009). Essentials of Rubin's pathology. 5th , chapter (20): 437-438.
- Rund, D.& Rachmilewitz, E. (1995). Thlassemia major 1995. Older patients, new therapies Blood Rev ;9:25-32.
- Sabatino, D.E,; Cline, A.P.; Gallagher, P.G.& et al.(1998). Substitution of the human beta- spectrin promoter for the human agamma-globin promoter prevents silencing of a linked human beta-globin gene in transgenic mice. Mol Cell Biol;18: 6634-6640.
- Samperi , P.; Mancuso, G.R.; Dibenedetto, S.p.; DiCataldo, A.; Ragusar, R. & Schiliro, G. (1990). High performance liqid

chromotography (HPLC): a simple method to quantify Hbc, O-Arab Agenogi and F. Clin Lab Hematol. , 13: 75-169.

- Sarya, A.K.; Kumar, R.; Kailash, S.& Sehal, A.K. (1984). Vit. B12 and folic acid deficiency in Beta-hetrozygous Thalassemia. Indian J Mid Res. ;79:88-783.
- Schmidt, R. M.& et al. (1974). The Detection of Hemoglobinopathies, CRC Press, Cleveland.
- Schneider, R.G.(1978). Methods for Detection of hemoglobin variants and hemoglobinpathes in The Rotin Clinical Laboratory, CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences,.
- Simone, M.; Verotti, A.; Iughettil , L.& et al. (2001).Final height of thalassemic patients who underwent bone marrow transplantation-during childhood Bone-Marro. Transplat; 28 (2): 5-201.
- Sirichotiyakul Supatra ; Rattika Seatung and Torpong Sanguanetmsri. (2009). Prenatal Diagnosis of Beta-Thalassemia/ Hbe by Hemoglobin Typing Compared to DNA Analysis. Hemoglobin.; 33: 17-23 Chiangmai, Thailand.
- Skogerboe, K.J.; West, S.F.; Smith, C.; Terashita, S.T.; Le Crone, C.N.; Detter, J.C.& et al. (1992). Screening for alfa-Thalassemia. Correlation of hemoglobin H inclusion bodies with DNA determined genotype. Arch Pathol Lab Med , 116:8-1012.

- Stadtfeld, M.; Nagayam, Utikal J., Weir, G.& Hochedlingerk. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science.; 322:945-949.

- Suh, D.D.; Kruss, J.S.& Bures, K. (1996). Influence of hemoglobin S adducts on hemoglobin A_2 quantification by HPLC. Clin Chem ; 42:113-114.

- Takahoshik& et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell ; 131:861-872.

- Tan, K.L.; Tan, J.A.; Wong, Y.C.; Wee, Y.C.; Thong, M.K.& Yap, S.F.(2001). A rapid and cost-effective protocol for molecular characterization of Beta-thalassemia in Malaysia. Genet-Test ; 5(1):17-22.

- Tan, J.A., Tay, J.S.; Lin, L.I.; Kham, S.K.; Chin, T.M.& et al. (1994). The amplification refractory mutation system (ARMS): A rapid and direct prenatal diagnostic technique for beta-Thalassemia in Singapore. Prenat diagn ;14:82-1077

- Tan, G.B.; Tc A.w.; RA Dunstan & Sh Lee. (1993). Evaluation of high performance liqid chromatography for routin estimation of haemoglobins A_2 and F. J Clin Pathol ; 46:852-856.

- Tsuchihashi, z.; Dracopoli, N.C. (2002). Progress in high throughput SNP genotyping Methods. Pharmacogenomics. J. ; 2:103-110.

- Turpeinen, U.; Siplia, I.; Antila, P.; kayalainen, U.; Kuronen, B.; Kaltekinen, N.& et al. (1995). Two chain variants, Hb Brousscis and

Hb cemenelum characterized by cation-exchange HPLC, iso-electric focusing and peptide sequencing. Clin Chem ; 41:532-536.

- Tyagi, Seema; M. Kabra, N. ; Tandon, R.; Saxena, H.P.; Pati & V.P. Choudhry. (2003). Clinico-Haematological Profile of thalassemia Intermedia Patients. Int J Hum Genet,; 3(4):251-158 .
- Vullo, R.; Modell, B.& Georranganda, E.(1995). What is Thalassemia. 2nd ed. Thalassemia International Federation TIF. Cyprus .
- Wasi, P. (1983). Population Screening In: Weatherall DJ, ed. The Thalassemias. Edinburgh: Churchill Livingson, : 44-134.
- Waye, J.S.; Chui, D.H.; Eng, B.; Cai, S.P.; Coleman, M.B.; Adams, J.G. 3rd & et al. (1991). HbS/ beta zero-Thalassemia due to the approximately 1,4-kb deletion is associated with a relatively mild phenotype, Am J Hematol ; 38:108-112.
- Weatheral, D.J.& Clegg, J.B.(1972).The Thalassemia Syndromes, 2nd ed oxford: Black Well Scientific;1-5.
- Weatherall , D.J.(1997). The Thalassemias. BMJ ; 314:8- 1675.
- Weatherall, D.J. Clegg JB. (2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bulletin of the World Health Organization ; 79:11-704.
- Weatherall, D.J. Ledingham JG, Warrel DA. (1996). Oxford Test Book of Medicine. Vol.II. 3rd ed. New York: Oxford University Press Inc., ; 3500-3520.

- Weatherall Djand Clegg J.B. (2001). The Thalassemia Syndromes. 4th ed. Blachwell Scientific.

- White, J.M.; Christie, B.S.; Nam, D.; Daar, S.; & Higgs DR. (1993). Frequency and clinical significance of erythrocyte genetic abnormalities in Omanis. J Med Genet ; 30:396-400.

- Wolf, J.A.& Ingator, V.G.(1963).Heterogenety of thalassemia major, Am J Dis Child ; 105:234.

- Wut, Kim, H.J.; Sellers, S.E.& et al. (2000). Prolonged high-level detection of retrovirally marked hematopoietic cells in non human primates after transduction of CD 34 progenitors using clinically feasible methods. Mol Ther ; 1: 285-293.

- Yan, H. K.; W. Kinzler & B. Vogelstein (2000). Genetic testing present and future . Science 289: 1890-1892.

- Ye, S.; Dhillon, S.; Ke, X. Collins, A.R. Day I.N. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphism. Nucleic Acids Res ; 29: 8-88.

- Ying Li, PhD; Edourdo Di Naro, MD.; Angeloantonio Vitucci, MD.; Bernhard Zimmermann, Phd; Wolfgang Holzgreve, MD& Sinuhe Hahn, Phd. (2005). Detection of paternally inherited fetal point mutation for thalassemia using size-fractionated cell free DNA in maternal plasma. J Ama ; 293: 843-849.

Summary

Thalassemia is an important genetic disease which has a worldwide distribution with a particular high occurrence in Arab world including Iraq. The present study involves some methods of biotechnology which are used in diagnosis and treatment of thalassemia. This study includes three chapters as indicated below:

1. General introduction to thalassemia and the aim of the study.
2. Literature review of research concern information about the disease such as disease history; geographic distribution; the normal structure of hemoglobin; genetic causes; various hemoglobin abnormalities; different types of thalassemia; symptoms of the disease; ways of protection; diagnosis based on blood test; hemoglobin electrophoresis; high performance liquid chromatography; molecular genetic tests which are either conducted by the use of PCR technology including different molecular techniques enable to diagnose the syndromes of thalassemia or non PCR techniques which are commonly applied in this field. Literatures concern treatment were also included in this chapter such as the biological methods of treatment including blood transfusion; common treatment; surgical intervening; bone morrow transplantation; hemoglobin stimulation; and gene therapy.
3. Statistical survey of the disease in Al-Najaf province depending on the records available at the center of blood diseases/ Al- Zahra'a hospital. These records were used to investigate the relationships between thalassemia and some factors to determine the actual importance of the disease in the population of Al-Najaf province. The relationships are represented as the number of patients in each category of specified factor. These include gender of patient and β- thalassemia phenotype; gender of patient within different groups of age; gender of patient within different ABO blood groups; geographic distribution with β- thalassemia phenotype; gender of patient born of either related or unrelated parents; and ABO blood groups and β- thalassemia phenotype.

Ministry of
Higher Education and
Scientific Research
University of Karbalaa
College of Science
Biology

A study of Some applied Techniques in Diagnosis and Treatment of Thalassemia and Factors Effecting Beta-Thalassemic Patients in Al-Najaf Al-Ashraf

A study
Submitted to college of science
University of Karbalaa In partial fulfillment of the
Requirements for the Degree
Of Higher Diploma
In
Biotechnology

Nawras Alwan Hussein Al-Barqaawi

Supervised By

Dr.Zuhair Mohammed Ali Al-Assadi

1431 A.H 2010 A.D