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

دراسة وراثية لمرضى نزف الدم الوراثي نوع A

رسالة مقدمة الى

مجلس عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

علم الحيوان

من قبل

هند طاهر قادر النجار

الحاصلة على شهادة البكالوريوس سنة ٢٠٠٣

بإشراف

أ.م.د. حميد محمود مجيد م.د. مثنى عبد القادر المهداوي

ذو القعدة ١٤٣٤هـ أيلول /٢٠١٣ م

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ
أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ ﴾

صدق الله العظيم

الآية (٣٢) من سورة البقرة

الإهداء

إلى مَن زرعت في حياتي أجملَ الاشجار, وسقتها بأعذب الامطار وعندما أثمرت رحلت, وقالت : أبقيت لكِ كل الثمار ولكن أخذتها مني يد الاقدار الى الواحد القهار

أمي الحبيبة الذي آلمني فراقها كما أفرحني وجودها

الى من أحمل اِسمه بكل افتخار.. والدي الذي رحل

الى من برّد ايامي الحارة بأمطار الفرح .. زوجي الغالي

الى من علّمني بأن الحياة بلا أخوة ضعف لا قوة.. أخي الحبيب

الى من كانت لي ومازالت قارب حنان.. خالتي الغالية

الى المنهل العذب الذي كان لي أحلى ما يجب ..عمتي الغالية

الى الانسان الحنون الذي مدَّ لي يدَ العون .. أخ زوجي المحترم

لكل العيون أهدي هذا البحث..

البـــاحثـــة

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين الذي يسّر لي أمري, والذي أنار لي عقلي ودربي أحمده حمداً كثيراً بسعة عرشه وعدد خلقه، والصلاة والسلام على سيد الخلق أجمعين محمد الأمين وعلى آله وصحبه أجمعين.

أتقدم بالشكر والتقدير الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة , ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي ,كما وأتقدم بالشكر الى كل من الأساتذة ومنتسبي قسم الدراسات العليا في كلية التربية للعلوم الصرفة لما أبدوه من مساعدة وتوجيهات سديدة فضلاً عن تقديمهم للمساعدة العلمية الغنية , كما وأخص بالشكر الجزيل للمشرفين اللّذين مهدا لي طريق العلم والمعرفة , و حملا أقدس رسالة في الحياة المشرف الاستاذ المساعد الدكتور حميد محمود مجيد , والمشرف الدكتور المدرس مثنى عبد القادر المهداوي وكان مرجعي الأول والأخير طيلة مدة الدراسة .

وأخص بالشكر الدكتور الفاضل فياض محمد شريف على مده يد العون لي .

ويسعدني أن أشكر كل منتسبي مستشفى البتول التعليمي في بعقوبة ومستشفى حماية الطفل بمدينة الطب في بغداد قسم الامراض النزفيةالوراثية على المساعدة في جمع النماذج والعينات.

البـــاحثـــة

إقرار لجنة المشرفين وترشيح لجنة الدراسات العليا

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة وراثية لمرضى نزف الدم الوراثي الهيموفيليا نوع A)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(هند طاهر قادر النجار)** قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان .

التوقيع :

المشرف : د.حميد محمود مجيد

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى

التاريخ : / / ٢٠١٣

التوقيع :

المشرف : د. مثنى عبد القادر المهداوي

اللقب العلمي : مدرس

كلية العلوم / جامعة ديالى

التاريخ : / / ٢٠١٣

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الأسم : د. نجم عبدالله الزبيدي

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

رئيس لجنة الدراسات العليا – رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / ٢٠١٣

إقرار الخبير اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة وراثية لمرضى نزف الدم الوراثي نوع A)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(هند طاهر قادر النجار)** قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية , وصُحّحَ ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية , وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع

/ / ٢٠١٣

إقرار المقوم العلمي

أشُهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة وراثية لمرضى نزف الدم الوراثي نوع A)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(هند طاهر قادر النجار)** قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة .

التوقيع

/ / ٢٠١٣

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة ، أننا اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة وراثية لمرضى نزف الدم الوراثي نوع A)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(هند طاهر قادر النجار)** وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد إنها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان بدرجة(امتياز) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. أسماء محمد صالح

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / ٢٠١٣

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د.هادي رحمن رشيد

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / ٢٠١٣

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د.نغم ياسين كاظم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / ٢٠١٣

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الاسم : د.مثنى عبد القادر المهداوي

المرتبة العلمية :مدرس

التاريخ : / / ٢٠١٣

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الاسم : د.حميد محمود مجيد

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ : / / ٢٠١٣

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أصادق على ماجاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع :

الاسم : د.عباس عبود فرحان

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / ٢٠١٣

الخلاصة

تضمنت الدراسة جمع 44 عينة دم وريدي لذكور مرضى مصابين بمرض نزف الدم الوراثي نوع A من مختبرات كل من مستشفى البتول التعليمي/ بعقوبة بواقع ١٥ مصاب , ومستشفى حماية الطفل بمدينة الطب/ بغداد بواقع ٢٩ مصاب وللمدة من كانون الثاني ولغاية نيسان لعام 2012.

تم سحب 5 مليلتر من الدم الوريدي . وضعت 2.5 مليلتر في إنبوبة إختبار و أضيف لها 0.2 مليلتر من مانع تخثر سترات الصوديوم Tri-sodium citrat لمعرفة تأثير الإصابة بمرض نزف الدم الوراثي نوع A على كل من زمن تخثر الدم (Prothrombin time)و زمن (Activated Pro Thromboplastine Time)تركيز فعالية عامل تخثر الدم الثامن FVIII وإستخدم الباقي لإستخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA لتحليل الطفرة المسببة للمرض بتقنية IS-PCR .

أشارت نتائج التحليل الإحصائي الى عدم توافر فروقات معنوية في زمن تخثر البروثرومبين لدى المرضى المصابين عند مقارنتها بالقيم الطبيعية (Normal value) للقياس, ويرجع هذا الى إن سبب الإصابة بالمرض يعود الى نقص في أحد عوامل التخثر التي لها علاقة في عملية تخثر الدم ذات المسلك الداخلي, وإن إختبار زمن تخثر البروثرومبين يعكس التركيز والفعالية السوية لعوامل التخثر ذات المسلك الخارجي وتصنع هذه العوامل بالكبد.

كما أشارت نتائج التحليل الإحصائي الى توافر فروقات معنوية في زمن تخثر الثرومبوبلاستين الجزئي لدى المرضى المصابين عند مقارنتها مع القيم الطبيعية (Normal value) للقياس لأن إختبار زمن تخثر الثرومبوبلاستين الجزئي يعكس مختبرياً فعالية وقف النزف الدموي لعوامل

التخثر ذات المسلك الداخلي والتي تشمل (FXII,FXI,FX,FIX,FVIII) .وإنخفاض معنوياً في فعالية عامل تخثر الدم الثامن في معظم مجاميع المرضى المصابين بمرض نزف الدم الوراثي نوع A وخصوصاً أن المجاميع المصابة جميعها من النوع الحاد severe , وذلك لكون تركيز فعالية عامل تخثر الدم الثامن هي أقل من 1 % .

تم إستخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين الدنا (DNA) وكانت نتائج تقدير تركيز ونقاوة الدنا المنقى تراوحت بين 60.000,50,000,35.000 ug , أما النقاوة تراوحت بين (2- 1.7) والإستخلاص كان لغرض تحليل الطفرة المسببة للمرض بتقنية Inverse-Shifting PCR (IS-PCR) وتميزت هذه التقنية بأنها تقنية سريعة , وأعُطت النتائج في غضون 24 ساعة .

أما نتائج تحليل الطفرات فقد أشارت الى أن طفرة إنقلاب الأنترون 22 (Inv22type I) قد شكلت نسبة 31.8% وتضاعف ترددها بمقدار خمس مرات تردد طفرة Inv22 type II

التي شكلت نسبتها 4.55 % ويرجع السبب إن الطرف البعيد distal يكون أكثر قرباً كلما إتجهنا نحو تيلومير الكروموسوم بسبب إن عملية إنطواء الدنا أسهل وهذا هو سبب إنقلابات الجينيوم وفقدان أكثر من 50bp من جين العامل الثامن , وهذا النوع من إعادة الإتحاد المتماثل يحدث بكثرة كلما إتجهنا نحو تيلومير كروموسوم العامل الثامن , وكانت نتائج الدراسة تشير الى توافر أنقلاب في الانترون 1 من جين العامل الثامن بنسبة 9.09 % .

قائمة المحتويات

ت	الموضوع	رقم الصفحة
	الخلاصة .	I
	قائمة المحتويات .	III
	قائمة الأشكال .	VI
	قائمة الجداول .	VII
	قائمة المختصرات .	VIII
الفصل الاول : المقدمة والهدف من الدراسة		
1	**المقدمة .**	**1**
1.1	**مرض نزف الدم الوراثي نوع A .**	**1**
2.1	**الهدف من الدراسة.**	**3**
الفصل الثاني : إستعراض المراجع		
٢	**إستعراض المراجع**	**٤**
1.2	**أمراض الدم .**	**٤**
1.1.2	**أمراض التخثر.**	**٤**
2.1.2	**أمراض سرطانات الدم الخبيثة .**	**4**
3.1.2	**أمراض الهيموغلوبين .**	**4**
2.2	**عملية تخثر الدم .**	**5**
3.2	**آلية تخثر الدم .**	**7**
1.3.2	**مسار التخثر الداخلي المنشأ .**	**7**
2.3.2	**مسار التخثر الخارجي المنشأ .**	**8**
3.3.2	**المسار النهائي المشترك .**	**9**
4.2	**إعتلالات النزف الوراثية .**	**10**
5.2	**مرض نزف الدم الوراثي (الهيموفيليا) .**	**13**
1.5.2	**مرض نزف الدم الوراثي نوع Haemophilia A .**	**14**
6.2	**العامل الثامن Factor VIII .**	**16**
7.2	**تكوين الأجسام المضادة .**	**19**
8.2	**جين العامل الثامن *F 8 Gene* .**	**21**
9.2	**أنواع الطفرات المسببة لمرض نزف الدم الوراثي نوع A .**	**24**
10.2	**طرائق الكشف عن طفرات مرض نزف الدم الوراثي نوع A .**	**30**

11.2	التشخيص ماقبل الولادي لمرض نزف الدم الوراثي نوع A.	٣3
الفصل الثالث :المواد وطرائق العمل		
٣	المواد وطرائق العمل .	٣٥
1.3	الاجهزة .	35
1.1.3	الاجهزة والمستلزمات المختبرية .	35
2.1.3	المواد الكيميائية والمحاليل .	37
٣,١,٣	العدد التشخيصية المختبرية.	٣٨
٢,٣	طرائق العمل .	40
1.2.3	تحضير المحاليل .	40
3.3	الأشخاص .	40
1.3.3	جمع العينات .	٤٠
4.3	الفحوصات المختبرية .	41
1.4.3	تقدير زمن فعالية البروثرومبين PT .	41
2.4.3	تقدير زمن فعالية الثرومبوبلاستين الجزئي aPTT .	42
3.4.3	تقدير فعالية العامل الثامن FVIII .	43
5.3	عملية إستخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين الدنا .	45
6.3	قياس تركيز ونقاوة عينة الدنا .	48
7.3	التنميط الوراثي للمنطقة البينية 1 (intron1) والمنطقة البينية 22 (intron22) من مورث العامل الثامن .	48
1.7.3	تصميم تفاعل البلمرة المقلوب IS-PCR Design .	49
2.7.3	هضم الدنا .	52
3.7.3	إسترداد الدنا .	53
4.7.3	ربط قطع الدنا .	53
8.3	تقنية تغير نواتج تفاعل البلمرة المقلوب IS-PCR .	54
9.3	تفاعل البلمرة في جهاز الـ PCR .	55
1.9.3	تحليل نواتج تفاعل البلمرة المقلوب .	56
10.3	التحليل الإحصائي	57

الفصل الرابع:النتائج والمناقشة		
٤	النتائج والمناقشة .	٥٨
1.4	تأثير الإصابة بالهيموفيليا A على فحوصات الأتزان الدموي .	٥٨
1.1.4	تأثير الإصابة بالهيموفيليا A على قياس زمن تخثر البروثرومبين PT وزمن تخثر الثرومبوبلاستين الجزئي aPTT لدى المرضى المصابين بالهيموفيليا A .	58
2.1.4	تأثير الإصابة بالهيموفيليا A على تركيز عامل تخثر الثامن FVIII لدى المرضى المصابين بالهيموفيليا A .	60
2.4	التنميط الوراثي لحوادث إعادة الترتيب Rearrangement في تتابعات المنطقة البينية 22 بتقنية تغير نواتج تفاعل البلمرة المقلوب (IS-PCR) .	62
الفصل الخامس :الأستنتاجات والتوصيات		
٥	الأستنتاجات والتوصيات .	٧٠
1.5	الاستنتاجات .	70
2.5	التوصيات .	71
	المصادر الأجنبية .	73

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
1.2	مخطط آلية تخثر الدم .	10
2.2	المظاهر السريرية تضخم المفصل .	١٦
3.2	مخطط العامل الثامن للتخثر.	١٧
4.2	قطاعات العامل الثامن للتخثر .	١٨
5.2	موقع جين العامل الثامن على الذراع الطويل من كروموسوم الجنس X وتركيب الأنترون 22 في المورث .	٢٣
6.2	طفرة الإنقلاب في الأنترون 22 في جين العامل الثامن وعملية إعادة الإتحاد المتماثل .	٢٤
7.2	تقنية تغير نواتج تفاعل البلمرة االمقلوب IS-PCR .	٣٣
1.3	المسار الذي يتم فحصه بإختبار زمن تخثر البروثرومبين Prothrombin time .	٤١
2.3	المسار الذي يتم فحصه بإختبار زمن تخثر الثرومبوبلاستين الجزئي activated Partial ThromboPlastine time.	٤٣
3.3	المنحني القياسي لحساب فعالية العامل الثامن للتخثر% .	٤٥
٤,٣	أستخدام جهاز النانودروب.	٤٨
٥,٣	جميع قطع التقييد المقطعة بأنزيم القطع Bcl 1 .	٥١
١,٤	فعالية العامل الثامن للتخثر لدى مرضى الهيموفيليا A .	٦١
2.4	الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز لنواتج تقنية IS-PCR للتنميط الوراثي لأحداث إعادة الترتيب في المنطقة البينية 22 من جين العامل الثامن .	٦٣
٣,٤	نتائج تقدير قياس تركيز ونقاوة الدنا بإستخدام جهاز النانودروب .	٦٤
4.4	التحليل الإحصائي لنتائج تقنية تغير نواتج تفاعل البلمرة المقلوب IS-PCR .	64
5.4	الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز لنواتج تقنية IS-PCR للتنميط الوراثي لأحداث أعادة الترتيب في المنطقة البينية 1 من جين العامل الثامن .	66

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1.2	أهم إعتلالات النزف الوراثية .	11
1.3	الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة خلال الدراسة .	35
٢,٣	المواد الكيمياوية المستخدمة خلال الدراسة .	٣٧
3.3	العدد التشخيصية المختبرية المستخدمة خلال الدراسة .	٣٨
4.3	مجموعتين البرايمرات المستعملة بالدراسة .	٤٩
5.3	برنامج تفاعل البلمرة المقلوب في جهاز الـ PCR .	55
1.4	نتائج قياس زمن تخثر البروثرومبين PT وزمن تخثر الثرومبوبلاستين الجزئي لدى المرضى المصابين بالهيموفيليا A بالمقارنة مع القيم الطبيعية .	58
2.4	نتائج تركيز عامل تخثر الدم الثامن لدى المرضى المصابين بالهيموفيليا A بالمقارنة مع القيم الطبيعية .	٦١

قائمة المختصرات الواردة في الرسالة

1	Activated Prothromboplastin Time	aPTT
2	AdinosinDiPhosphat	ADP
3	Aminio Synthesis	AMC
4	Bacillus Caldolytical	*BcI I*
5	Base Pair	Bp
6	Chorionic Villus sampling	CVs
7	Conformation Sensitive Gel Electrophoresis	CSGE
٨	Denaturation Hight Performance Liguid Chromotography	DHPLC
9	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	DGGE
10	Deletion 22	Del22
11	Deoxy RiboNucleic Acid	DNA
12	Duplication 22	Dup22
13	Ethylene Diamine Tetracetic Acid	EDTA
14	Factor FVIII activity	FVIII:C
15	Factor FVIII Antigen	FVIII:Ag
16	Fresh Forzen Plasma	FFP
17	Haemophilia A	HA
18	Haemophilia A Mutation Structure Test and Resourse site	HAMSTeRs
19	High Molecular Weight Kininogen Defieiency	HMWKD
20	Human Immuno Globulin G	Ig G
21	Huntingtin-associated Protien 40 KD	HAP40
22	Inversion 1	Inv1
23	Inversion 22	Inv22
24	Inverse Polymerase Chain Reaction	I-PCR
25	Inverse Shifting Polymerase Chain Reaction	IS-PCR
26	Inversion 22 type Proximal	Inv22-II
27	Inversion 22 type Distal	Inv22-I
28	Killo Dalton	KD
29	Long Distance Poly merase Chain reaction	LD-PCR
30	Long –polymerase Chain Reaction	L-PCR

31	Messenger Ribo Nucleic Acid	mRNA
32	Plasma derived FVIII	PdFVIII
33	Prekallikrein	PK
33	Prothrombin Time	PT
34	Red Blood Cells	RBCs
35	Severe Haemophilia A	sHA
36	Single Strand Conformation Polymorphism	SSCP
37	Tissue Factor	TF
38	Von Willebrand Factor	VWF
39	Weibel Plade bodies	WPbs

1 . المقدمة Introduction

١-١ مرض نزف الدم الوراثي نوع A

يعُرف مرض نزف الدم الوراثي نوع A Haemophilia A بأنه إعتلال نزفي وراثي خطير وشائع يصيب الإنسان , وينتقل وراثياً عن طريق جينات متنحية Recessive genes مرتبطة بالجنس ومحمولة على كروموسوم الجنس X , ولذلك يظهر المرض في الذكور بتكرار أعلى من ظهوره في الإناث وتظهر أعراض النزف على الذكور دون الإناث اللواتي يكن بدون أعراض asymptomatic، و تبلغ نسبة الإصابة بالمرض بين المواليد الذكور واحد لكل خمسة آلاف وتحتل نسبة المصابين منهم بمرض نزف الدم الوراثي نوع A 85% (Schwarts *et al*., 2012, Ceskych and Habart,2005) , ويحدث المرض بسبب نقص في عامل التخثر الثامن FVIII نتيجة طفرات تصيب جين عامل التخثر الثامن *FVIII gene*، وفعلياً كل المصابين بالمرض ترافقهم طفرات إنقلاب مؤذية تحدث في تتابع جين العامل الثامن *F8gene* (Rossetti *et al*.,2011). وترتبط شدة المرض بمستويات فعالية عامل التخثر الثامن FVIII في الدم إذ يصنف المرض إلى حاد Severe عندما تكون مستويات فعالية العامل الثامن في بلازما الدم أقل من ١% وإلى Moderate عندما تكون مستويات فعالية العامل الثامن في بلازما الدم تتراوح بين 1-5% وإلى Mild عندما تكون مستويات فعالية العامل الثامن في بلازما الدم تتراوح بين 5-35% .

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

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

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

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

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

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

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

1-2 الهدف من الدراسة :

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

٢. إستعراض المراجع Literature review

2-1 أمراض الدم Blood diseases :

هي أمراض تؤثر في وضائف الدم أو تركيبه و تكون أما أمراض خلقية (فطرية) منذ الولادة , وتنتج عن اعتلالات وراثية مورثة , أو تكون أمراض مكتسبة. هناك ثلاثة أنواع من أمراض الدم هي :

2-1-1 أمراض التخثر:

هي إعتلالات تتعلق بالنزيف , وتكوين الخثرة مثل مرض نزف الدم الوراثي الذي يعد من أكثر الأمراض الوراثية الشائعة التي تصيب الإنسان والتي تحدث بسبب نقص في أحد عوامل التخثر. ومرض فون ويليبرند von willebrand disease الذي يحدث بسبب نقص في عامل فون ويليبرند. (Van den Biggelaar and A M .Bouwens,2011)

2-1-2 أمراض سرطانات الدم الخبيثة :

وهي نوع من أنواع السرطانات , وتؤدي الى تكوين أعداد كبيرة من كريات الدم وغالباً ماتكون عديمة الوظيفة ومن أمثلتها اللوكيميا Leukemia وهي شكل من أشكال سرطانات الدم التي تتضاعف فيه خلايا الدم البيض غير الناضجة بداخل نخاع العظم بصورة غير طبيعية . (Patel *et al*.,2005)

2-1- 3 أمراض الهيموغلوبين :

وتشمل مجموعة من الأمراض التي تؤثر على صبغة الهيموغلوبين داخل كريات الدم الحمراء مما يؤدي الى قصور في عمل كريات الدم الحمراء , والغالبية العظمى من هذه الأمراض هي

أمراض وراثية ومن أمثلتها مرض الثلاسيميا Thalassemia وهو إعتلال وراثي يؤثر على نتاج الهيموغلوبين الطبيعي , وهو شائع في سكان البحر الأبيض المتوسط . (Nurden and Nurden,2008)

2-2 عملية تخثر الدم Blood coagulation Process:

تتكون الخثرة الدمويه نتيجة لسلسلة من التفاعلات التي تتحول خلالها الزايموجينات الشكل غير الفعال الى أنزيم فعال في بلازما الدم، وتنتهي سلسلة هذه التفاعلات بتكوين خثره الفايبرين غير الذائبة (Ramanarayanan ,2005). يلعب نظام التوازن Haemostatic system الذي يتألف من الأوعية الدموية ومحتوياتها , وله دورٌ حيويٌّ كبيرٌ في حماية حياة الإنسان من خلال عملية تخثر الدم (McKenna *et a*l.,2005; Schwarts *et al*.,2012)، اذ يؤدي تمزق الوعاء الدموي إلى اندفاع كميات كبيرة من الدم خارج الوعاء الدموي ،عندها تبدأ عملية تخثر الدم التي يجب أن تكون سريعة لغرض التقليل من فقدان الدم. وعملية تخثر الدم تكون بشكل سلسلة متتالية من العمليات تؤدي بالنتيجة إلى تخثر الدم وتوقف النزف وتحدث هذه العمليات بالتسلسل الآتي :-

عندما يصاب الوعاء الدموي ميكانيكيا Trauma فأنه يتقلص Vasoconstriction؛ وذلك للتقليل من فقدان الدم. إن تحطم خلايا الطبقة الظهارية المبطنة للوعاء الدموي و تحطم الكولاجين (المادة الرابطة بين الخلايا) سوف يجعل هذا الأخير بمواجهة الصفيحات المنتشرة في الوعاء الدموي والتي تربط وتتماسك بصورة مباشرة بالكولاجين من خلال مستقبلات الصفيحات المتوافرة على سطح الصفيحة الدموية , وهذه المستقبلات عبارة عن بروتينات كربوهدراتية تدعى (Ia/IIa)،ويؤدي الأرتباط الى تغيير شكل الصفيحات من الشكل القرصي إلى الشكل غير المنتظم بعمليات تدعى تغير الشكل Shape change تطلق الصفيحة المفعلة

بعد إلتصاقها بالكولاجين محتوياتها إلى داخل بلازما الدم , وتشمل هذه المحتويات العامل المنشط للصفيحات Platelet activating factor وعامل فون ويليبرند von willebrand factor الذي يعد من العوامل المهمة في إصلاح الأنسجة إذ يكون مخزوناً داخل أجسام Weibel plade bodies (WPBs) وهذه الأجسام هي عبارة عن إمتدادات لعضيات مفرزة خاصة من خلايا الطبقة الظهارية المبطنة للوعاء الدموي المتضمنة لهذا العامل والتي تشترك في إصلاح الأنسجة(Valentijn *et a*l.,2011). ويعد TXA2(Thromboxan A2) من المواد التي تسبب تجمع الصفيحات الدموية كما ينشط أنزيم الفوسفولاييز A2 المتوافر في غشاء الصفيحة المحرر لحامض الأراشيدونيك من الدهون الفسفورية للغشاء , ويتحول حامض الأراشيدونيك إلى الثرومبوكسان A2 وهو الذي يساعد على تجمع الصفيحات وتحرر محتوياتها. ومن المواد الأخرى Adenosine Di Phosphate (ADP) والسيروتونين , وهما يزيدان من تجمع الصفيحات الدموية , وعندها تتكون سدادة الصفيحة Platelet Plug (Thiagarajan *et al*., 2013) .المرحلة الاخيرة هي تكوين خيوط الفايبرين Fibrin Thread في الموضع الأولي إذ تتكون السدادة فضلاً عن مساعدة سطح الصفيحات على تشكيل الثرومبين بما يملكه من قدرة فعالة في تجميع عوامل التخثر, حينها يكتمل تجميع كريات الدم الحمر وكريات الدم البيض وتتكون الخثرة الدموية وهنا يكون قد تم غلق الاوعية الدموية الممزقة , Michael). (2002 بعد دقائق من تكون الخثرة تبدأ عملية تقلص ألياف الفايبرين وأن معظم السائل المتوافر في الخثرة هو المصل بعد تخلصه من الفايبرينوجين بالاضافة الى معظم عوامل التخثر (Columan *et al*., 1987; Guyton and Hall, 2006). أخيراً تبدأ آلية انحلال الفايبرين Fibrinolysis وهي عملية فسلجية تقوم على أساس إزالة ترسبات الفايبرين غير

الطبيعية , ويحدث خلالها تسييل Liquefaction خثرة الفايبرين عن طريق فصل العديد من الأواصر الببتيدية للفايبرين , وتكوين قطع غير ذائبة. ومن ثم التخلص من هذه القطع غير الذائبة عن طريق الخلايا البلعمية الكبرى Macrophages (Adcock *et al*.,2002; Guyton and Hall,2006).

2-3 آلية تخثر الدم Blood Clotting Mechanism:

هي الآلية التي تؤدي لتكوين أنزيم الثرومبين , والذي له القدرة على شطر الفايبرينوجين وهو احد بروتينات البلازما الذائبة المخلقة في الكبد محولاً إياه الى ألياف من خيوط الفايبرين غير الذائبة. ثمة ثلاثة مسارات لتخثر الدم وحسب مامبين بالشكل (2-1)

(Payandeh *et al*.,2011; Mc kenna *et al*., 2005).

2-3-1 مسار التخثر الداخلي المنشأ (مسار التفعيل بالتماس): The intrinsic Coagulation Pathway

يبدأ هذا المسار عندما يصاب الوعاء الدموي بجرح ما أو عند تعرض الدم الى سطح مشحون بشحنة سالبة مثل الزجاج , وفي حالة الاستجابة لهذه المحفزات يمكن أن تحصل حالتان:-

الحالة الأولى: تحول العامل الثاني عشر FXII غير النشط الى الشكل النشط FXIIa.

الحالة الثانية: تنشيط الصفيحات إذ إن العامل الثاني عشر النشط FXIIa هو أنزيم Protease يحول العامل الحادي عشر FXI الى العامل الحادي عشر النشط FXIaوهذا التفاعل يتطلب توافر جزيئه HMWK (High Molecular Weight Kininogen) و Prekallekrein. ويعمل العامل الحادي عشرFXIa النشط على تحويل العامل التاسع FIX

الى عامل التاسع النشط FIXa وهذا بدوره يحول العامل العاشر FX الى عامل العاشر النشط FXa .

وظيفة عامل تخثر الدم العاشر FXa النشط هو تحويل جزيئة البروثرومبين Prothrombin غير الفعالة الى جزيئة ثرومبين فعالة Thrombinوحتى يتم هذا التحويل يتطلب توافر عامل تخثر الدم الخامس النشط FVa وجزيئة الثرومبين التي تشطر الفايبرينوجين الى الفايبرين المتوافر آنذاك بشكل خيوط اشرطة الفايبرين.

2-3-2 مسار التخثر الخارجي المنشأ (مسار العامل النسيجي) : The Extrinsic Coagulation pathway

يتمثل الدور الرئيس لمسار العامل النسيجي في تحفيز حدوث عملية تدفق الثرومبين تلك العملية التي يتم من خلالها على الفور إفراز أنزيم الثرومبين الذي يعد أهم عناصر التخثر من حيث الأدوار التي يلعبها في تنشيط تفاعلات عملية تجلط الدم ، وينتشر العامل السابع النشط FVIIa في صورته النشطة بكميات أكبر من أي عامل نشط من عوامل التجلط الأخرى , وتحدث العمليات بالتسلسل الآتي:-

1 -بعد إصابة أحد الأوعية الدموية . ينفصل العامل السابع FVII عن مسار الدورة الدموية ويتحد مع العامل النسيجي الذي تحمله وتنقله الخلايا الحاملة للعامل النسيجي (الخلايا اللمفية وخلايا الدم البيض) مكوناً مركباً معقداً منشطاً (يتألف من العامل النسيجي والعامل السابع النشط FVIIa , وإختصاره (TF-FVIIa) .

2 – يقوم مركب TF-FVIIa بتنشيط العاملين التاسع والعاشر X,IX .

3 – يتم تنشيط العامل السابع VII نفسه بفعل الثرومبين والعامل الحادي عشر النشطXIa والعامل العاشر النشط Xa.

4 – يقوم غالباً مثبط مسار العامل النسيجي Tissuse Factor Pathway Inhibitor (TFPI)على الفور بتثبيط نشاط العامل العاشر النشطXa بفعل مركب TF-FVIIa.

5 – يقوم كل من العامل العاشر النشط Xa ا والعامل المساعد له المتمثل بالعامل الخامس النشط FVa بتكوين أنزيم البروثرومبين الذي يعمل على تنشيط بروتين البروثرومبين وتحويله الى الثرومبين.

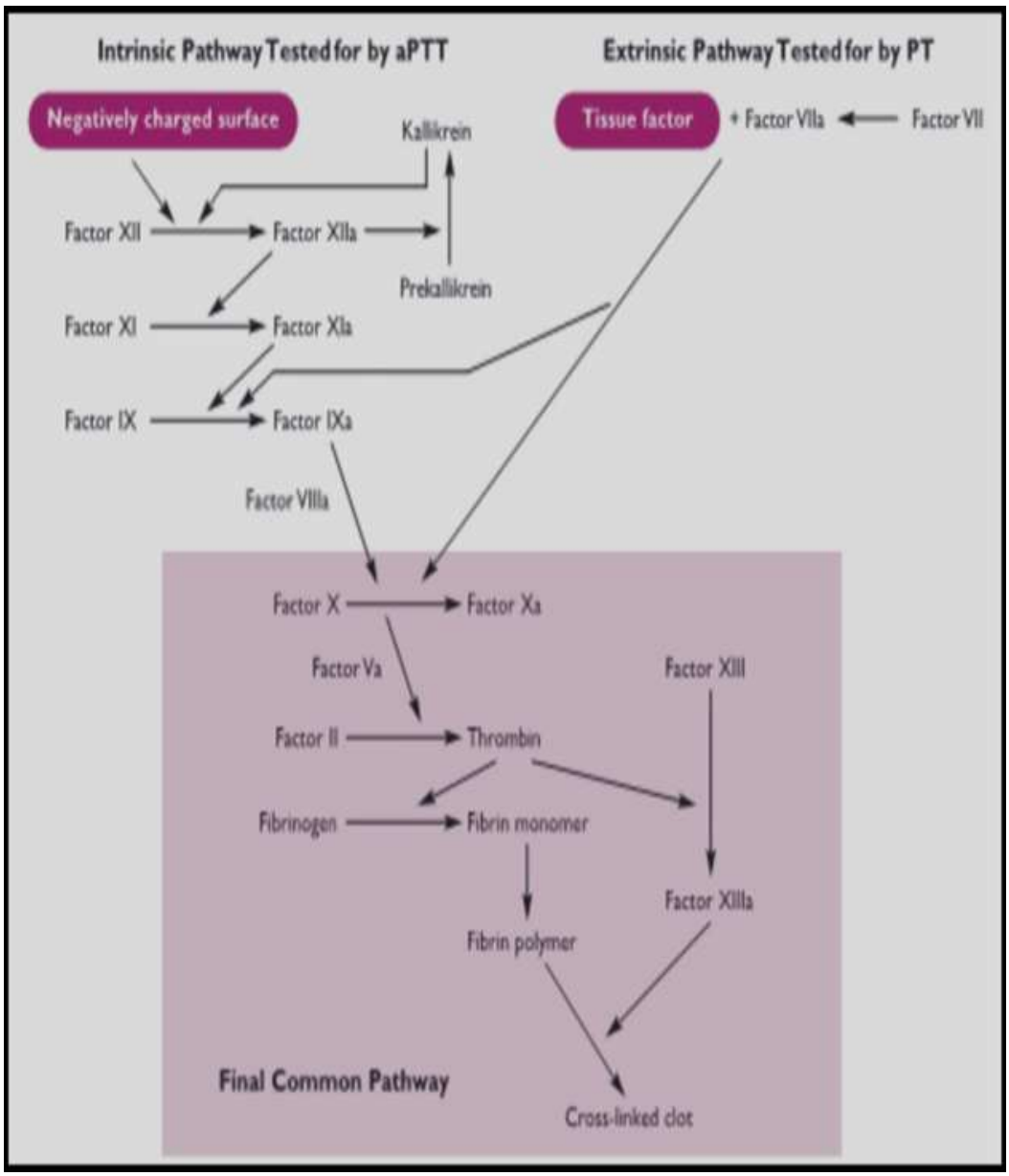
6 – بعد ذلك ،يقوم الثرومبين بتنشيط العناصر الأخرى المتوافرة في شلال التخثر بما في ذلك العاملين الثامن والخامس V,VIII (اللذين يعملان على تنشيط العامل الحادي عشر XI الذي يقوم بدوره بتنشيط العامل التاسع IX). وكذلك يقوم الثرومبين بتنشيط العامل الثامن VIII وتحريره من إلتصاقه بالعامل فون ويلبرند.

7 – يعد العامل الثامن النشط VIIIa هو العامل المساعد للعامل التاسع النشط IXa ، إذ يتحدان معاً لتكوين المركب الأنزيمي الذي يقوم بدوره بتنشيط العامل العاشر X (Steffel *et al*.,2006).

2-3-3 المسار النهائي المشترك **Final Common pathway**:

في هذا المسار تتحول جزيئه البروثرومبين غير الفعالة الى جزيئة الثرومبين الفعالة بتوافر العامل الخامس النشط FVa , وحينها يقوم الثرومبين بشطر الفايبرينوجين الذائب Solubleالى الفايبرين غير الذائب Insoluble، ويعجل هذا التحول بتوافر عامل التخثر الثالث

عشر النشط FXIIIa الذي يزيد من ثبات خثره الفايبرين واستقرارها ، بعدها يتحول الفايبرين غير الذائب الى خثرة فايبرين مرتبطاً Cross Link fibrin Clot (Marlar *et* . *al*.,1982;Bombeli and Spahn,2004)



شكل (2-1) آلية تخثر الدم.

4-2 أعتلالات النزف الوراثية Inherited Bleeding Disorders:

هي الاعتلالات التي تحدث عندما لا يحصل تخثر الدم في موقع جرح الأوعية الدموية من خلال التصاق الصفيحات الدموية وتتكون سدادة الصفيحة لتمنع من استمرار النزف , وبالتالي تتكون شبكة الفايبرين الأصلية التي تسد منطقة الجرح (Rijken and Lijnen,2009) ويلاحظ في الجدول رقم (٢-١) أهم أعتلالات النزف الوراثية (Dalal *et al* ., ٢٠٠٦)

جدول (2-1)أهم اعتلالات النزف الوراثية.

ت	الإعتلال	الوراثة والموقع الكروموسومي	المضاعفات والأعراض	التشخيص
١	Inherited Thrombocytopenia		نزيف على شكل بقع في مناطق مخفية تحت البشرة ونزف ضمن الأغشية المخاطية وخروج دم من التقيؤ والخروج	نقصان عدد الصفيحات وقياس زمن تخثر الثرومبوبلاستين الجزئي aPTT طبيعي وقياس زمن الفايبرينوجين طبيعي
٢	Thrombasthenia (impaired Platelet function) مثل مرض Glanzmannومرض Bernard Soulier	وراثة جسمية متنحية	نزيف متنوع الخطورة وزيادة النزيف بعد أثر كل عملية جراحية	فحوصات تجمع وإلتصاق الصفيحات
٣	Haemophilia A(FVIII deficiency)	وراثة متنحية مرتبطة ومحمولة على كروموسوم الجنس Xq28	نزيف تلقائي داخل المفاصل وضمن القناة البولية والقناة المعوية وطول فترة النزيف بعد أثر عملية جراحية	زيادة زمن aPTT ونقصان فعالية العامل الثامن لكن مستويات العامل فون ويلبرند طبيعية
٤	Haemophilia B(FIX deficiency)	وراثة متنحية مرتبطة ومحمولة على كروموسوم الجنس Xq27	نزيف تلقائي داخل المفاصل وضمن القناة البولية والقناة المعوية وطول فترة النزيف بعد أثر عملية جراحية	زيادة زمن aPTT ونقصان فعالية العامل التاسع لكن مستويات العامل فون ويلبرند طبيعية

٥	مرض فون ويلبرند von Willebrand disease هو من معظم إعتلالات وضائف الصفيحات الشائعة ويوجد في أنواع I,II,Pseude	وراثة جسمية سائدة ووراثة متنحية ومرتبطة بكروموسوم الجنس X	نزيف من الأنف ومن القناة المعوية وطول مدة النزيف بعد عملية إقتلاع الأسنان وبعد عملية جراحية	زمن تخثر aPTT قد يكون مرتفع ,تلاصق وتجمع الصفيحات يكون غير طبيعي
٦	1- نقصان العامل I والذي يشمل Afibrinogenemia 2-Hypofibrinogenemia 3-Dysfibrinogenemia	وراثة جسمية متنحية على كروموسوم الرابع 4q23-34	الشخص المصاب بمرض hypofibrinogenemia قد يعاني من نزيف يتراوح من المتوسط الى الحاد	زمن تخثر aPTT طويل وزمن تخثر PT طويل ومستوى ونسبة الصفيحات طبيعية
٧	نقصان العامل II والذي يشمل 1-hypoprothrombinemia 2-Dysprothrombinemia	وراثة جسمية متنحية 11p 11q-12	نزف من البشرة ومن الأنف وطول المدة وزيادة بالنزف مع جروح صغيرة بعد أثر عملية جراحية	زمن تخثر PT طويل قياس فعالية العامل FII وزمن تخثر aPTT طويل
٨	مرض Owrens disease نقصان فعالية العامل FV Parahaemophilia	وراثة جسمية متنحية 1q21-25	نزف من البشرة ومن الأنف وطول المدة وزيادة بالنزف مع جروح صغيرة بعد أثر عملية جراحية	زمن النزف Bleeding time قد يكون طويل وزمن تخثر PT طويل وزمن تخثر aPTT طويل ونقصان فعالية العامل FV
٩	Factor FVII (Proconvertin)	وراثة جسمية متنحية	نزيف من الأغشية المخاطية وزيادة النزيف من العضلات أو المفاصل ونزف من الأغشية العصبية ومشاكل متعلقة بالجهاز العصبي المركزي	زمن تخثر PT طويل زمن تخثر aPTT طبيعي وقياس فعالية العامل VII
١٠	نقصان فعالية العامل FX Prower factor deficiency	وراثة جسمية متنحية 13q32	نزيف من الأغشية المخاطية ومن المفاصل والعضلات والقناة المعدية	زمن تخثر PT قد يكون طويل وزمن تخثر aPTT طبيعي ونقصان بقياس فعالية العامل FX
١١	Haemophilia C نقصان فعالية العامل FXI Rosenthal Syndrome	وراثة جسمية متنحية 4q35	زيادة النزف بعد أثر عملية جراحية وخروج دم مع البول	زمن تخثر aPTT طويل وزمن تخثر PT طويل وقياس فعالية العامل FXI

١٢	نقصان العامل FXII Hageman factor deficiency	وراثة جسمية متنحية 5q33	عموماً لاتوجد أعراض لكن من المتوقع زيادة في التخثر Thrombosis	زمن تخثر aPTT طويل وزمن تخثر PT طويل وقياس فعالية العامل FXII
١٣	نقصان العامل FXIII Stabilizing factor deficiency	وراثة جسمية متنحية A-subunit 6p24-25 B-subunit 1q31-32	زيادة بالنزف بعد أثر صدمة	زمن تخثر aPTT طويل وزمن تخثر PT طبيعي وقياس فعالية العامل FXIII

كما أن هناك أعتلالات أخرى ناتجة عن نقص عوامل تخثر موجودة بالدم نقصها يسبب أعتلالاً وراثياً وهي :-

1- High Molecular weight kininogen deficiency (HMWK) أو عامل Williams factor:- هذا البروتين من عوامل تخثر الدم ويسمى بنظام kinin-kallikrein. يمتص هذا البروتين من السطح من مواد بايولوجية تنشأ من أحتكاك او ملامسة الدم داخل الجسم. يدور في الدم بسرعة وتمتصه المواد البايولوجية بالسطح , ويعد هذا العامل من العوامل المبكرة بالأشتراك في مسار التخثر الداخلي Intrinsic coagulation pathway (Higashigama *et al.,*1986)

2- عامل Prekallikrein (pk) أو عامل Fletcher factor:- هذا العامل يحل محله بالبلازما kallikrein الذي هو serine protease وينشط الكاينيز (Dasanu Kinins and Alexandescu,2009)

2-5 مرض نزف الدم الوراثي Haemophilia:

مرض نزف الدم الوراثي (الهيموفيليا) هو صنف من اعتلالات النزف الوراثية المتنحية المرتبطة والمحمولة على كروموسوم الجنس X. ويصنف المرض من خلال قابلية الجسم في السيطرة على عملية تخثر الدم , أو تكوين الخثرة المستعملة في وقف النزيف عندما تتحطم الأوعية الدموية (Konkle,2011). يحدث مرض نزف الدم الوراثي (الهيموفيليا) بسبب نقص في فعالية عامل تخثر الدم الثامن والذي يعرف بالعامل المضاد للناعور Antihemophilic Factor (AHF) (Sergue *et al*.,2002)

ثمة ثلاثة أنواع من هذا الأعتلال:

اولاً: مرض نزف الدم الوراثي نوع A : هذا المرض هو أعتلال نزفي وراثي متنحي محمول على كروموسوم الجنس X سببه نقص في عامل التخثر الثامن ويصاب به الذكور فيما تكون الأناث غالباً حاملة للمرض (Herrmann and Wulff;2004)

ثانيا: مرض نزف الدم الوراثي نوع B : وهذا المرض هو اعتلال نزفي وراثي متنحي محمول على كروموسوم الجنس X ايضًا سببه نقص في عامل تخثر الدم التاسع. (Mahajan *et al*., 2004)

ثالثا: مرض نزف الدم الوراثي نوع C: وهذا المرض هو أعتلال نزفي وراثي متنحي لا يحمل على كروموسوم الجنس X , يحدث بسبب نقص في فعالية عامل التخثر الحادي عشر

ويصيب كلا الجنسين الذكور والأناث وشائع ومنتشر في المجاميع السكانية اليهودية (Seligsohn *et al.*,2001).

2-5-1 مرض نزف الدم الوراثي نوع A(HA) Haemophilia A :

مرض نزف الدم الوراثي (هيموفيليا A) هو صنف من إعتلالات التخثر مرتبط ومحمول على كروموسوم الجنس X ذي تأثير واسع الأنتشار تقريباً. يصيب واحد من كل خمسة آلاف من الذكور المولودة حديثاً. تم أكتشاف المرض قبل مئات السنين , وقد ثبت أنه ناتج عن نقص أحد عوامل التخثر في عام 1840عندما تم تصحيح النقص بوساطة نقل الدم الى المريض. وفي عام 1911 وجد أن أعطاء البلازما الطبيعية للمرضى المصابين بنزف الدم الوراثي يؤدي الى تقليل وقت التخثر .وفي عام 1937تم أثبات أن أعطاء العامل الثامن المأخوذ من البلازما الطبيعية الى المرضى المصابين بالهيموفيليا أدى الى تصحيح عملية التخثر لدى الأشخاص المصابين بالمرض (Mckenna *et al.*,2005).

هناك 1800 طفل يولد في الولايات المتحدة سنوياً مصاباً بالهيموفيليا, وفي كندا يتوافر حوالي 2500 طفل كندي مصاباً بهذا الأعتلال وفي بريطانيا يتوافر 400 طفلاً مصاباً بهذا الأعتلال سنويا (Jandle,1990) . وقدرت الجمعية المصرية للهيموفيليا Egyptian hemophilia Society انتشار المرض في مصر بـ 3,78 حاله لكل 100,000 ذكر مصري (Gab-Allah and Ahmed;1990) وقد اطلق على هذا المرض تسمية المرض الملكي Royal Diseaseنسبة لإنتشاره بالعوائل الملكية في اوربا، إذ أن الملكة فكتوريا ملكة بريطانيا كانت حاملة للمرض (Aronson,1973;Meacham and Pedersen,1995).

وتصنف الهيموفيليا A بحسب مستوى تركيز عامل تخثر الدم الثامن FVIII في البلازما إلى :-

A- الشكل الحاد (Severe) عندما يكون مستوى فعالية عامل التخثر الثامن FVIII أقل من 1% .

B – الشكل المعتدل (Moderate)عندما يكون مستوى فعالية عامل التخثر الثامن FVIII بين 1-5%.

C- الشكل الخفيف (Mild)عندما يكون مستوى فعالية عامل التخثر الثامن FVIII بين 5-35 % (Kasper and Buzin,2007)

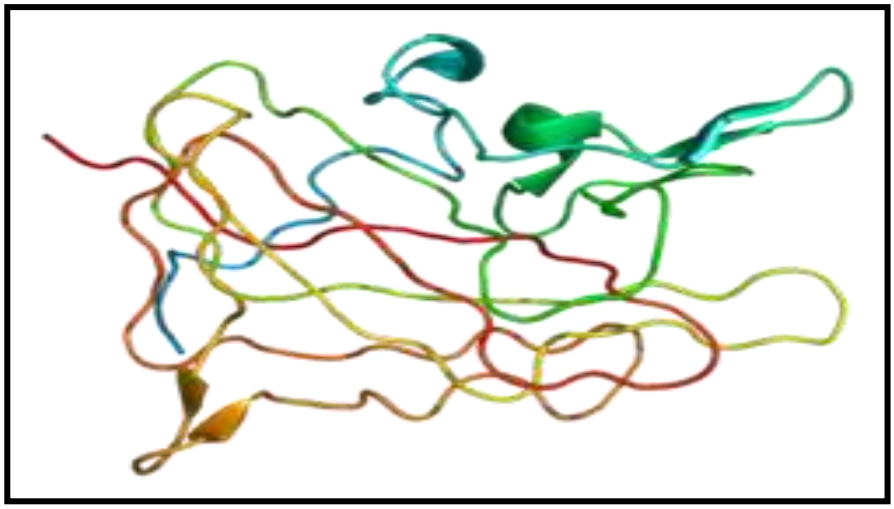
ومن المظاهر السريرية التي يظهرها مرضى الهيموفيليا A الحاد الشكل (2-2) (Schwarts *et al*., 2012) هي النزيف الداخلي بالمفاصل , فعندما يكدم المفصل يدخل الدم داخل فراغات المفاصل، وهذا النزيف مؤلم ويؤدي إلى إلتهابات طويلة الأمد , وعندها يبدأ المفصل بالتدهور وتنتج عنه تشوهات دائمية ويتضخم Synovial hypertrophy ويفقد القابلية على الحركة وتكون الأطراف غير متساوية بالطول، ويتجمع الحديد بالجسم Hemosiderin deposition وبعدها يحدث تليف بالمفصل Fibrosis وأخيراً يتحطم الغضروف ويتكون كيس عظمي تحت الغضروف Sub chondral bone-cyst (Bolton and Pasi - ;2003;Heyworth *et al*.,2005)



الشكل (2-2) المظاهر السريرية للمرض تضخم المفصل.

2-6 العامل الثامنFactor VIII :

هو أحد بروتينات تخثر الدم ومن نوع البروتينات المرتبطة بالسكر Glycoprotein , له وظيفة أساسية وجوهرية في عملية التخثر الداخلية المنشأ (Saenko *et al*.,1999). إن نقص هذا العامل يؤدي إلى الإصابة بمرض الهيموفيليا نوع A (Basu and Banerjee,2004).

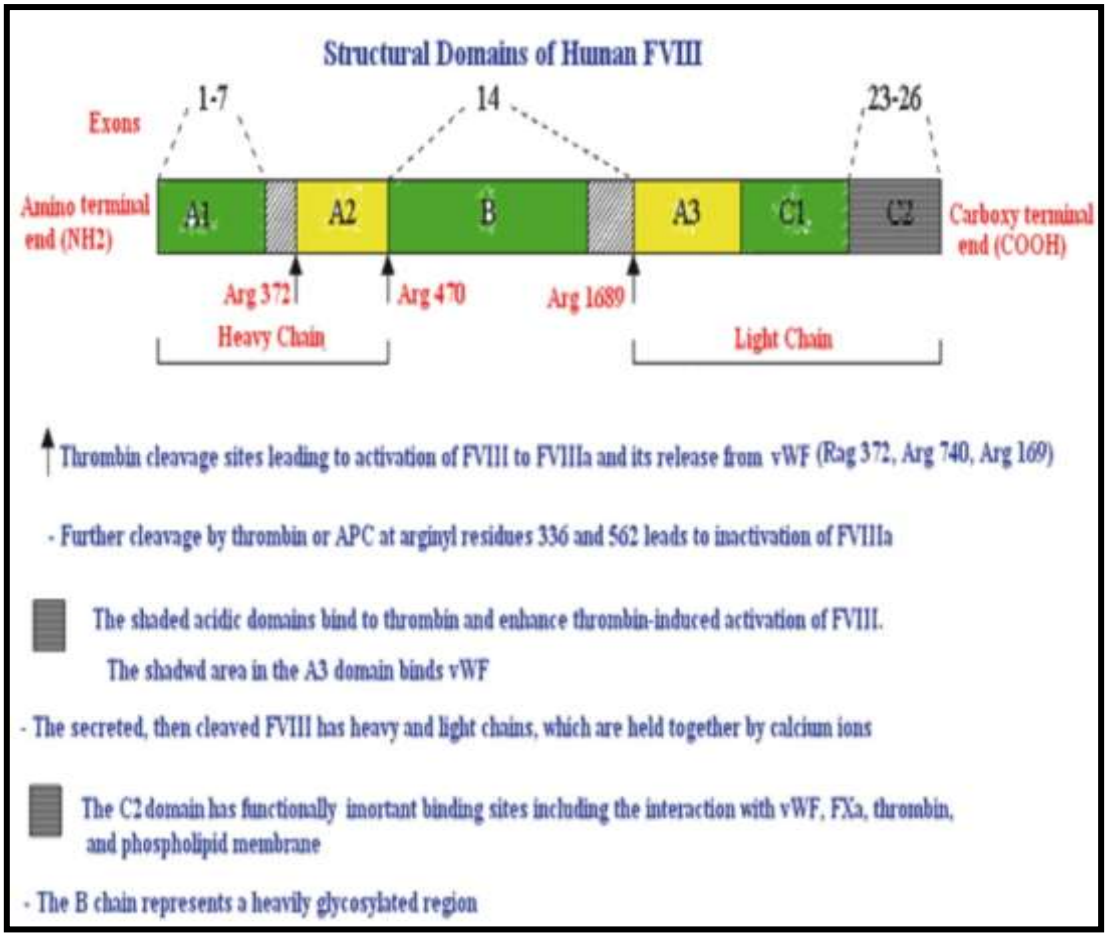


شكل (2-3) العامل الثامن للتخثر.

يتألف بروتين عامل التخثر الثامن الخامل المتوافر في الدورة الدموية قبل التنشيط (inactive pro-cofactor) من 2332 حامض أميني , وعند التنشيط يقطع بفعل الثرومبين ويكون مؤلفاً من وحدتين ثانويتين السلسلة الخفيفة من الطرف الكاربوكسيلي وزنها 80,000KD مرتبط بمعدن يكون مسؤولاً عن إرتباط كل من السطوح الفعالة للصفيحات النشطة من جهة , وإرتباط عامل فون ويليبرند من جهة أخرى (Spiegel *et al*.,2004) , ويرافقها الطرف الأميني NH2

السلسلة الثقيلة ذات وزن جزيئي 90,000KD (Kane and Davie,1988). وتكون السلسلتين مرتبطتان مع بعض بوساطة أيون الكالسيوم , وهناك عوامل تزيد من أفراز العامل الثامن وترفع من مستويات إفرازه وهي الإبنفرين والإستروجين وكذلك التمارين (Schwarts *et al*.,2012) . وهناك دراسات عديدة عن التخليق الحيوي للعامل الثامن اكدت أن الخلايا الكبدية هي المنتج الرئيس و المسؤولة عن خزن العامل الثامن وليس الخلايا الجيبانية . أما من حيث إفراز جزيئة العامل الثامن فإنه يفرز من خلال الترابط مع عدد من بروتينات من نوع Chaperone , وهذه البروتينات هي التي تشكل نسبة كبيرة من جزيئات العامل الثامن والتي تخزن بداخل الشبكة الأندوبلازمية(Spiegel *et al*.,2001) .

وتقسم جزيئة بروتين العامل الثامن الى حقول عدة Domain وذلك بناءً على التماثل في جزيئة البروتين الشكل (2-4) (Schwarts *et al*.,2012).



شكل (2–4) تركيب القطاعات في العامل الثامن للتخثر .

إن القطاعين A متماثلان ومحاطان بمنفصلات قصيرة هي a3 -a2-a1 المؤلفة من تجمعات من الأحماض الأمينية Asp-Glu وتدعى بالمناطق الحامضية والقطاعان C متماثلان وذوا تركيب قريب من قطاع C في عامل تخثر الدم FV بالإضافة الى توافر بروتين Lectin discoidin الرابط للدهن , والقطاع B يتفرد من بين هذه القطاعات. وهذه القطاعات تلعب وظيفة مهمة من وظائف العامل الثامن (Tantawy,2010). وإن إستقرارية جزيئة العامل الثامن في الدورة الدموية تعود إلى ارتباطها مع 50جزيئة من جزيئة عامل فون ويليبرند.

يبلغ معدل العمر النصفي Half-live للعامل الثامن عند توافر عامل فون ويليبرند بمستوياته الطبيعية 12 ساعة تقريباً .وينخفض معدل نصف عمر العامل الثامن إلى ساعتين في حالة غياب العامل فون ويليبرند (Brinkhous,1975).

2-7 تكوين الأجسام المضادة Antibodies formation :

من أهم المشاكل التي ترافق مرضى الهيموفيليا هي تكوين الأجسام المضادة Antibodies أو Inhibitors ضد عامل تخثر الدم الثامن بعد فترة من أخذ العلاج التعويضي ، والذي يحتوي على مستويات عالية لعامل FVIII (Hoyer,1994;Lollar and Aledort,1995; Leissinger ,2004) الأجسام المضادة المتكونة ضد عامل تخثر الدم هي عبارة عن كلوبيولينات مناعية متعددة النسيلة Poly clonal (Fulcher *et al;*1987) immunoglobin. وإن الأجسام المضادة المتكونة ضد عامل التخثر الثامن هي من نوع IgG (وبالتحديد IgG4 (Lacroxi – Desmazes *et al*;2002) بينت كثير من الدراسات ومنها الدراسة التي قام بها (Saenko *et al*., 2002) إن هناك نوعان من الأستجابة للأجسام المضادة التي قد تتكون لدى المرضى المصابين بالهيموفيليا بعد إستخدام العلاج التعويضي : النوع الأول يسمى بالأستجابة الواطئة Low responders وعندها يكون مستوى الأجسام المضادة أقل من ٤٥(Bethesdau(BU/ml ، والنوع الآخر هو الأستجابة العالية High responders وعندها يكون مستوى الأجسام المضادة أكثر من (Bethesdau(BU/ml 45 . وبين Wang وجماعته ان هناك تماثلاً في انتشار مثبطات العامل الثامن بين المصابين بالهيموفيليا الذين عولجوا فقط بالعامل الثامن المشتق من البلازما Plasma derived FVIII(Pd FVIII) أو من Fresh frozen plasma(FFP) (Wang *et al*.,2010).

الآلية التي تعمل بها الأجسام المضادة التي تتكون في أجسام المرضى واضحة بالنسبة للعامل الثامن , لكنها أقل وضوحاً بالنسبة للعامل التاسع (Rich *etal*;2003) . وبصورة عامة فإن الأجسام المضادة قادرة على الأرتباط بمواقع معينة من جزيئة العامل غير الفعالة فتؤدي إلى حدوث تغيير في شكل الجزيئة (Vander Bom *et al*.,2003). وأظهرت الدراسات أن جزيئة العامل الثامن تحتوي على تراكيب تدعى محددات مستضدية Epitopes متوافرة على سطح الجزيئة وهذه التراكيب يتم تمييزها من قبل الأجسام المضادة , وتتمركز في قطاعات C2,A2,A3 من جزيئة العامل الثامن (Reding *et al* .,2000;Gilbert and Drinkwater ,1993). وتعمل الأجسام المضادة على الإرتباط مع جزيئة العامل الثامن عند المواقع الحساسة في الجزيئة والتي تسمى بـ (مواقع الأرتباط) إذ يتم فيها إرتباط كل من العامل فون ويلبرند von willebrand factor والعامل التاسع بجزيئة العامل الثامن بالأضافة إلى مواقع إرتباط الدهون الفوسفاتية (McMillan *et al* ;1988; Scandella *et al*.,2001)

هناك عدد من الطفرات تكون مترافقة مع المخاطر العالية لتكون المثبطات بدرجة كبيرة ومن هذه الطفرات *Large mutidomain deletions ,nonsense mutation ,isochromosomal introne 22 inversions* وأثبتت دراسات قام بها الباحث Oldenburg (1997) أن خطر تكون الأجسام المضادة أو المثبطات تعتمد على نوع الطفرة الوراثية المتوافرة في الجين المسؤول عن تصنيع عامل التخثر أو بروتينات التخثر (Oldenburg *et al*.,2004). إن زيادة معدل تكوين الأجسام المضادة بمايقارب 40 % يحدث لدى المرضى المصابين بالهيموفيليا الذين يعانون من حدوث طفرات وراثية من نوع القراءة الخاطئة (Fijnvadraat *et al*.,1997) . بينما أشارت دراسة أخرى إلى أن الزيادة الحاصلة في نسبة الأجسام المضادة لدى مرضى الهيموفيليا من النوع A يتزامن مع توافر

الطفرات من نوع الحذف و الإنقلاب فضلاً عن مساهمتها في فشل التعبير الجيني وفي تكوين البروتين (Liu *et al*.,2002) . إنّ الأجسام المضادة الأولية Primary antibodies تتكون في بعض الأحيان بعد أخذ القليل من العلاج التعويضي و الذي يحتوي على عوامل التخثر وعزي ذلك إلى إحتواء جسم المريض على أنواع مختلفة من الكلوبيولينات المناعية . أما الأجسام المضادة من النوع الثانوي Secondary antibodies فإنها قد تتكون عند بعض المرضى المصابين بالهيموفيليا , والذين يأخذون العلاج لوقت طويل Briet and Peter (2001). في حين وجد الباحث Hay أن متوسط الوقت اللازم لتكوين الأجسام المضادة يتراوح بين 9–12 يوماً بعد التعرض المستمر للعلاج التعويضي (Hay,2002) , إنّ الأجسام المضادة لجزيئة العامل الثامن هي من التعقيدات الرئيسة عند أخذ العلاج التعويضي في حالات الأصابة severe Haemophilia A(sHA). وأشار الباحث Salviato وجماعته أن معظم المصابين يعانون من طفرات نقطية point mutation التي تعيق من أفراز العامل الثامن بصورة طبيعية (Salviato *et al*.,2007) .

8-2 جين العامل الثامن*FVIII Gene:*

يقع الجين المسؤول عن تصنيع بروتين العامل الثامن في النهاية الطرفية من الذراع الطويل q لكروموسوم الجنس X (Xq28) (Hay *et al*.,2000;Mckenna *et al*.,2005). جين العامل الثامن هو من أضخم الجينات المعروفة يبلغ طوله 186 Kb. يتألف هذا الجين من 26 إكسون تتراوح في الطول من 69-3106 bp ، ومن 25 إنترون وتساوي هذه الأنترونات طولاً 177,9 Kb (Antonarakis,1988;Lollar and Aledort ;1995) .تُزال هذه الأنترونات من المستنسخ الأولي في أثناء عمليات الإنضاج Splicing process لتوليد جزيئة

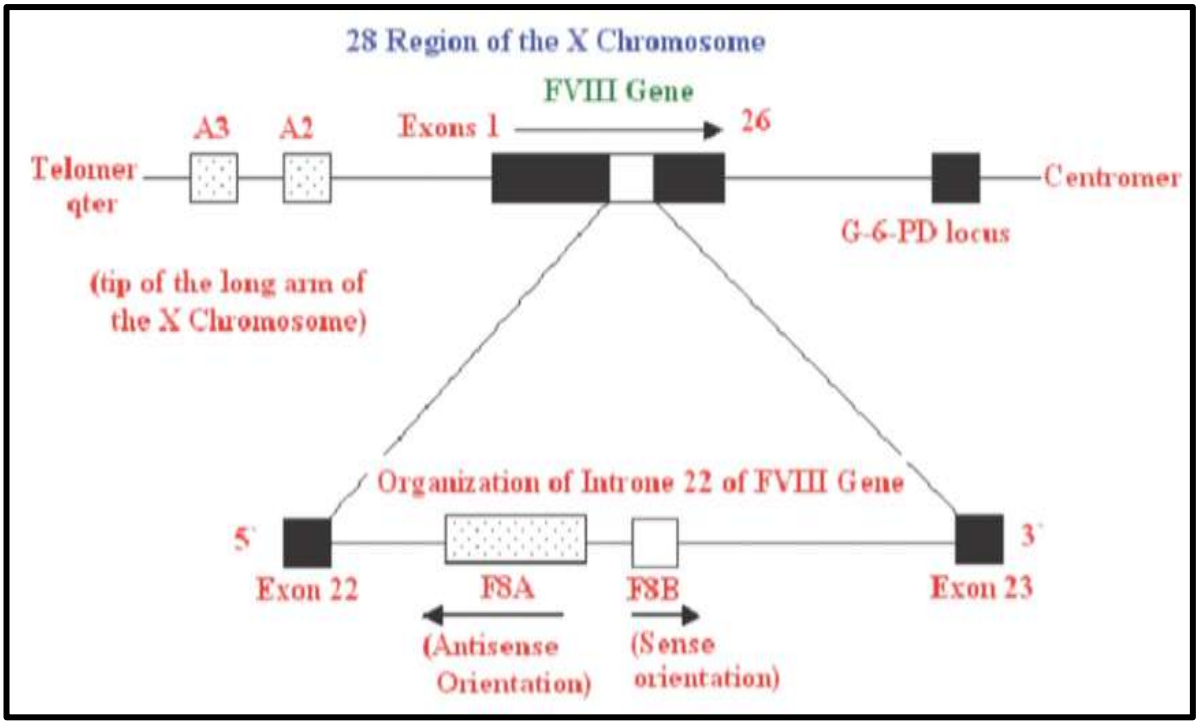
mRNAF8 ناضج يخزن في الخلايا الكبدية يتراوح طولها 9 Kb. (Lenting *et al.*,1988) وتكون هذه الجزيئة الناضجة mRNAF8 هي مصدر لنشوء البروتين المتعدد الببتايد. هذا البروتين بلازمي رابط للنحاس cerulo plasmin (Vehar *et al.*,1984)، جزيئة البروتين الإبتدائية ذات 2351 حامضاً أمينياً تتألف من جزيئة البروتين الناضج 2332 حامضاً أمينياً وفي مقدمتها قطعة ببتايد حجمها مؤلف من 19 حامضاً أمينياً لها دور في إفراز البروتين خارج الخلية (Haig *et al.*,1995). وبينت دراسة أجريت على تتابعات أنترونات جين *F8gene* أن هناك ستة أنترونات من أضخم أنترونات جين *F8gene* تتراوح طولها أكبر من 14 Kb وهذه الأنترونات هي 1,6,13,14,22,25 .والأنترون 22 من أضخم الأنترونات ذات طول 32,8 Kb (Gitschier *et al.*,1984,Lakich *et al.*,1993) .

إنَّ في داخل منطقة الأنترون 22 تتوافر منطقة غنية بتتابعات الكوانين والسايتوسين Island *CpG* (Levinson *et al.*,1990) عبارة عن حفاز يعمل بنظام ثنائي الإتجاه Bidirectional لإثنين من الجينات *F8Agene,F8Bgene* (Lakich *et al .,*1993)

تعرف Peters و Ross على وظائف حفاز *F8Agene* (Peters and Ross,2001) الذي أظهر شفرة لبروتين من نوع 40KD Huntingtin-associated protein، ويسمى (HAP40) ويشير هذا المصطلح إلى مرض Huntington disease هو إعتلال يصيب الجهاز العصبي للإنسان وسبب المرض هو وراثة سائدة متنحية (Levinson *et al* ..,1990;Tuddenham *et al.*,1994)

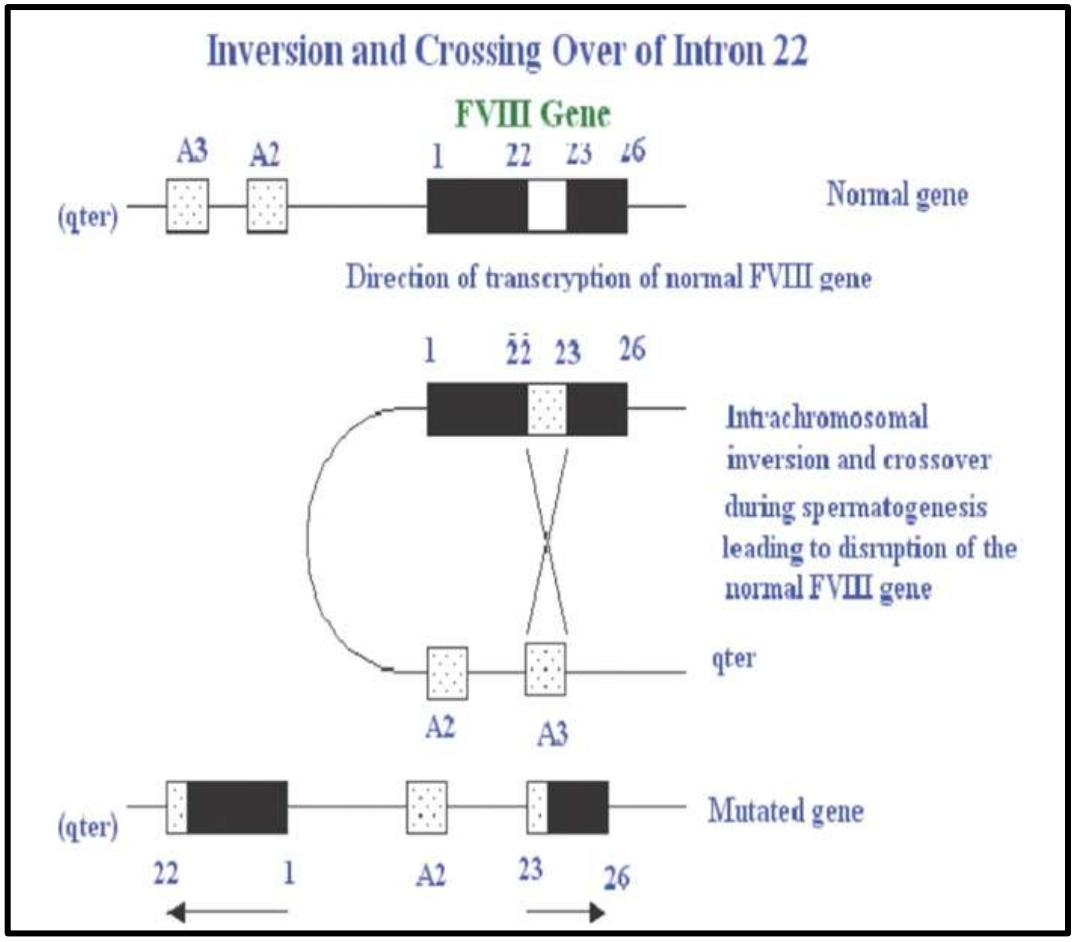
بينما حفاز جين *F8Bgene* غير معروف الوظائف (Valleix *et a l.*,1999) . ويكون بطول 2,5 Kb (Levinson *et al* .,1992). والمناطق الغنية بتتابعات الكوانين والسايتوسين التي تعدُّ من المناطق الساخنة طفورياً Hotspot ، وتشمل هذه المناطق حذوفات صغيرة أو كبيرة أو

حشر مكرر في *GC* في أثناء العبور في الأنقسام الأختزالي meiotic cross over (Ghosh *et al.*,2007)



شكل (2-5) موقع جين العامل الثامن على الذراع الطويل من كروموسوم الجنس X وتركيب الانترون 22 في المورث.

وأشار Andrikovics إن الأنترون 1 من جين العامل الثامن *F8 gene* يتألف من منطقة بطول 1041 bp ،عندها فإن عملية إعادة الأتحاد المتماثل داخل الكروموسومي بين نسخ intragenic و extragenic ينتج عنه إنقلابات بالأنترون 1,22 وكلا الأنقلابين يمنع تكون الطول الكامل لـ mRNAF8 وعندها يسبب فقدان فعالية بروتين العامل الثامن وينتج عنه حالات من هيموفيليا A الحاد ذي فعالية عامل التخثر اقل من ١٪ (Andrikovics *et al.*,2003)



شكل (2-6) طفرة الإنقلاب الأنترون 22 لجين العامل الثامن وعملية إعادة الإتحاد المتماثل.

2-9 أنواع الطفرات المسببة لمرض نزف الدم الوراثي نوع A:

تم دراسة الطفرات المسببة لنزف الدم الوراثي في مئات المرضى والواضح من خلال هذا العدد الهائل من الطفرات أن الأساس الجزيئي للمرض متنوع جداً . ومن أنواع الطفرات التي تعد من العيوب الشائعة طفرات نقطية Point mutation (Single nucleotide substitution) وتتوافر تقريباً في 90 % من المصابين (Bowen,2001). وطفرات حذف Deletions وهي ثاني عيوب الجين الشائعة وتتوافر تقريباً في 10-5 % من المصابين(Antonarakis,1995) ، بينما طفرات الانقلاب / حشر (inversion/insertion) هذه من الطفرات النادرة في مرضى

الهيموفيليا(Tuddenham and Cooper.1994). بأستثناء طفرات الأنقلاب Inversion الأنترون 22 التي تكون شائعة ومنتشرة في مرضى الهيموفيليا من النوع الحاد ، (Naylor *et al*.,1993)وتتضمن الطفرات النقطية التي تصيب مرضى الهيموفيليا :

1-طفرات Missense point mutation هذه الطفرة تغير من شفرة الحامض الأميني وتؤدي الى تكوين حامض أميني مختلف (Liu *et a*l.,2001).

2 -طفرات Nonsense point mutation هذه الطفرة تغيير من شفرة الحامض الأميني إلى شفرة توقف الترجمة translation stop codon والحصيلة هي بروتين مبتور (غير فعال).(Dietz *et a*l.,1993;Liu *et al*.,2001).

3- طفرات mRNA splice site point mutation هذه الطفرة تحدث إفساداً في موقع القطع أو الأنضاج mRNA splice، أو قد تخلق موقعاً جديداً , وتظهر في كل أنماط الهيموفيليا الثلاثة (الحاد-المعتدل – المتوسط)(Duncan and Miller.,1980;Tavassoli *et al*.,1998)

من ناحية أخرى أكد الباحثان Nishino و Mazurier أن هناك طفرات أخرى تقع خارج مورث العامل الثامن , وتؤثر على ربط العامل الثامن بالعامل vWF , هذه الطفرات التي تحدث في النهاية الأمينية من عامل فون ويلبرند (موقع ربط FVIII) وتنقص من ألفته للعامل الثامن وتسبب مرض فون ويليبرند 2N (vWD2N) (Nishino *et al*.,1989) ، وهذا المرض يمثل نقصان قيم العامل فون ويلبرند vWF و يظهر نمطاً وراثياً جسمياً , إذ أن جين عامل vWF يقع على الكروموسوم رقم 12 ؛ ولذلك يعد المرض من الهيموفيليا الكاذبة Pseud Hemophilia (Mazurier,1992) . أشار Michiels أن طفرة Missense في

جين العامل فون ويليبرند von Willebrand Factor(vWF) التي تضعف من ربط العامل vWF بالعامل الثامن , ولكن لاتضعف من تركيز vWF المتعدد الوحدات , وأنما تسبب من سرعة إزالة العامل الثامن من الدم (Michiels *et al.*,2009).

بيّن الباحث Roelse إن هناك طفرات أخرى تؤثر على إفراز العامل الثامن، إذ إن قيم مستويات العامل الثامن قد تنخفض بالدورة الدموية نتيجة الطفرات التي تضعف من إفرازه ،إذ أن الطفرة النقطية التي تحول ثمالات الأرجنين 593 الى السايتوسين .وثمالات الأسباراجين 618 الى السيرين في أي بروتين سوف تسبب تراكم العامل الثامن داخل الخلايا .وهذا التراكم وإنخفاض إفراز العامل الثامن الذي سيظهر بأي من هذه الطفرات قد يفسر إنخفاض كل من فعالية العامل الثامن وتوافر الأنتجين في بلازما المرضى المصابين بالنوع المعتدل من الهيموفيليا A (Roelse *et al.*,2000).

وبيّن Bagdanove ان هنالك طفرات في جين العامل الثامن تكون مسؤولة عن حالة المرض الحاد, وهي طفرات تنطوي على إنقلاب جزئي في الجين مع نقطة انكسار Break point في الانترون 22 من الجين وهي المسؤولة عن حوالي 40 %من حالات الهيموفيليا A الحاد (Bagdanove *et al.*,2002)، أما بقية الطفرات الناتجة من الحذوفات الكبيرة التي تشمل أكثر من 100 bp تتوافر تقريباً في 5 % من المصابين بالحالات الخطرة من المرض . (Lakich *et al.*,1993;Naylor *et al.*,1993)

جمع الباحث Antonarakis بيانات من 2,093 مصاباً بالمرض من كل المختبرات في العالم. أستنتج أن طفرة الأنقلاب منتشرة في 42 %من المصابين بـ sHA منهم 35 %مصابون

بأنقلاب inv22 type I، و 7 % مصابون بأنقلاب inv22 type II، (Antonarakis *et al*.,1995)

أشار كل من Oldenburg and Rost أن المقدار الأكبر من الطفرات هي من نصيب طفرات الأنقلاب التي يكون منشئها الخلايا الجرثومية الذكرية Male germ cells إذ تفتقر الى الصفة الثنائية الكروموسوم bivalent ،الذي قد يسهل من انقلاب النهاية التيلوميرية telomeric end في الكرموسوم المفرد ويسهل من إحداث اعادة الاتحاد المتماثل ضمن الكروموسوم (intrachromosom homologous recombination). ولذلك تكون طفرة الانقلاب منشأها بأتجاه الذكر في اثناء الانقسام الاختزالي male meiosis إذ ترتفع نسبة الانقلاب في الذكور بمقدار 1:15 مقارنةً مع الإناث في اثناء الانقسام الاختزالي female meiosis إذ تمتلك الإناث زوجين من كروموسوم X المتماثلين , وبالتالي تمنع تكوين هذه العملية (Oldenburg and Rost.,2000) .

اشار الباحث Jacquemin وجماعته ان الطفرات المسؤولة عن الهيموفيليا A بالنمطين (mild , moderate) .قد بلغت أكثر من 200 طفرة خلال 15 سنة الاخيرة ،وكل هذه الطفرات كانت تسبب أضعاف عملية انطواء جزيئة العامل الثامن، او إضعاف العمليات الخلوية, والتي سوف يتنج عنها نقصاناً في إفراز العامل الثامن، او تؤدي الى بطء في فعالية العامل الثامن بوساطة الثرومبين thrombin، وكذلك تضعف من استقرارية فعالية جزيئة العامل الثامن بالبلازما وذلك من خلال ارتباط جزيئة العامل الثامن بجزئية العامل فون وليبرند .(Jacquemin *et al*.,2003)

تعرف الباحث Guillet وجماعته على 95 طفرة جديدة مسؤولة عن HA في 515 مصاباً من 406 عوائل غير أقارب من مركز لمعالجة أشخاص مصابين بالهيموفيليا في فرنسا (Guillet *et al.*,2006). في حين وصف الباحث Repesse وجماعته عدداً كبيراً من الطفرات التي سببت مرض هيموفيليا A. منذ أن تم الأعلان عن تتابع الجين في عام 1984 وأشار أن هذا العدد الكبير من الطفرات قد وزعت على طول الجين (Repesse *et al.*,2007). وقد بيّن الباحث Mantilla-Capacho وجماعته أن سبب الهيموفيليا A الحاد طفرات انقلاب في الانترون 22 (inv 22) في 50 % من الحالات، بينما طفرات الانقلاب الانترون 1 (inv 1) سجلت في 2-3% من حالات هيموفيليا A الحاد. وقد درس كلا الانقلابين لتحديد هذه الترددات في جماعة من المصابين من المكسيك بهيموفيليا A الحاد , ووازنها مع بيانات حصل عليها من جماعات سكانية أخرى من خلال دراسته على ٤٤ مصاب من ٣١ عائلة مصابة بالمرض الحاد للكشف عن أحداث تردد الانقلاب بالانترون ٢٢ من خلال أستعماله لطريقة LD-PCR ودرس على ٩٤ مصاب من ٦٥ عائلة للكشف عن أحداث تردد أنقلاب الانترون ١ خلال أستعماله لطريقة M-PCR ومن خلال هذه البيانات وجد أن هناك ٤٥٪ حدوث تردد تكرار الانقلاب في الانترون ٢٢ ولم يجد أي نسبة عن حدوث تردد أنقلاب الانترون١ (Mantilla-Capacho *et al.*,2007) .

درس Bin Abid وجماعته نمط الطفرات في جين العامل الثامن وذلك من خلال أستخلاصه للحامض النووي الدنا لمجموعة مؤلفة من ٢٢ مصاب بالمرض غير أقارب وسجل طفرتان وصفت في الاكسون ٤ و٢٣ من الجين والتي كانت مكتشفة فيما قبل على قاعدة بيانات (WWW.HAMSTeRs) أذأن الطفرة التي تحول الارجنين الى الهستدين CGC ⟸ CAC

والطفرة التي تحدث في الاكسون ٤ التي تغير بنيوكلوتيدة واحدة TTC ⟸ TTT سجلت على أنها طفرة صامتة وهي شفرة الحامض الاميني الفنيل الانين التي لاتوثر على تركيب البروتين ووظائفه والتي سببت الهيموفيليا A في سكان الباكستان من خلال دراستهم على 22 مصاباً غير اقارب وركزوا على 6 مناطق مشفرة من الاكسونات (4,8,11,18,23,24). وقد أختاروا هذه الأكسونات بوصفها ذات حجوم اصغر ومعدل تطفيري عالٍ Bin Abid *et al*.,2007).

سجلت الباحثة(Rossetti et al.,2007) 16 طفرة صغيرة جديدة في جين العامل الثامن من نوع إعادة الترتيب Rearrangements .في دراستهم على 80 عائلة مصابة بالمرض من النوع الحاد في الأرجنتين. إذ وجدوا إن طفرة الإنقلاب شكلت 46 % (37طفرة) ، وطفرات (large deletion) فقد شكلت 13 % (10 طفرات)، وطفرات (small deletion) 16 % (13طفرة) وطفرات (nonsense) بنسبة 9 % (7طفرات) وطفرات missense 10 % (8طفرات). وقد تمكنوا من تمييز الطفرات المسببة للمرض في 76 عائلة (95% من العوائل) (Rossetti *et al*.,2007).

سجل الباحث Bao-lai وجماعته توزيع الطفرات في *FVIII gene* العامل الثامن في 18 مصاب بالهيموفيليا غير أقارب في الصين .إذ وجدوا أن هناك عدداً كبيراً من الطفرات تسبب حالات الهيموفيليا A كانت غير معروفة ومن هذه الطفرات الشائعة هي طفرة إنقلاب الأنترون 22 و1من الجين التي تحدث في (40–50%) بالنسبة لـ(Inv22) و(5 %)بالنسبة لـ(Inv1) من المصابين بالمرض الحادعلى التوالي (Bao-lai *et al*.,2010).

درس Awidi وجماعته طفرات *FVIII gene* في مصابين الهيموفيليا A في الأردن .وشملت الدراسة 75 مصاباً بهيموفيليا A من 42 عائلة غير أقارب ومن بين هؤلاء المصابين كان هناك 67% يعانون المرض الحاد و26%يعانون المرض المتوسط و7%يعانون المرض الخفيف وكان من ضمن الطفرات الشائعة هي طفرة إنقلاب الأنترون 22 و1 من مورث العامل الثامن بنسبة 52 و29 % من العوائل على التوالي (Awidi *et al*.,2010).

قام Chen وجماعته بتحليل طفرات جين العامل الثامن في جماعة من المصابين بـHA في تايوان قادت الى إكتشاف 21 طفرة جديدة من خلال فحصه 115من المصابين من 91 عائلة مصابة غير أقارب .إذ وجدوا 79 منهم كانوا مصابين بالنمط الحاد ،و15منهم مصابين بالنمط المعتدل و21مصابين بالنمط الخفيف ، وسجل إنقلاب الأنترون 22 بنسبة 27,8 % بينما إنقلاب الأنترون 1 بنسبة 7,6 % من المصابين بالنمط الحاد (Chen *et al*.,2010).

2-10 طرائق الكشف عن طفرات مرض نزف الدم الوراثي نوع A :

من الطرائق المستعملة بالكشف عن الطفرات المسببة للمرض هو طريقة تحليل التتابع المباشر .وأثبت أن هكذا تحليل من تضخيم جينيوم DNA يكون قوي وفعال , ولكنه يحتاج الى عمل كثيف ومركز للتعرف على الطفرات في جين كبير مثل جين العامل الثامن بالإنسان (Higuchi . *et al*.,1990)

أكد الباحث Korkoo وجماعته أن من التقنيات المتوافرة حالياً لغربلة نواتج PCR هي Single-Strand Conformation Polymorphism(SSCp) هي من الطرائق المستعملة , وعادة يعطي هكذا نوع من الطرائق نتائج غير موثوقة، بينما تقنية Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE) قد تميزت بالحساسية العالية ،أما تقنية Conformation

Sensitive Gel Electrophoresis(CSGE) التي اصبحت من الطرائق المتقدمة عن الطرائق الأخرى التي تغربل منتجات PCR وتميزت بأنها طريقة بسيطة ولايستعمل فيها النشاط الأشعاعي (Korkoo *et al.*,1998).

أعتمد التحليل الذي قام به فرسكوني وجماعته على تقنية PCR وطريقة الترحيل الكهربائي الحساس للهيأة Conformation Sensitive Gel electrophoresis(CSGE) وطريقة كروموتوغرافي السائل العالي الأداء Denaturing High Performance Liquid Chromotography (DHPLC) وكانت خطوته الأولى في هذه الدراسة هو غربلة الأنقلاب بأستخدام طريقة Long PCR وتميزت بأنها طريقة موثوقة ،وتعطي نتائج سريعة. اما بالنسبة الى طرائق غربلة الطفرات ومنها طرائق CSGE , تميزت بانها طريقة اكثر حداثة ،وطريقة DHPLC هي سريعة وذات درجة عالية من الحساسية بالكشف عن الطفرة بنسبة 96-98% وسمحت بالكشف عن نوعين من الطفرات لم يتم الكشف عنها بتقنية CSGE (Frusconi *et al.*,2002).

وكانت هناك ثلاث طرائق لكشف النمط الوراثي Genotyping سمحت بتحليل إنقلاب الأنترون 22 (inv22) وهذه الطرق هي :-

أولاً:-طريقة تحليل وصمة سوذرن Southren Blot التي تعدّ بمثابة القاعدة الذهبية لنتائج البحوث المبكرة عن أنقلابات الأنترون 22 . وأول ماوصفت من قبل الباحث Lakich وجماعته وماتزال تعدّ المرجع المنهجي في الكشف عن أنقلاب الأنترون22 (Inv22) (Lakich *et al.,*1993)، ومن ميزات هذه الطريقة أنها تحتوي على كل أنماط الأشارات والمتضمنة أشارة أليل الطراز البري normal –type التي لايرافقها إنقلاب Int22، وأليل

الذي يحمل إنقلاب البعيد Int22-1 ، وأليل الذي يحمل إنقلاب القريب Int22-2. ومن ميزاتها الأخرى أنها تقنية قوية وممكن أن تترافق مع كل أنواع الأنقلابات .ومن مساوئها أنها تقنية تتطلب عملاً كثيفاً وجهداً يتراوح من 8-10أيام ، فضلاً عن المخاطر الأشعاعية للمواد الكيمياوية المستعملة (Oldenburg *et al*.,2000).

ثانياً:-طريقة تحليل LD-PCR أبتكر Steven Sommer من الولايات المتحدة تحليل PCR بإنبوب مفرد الذي يتضمن بداخله إتحادات PCR مع LD-PCR لأنجاز التشخيص الوراثي لأنقلاب الأنترون22 (inv22) المسبب لمرض HA (Liu *et al*.,1997). هذه الطريقة الجديدة كانت طريقة بسيطة، سريعة ،ونسبياً غير مكلفة لذلك أصبحت هذه الطريقة هي الخيار البديل في العديد من المختبرات. والأنقلاب كشف بوساطة الأنجاز المباشر لطريقة LD-PCR لجينيوم DNA مع أربعة من البرايمرات المختلفة وهي برايمر A,B تحيط بمكررات int22h-2 وint22h-3 وبرايمر P، Q تحيط بمكرر int22h-1 الذي موقعه بداخل جين العامل الثامن .والتفاعل أنجز في أنبوب مفرد مع أربعة تفاعلات فصل من LD-PCR لكل من أزواج البرايمرات AB,AQ,PB,PQ وبعدها النتائج تفسر حالاً بوساطة الترحيل الكهربائي بالأكاروز القياسي.

ثالثاً:- طريقة تغير نواتج تفاعل بلمرة السلسلة المقلوب Inverse Shifting - PCR

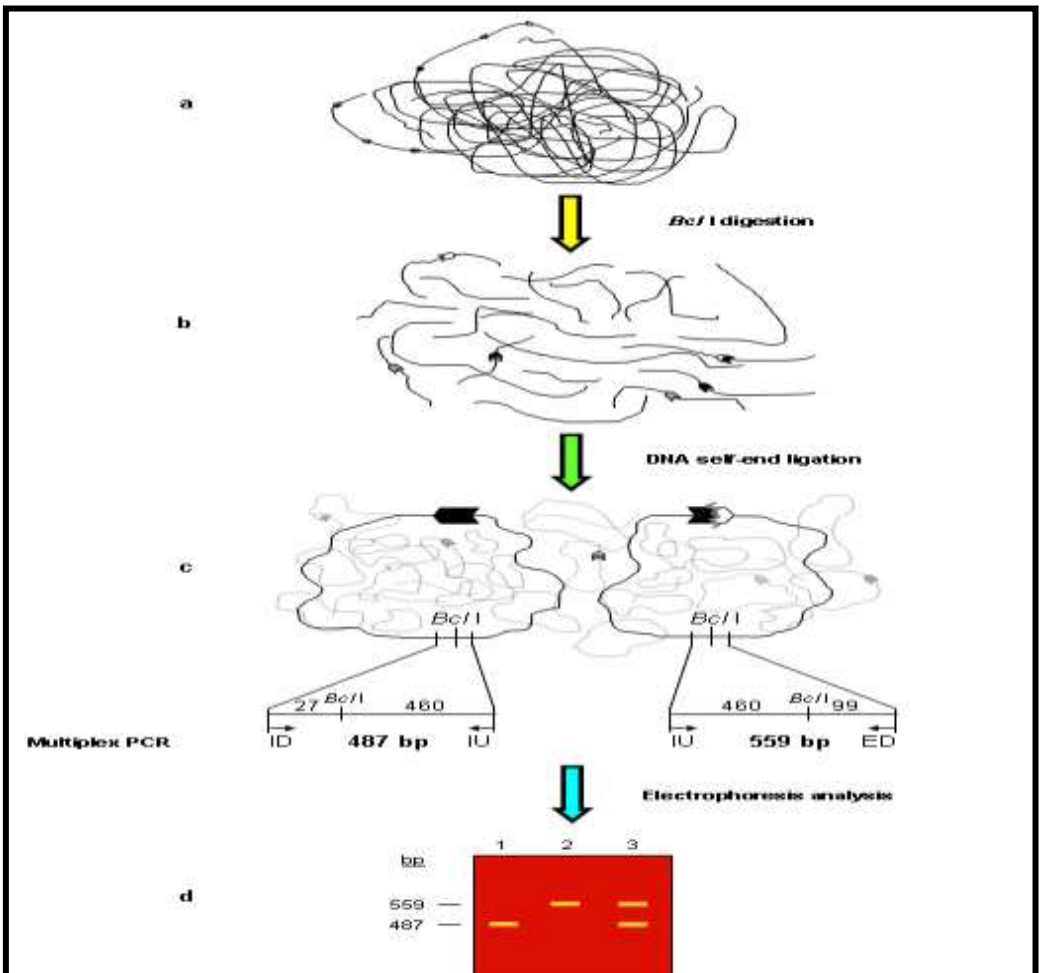
إذ صممت الباحثة (Rossetti *et al*.,2005) طريقة لكشف الطراز الوراثي للأنترون 22 المبني على التنوع بطريقة Inverse-PCR المصممة بوساطة (Ochman *et al*.,1988) وسميت بطريقة inverse Shifting –PCR, وأستخدمت هذه الطريقة لمضاعفة قطعة دنا غير معروفة (لايتوافر لها بادئ متخصص) مرتبطة بأحد طرفي تتابع دنا معروفة,

وتتضمن العملية الهضم بأنزيم التقييد للحصول على قطع تقييد تتضمن تتابعات المعروفة والقطع غير المعروفة المرتبطة بها , ثم تحول قطع التقييد هذه الى الشكل الحلقي من خلال الإلتحام الذاتي لطرفي القطعة ثم تستخدم الدنا الحلقية الناتجة قالب في تفاعل بلمرة سلسلة PCR ليتم خلالها إكثار القطعة غير المعلومة بإستخدام زوج من البوادئ المتخصصة بالإرتباط الى التتابع المعروف لكن التضاعف يكون ضمن إتجاهين متعاكسين ، وتشمل هذه الطريقة ثلاث خطوات موضحة بالشكل 2-7:

1- يهضم جينيوم DNA بواسطة أنزيم التقييد *Bcl* 1 ويسمح لقطع التقييد أن تتحول الى حلقات بإستخدام الأنزيم اللاحم DNA Ligase.

2- يتم تحليل الحلقات الناتجة بوساطة تحليل PCR القياسي وباستخدام بادئات خاصة متعاكسة الإتجاه .

3- يتم فصل منتجات تحليل PCR القياسي بوساطة الترحيل الكهربائي التقليدي.



شكل (2-7) طريقة تغير نواتج تفاعل البلمرة المقلوب IS-PCR .

(2-11) التشخيص ماقبل الولادي لمرض نزف الدم الوراثي Prenatal diagnosis in Haemophilia A:

مع حلول تقنيات البايولوجي الجزيئي يصبح التشخيص ماقبل الولادي لمصابين الهيموفيليا A ممكناً , وينجز هذا الفحص بوساطة أخذ عينات من Chorionic Villus Sampling (CVS)، أو من السائل الأمنيوني Aminio Synthesis (AMS) .وتعد عملية أخذ العينة من CVS طريقة إجتياحية Invasive ويعرض الآم الحامل الى مخاطر فقدان الجنين بنسبة 2-1 % , ويتم هذا التشخيص بوساطة

فريق متمرس وينجز الفحص CVS خلال الأشهر الثلاثة الأولى من الحمل First trimester أي في الأسابيع 10th-13th من الحمل. بينما يتم الفحص المعتمد على AMC خلال الأسابيع 15th-16th من الحمل، ثم بعدها يتم تحليل DNA بأستعمال الطريقة غير المباشرة indirect لتتبع إقتفاء أثر الجين وذلك من خلال أستعمال علامات متعددة الأشكال متنوعة Various polymorphic markers لجينات العامل الثامن والتاسع , والتي تستعمل لأقتفاء أثر الجين الطافر Mutant gene خلال العوائل، وتجنب اللجوء الى الطريقة المباشرة Direct بالكشف عن الطفرة في مرضى الهيموفيليا بسبب كبر حجم جين العامل الثامن (Shetty *et al*.,2003) , وقد أجرى الباحث Habart وجماعته التشخيص ماقبل الولادي في عوائل المصابة بـهيموفيليا A في الثلاثة الشهور الثانية من الحمل second trimester بوساطة قياس كل من فعالية العامل الثامن FVIII:C وأنتجين العامل الثامن FVIII:Ag من عينات دم الأجنة (Habart *et al*.,2005).

٣. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1 الاجهزة

3-1-1 الاجهزة والمستلزمات المختبرية :

استعملت الاجهزة والمستلزمات المختبرية المدرجة أسماؤها ومناشئها في الجدول أدناه

الجدول (3-1) الاجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة خلال الدراسة :

ت	الجهاز	الشركة المصنعة
١	Damon	Turkey
٢	DeepFreeze -20	Helmar
٣	Digital Camera	Sony
٤	EDTA Tube 2.5ml	Japans
٥	Electrophoresis	Bioneer
٦	Eppendrof rack tube	Bioneer
٧	Eppindrof tube	Eppindrof
٨	Graduated pipettes 200-1000 microliter	Chance proper Ltd(K.U)
٩	Graduated pipettes 2-20 microliter	Chance proper Ltd(K.U)

Chanc proper Ltd(K.U)	Graduated pipettes 20-200micro liter	١٠
Germany	LAB-Line _Incubator	١١
Japans	Medical syringes Nbivh	١٢
Germany	Memmert	١٣
Germany	Microfuge 18 Centrifuge	١٤
Bioneer	Micropipette	١٥
Mecacys	Nanodrope	١٦
Barnstead interational	oven	١٧
Bioneer	PCR Thermo cycler Global Genomics Partner My Genie 32 Thermal Block	١٨
Japans	Plain tube 10ml	١٩
Bioneer	Pipette tips blue	٢٠
Bioneer	Pipette tips yellow	٢١
Hitachi	Refrigerator	٢٢
Sartorius	Sensitive balance	٢٣
J Iasssco	Volumetric Flask	٢٤
Germany	Vortex	٢٥

٢٦	Wise-UV	Bioneer

3-1-2 المواد الكيميائية والمحاليل:

استعملت المواد الكيميائية والمحاليل المدرجة أسماؤها ومناشئها في الجدول أدناه

الجدول (3-٢) المواد الكيميائية والمحاليل المستخدمة خلال الدراسة :

ت	المادة الكيميائية	الشركة المصنعة
١	Absolute ethanol	BDH Chemical Ltd
٢	Accu Power PCR premix	Bioneer
٣	Accu Rapid DNA Ligase from T4 Bacteriophage	Bioneer
٤	2xAccu Rapid DNA Ligation Buffer	Bioneer
٥	Agarose	Bioneer
٦	(aPPT reagent)	Biomerieux
٧	Bacillus caldolyticus *BcLI* 10xBufferG	Thermoscientific
٨	Calcium Chloride	Fluka
٩	Deionized Distilled water	Bioneer

١٠	DNA Leader	Bioneer
١١	Bromide Alathidiom	Bioneer
١٢	FVIII reagent (STAGO deficient)	STAGO
١٣	Gel/PCR DNA fragment Extraction Kit	Geneaid
١٤	Genomic DNA Minikit (Blood/ Cultured Cell)	Geneaid
١٥	Lodding Dye	Bioneer
١٦	Primers	Bioneer
١٧	PTT reagent	Biomerieux
١٨	TBE buffer Tris – Boriad EDTA	Bioneer
١٩	Tri-sodium citrate	BDH

3-1-3 العدد التشخيصية المختبرية:

استعملت العدد التشخيصية المختبرية المدرجة أسماؤها ومناشئها في الجدول أدناه :

الجدول (3-٣) العدد التشخيصية المستخدمة خلال الدراسة :

ت	المكونات	تفاعل ٢٠ مايكروليتر

	Collection tube 2ml	١
250uM	Each:dNTP(dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	٢
	Elution Buffer	٣
	GB Buffer	٤
	GD Column	٥
	GT Buffer	٦
30Mm	KCL	٧
1.5Mm	MgCL2	٨
	RBC Lysis Buffer	٩
1U	Top DNA polymerase	١٠

١١	Tris-HCL(PH9.0)	10mM
١٢	W1 Buffer	
١٣	Wash Buffer (Added ethanol)	

3-2 طرائق العمل Methods :-

3-2-1 تحضير المحاليل :-

3-2-1-A :-محلول كلوريد الكالسيوم: حضر هذا المحلول بإذابة 0.27غم من كلوريد الكالسيوم في 100 مليلتر من الماء المقطر (Dacie and Lewis,2002).

3-2-1-B :-كاشف الثرمبوبلاستين الجزئي:هذا الكاشف هو جزء من الكت المستحضر من عامل الأنسجة Tissue Facror و الفوسفولبيد المأخوذ من دماغ الأرنب (Dacie and Lewis,2002).

3-3 الأشخاص Subjects:- أجريت الدراسة على 44 مريضاً مصاباً من الذكور بنزف الدم الوراثي نوع A , من مركز أمراض الدم في مستشفى البتول التعليمي بمدينة بعقوبة بواقع 15 مصاب، ومن ردهة الأمراض النزفية الوراثية في مستشفى حماية الطفل بدار التمريض

الخاص بمدينة الطب بمحافظة بغداد بواقع 29مصاب تراوحت أعمارهم بين 1-55 سنة للمدة من كانون الثاني 2012 ولغاية نيسان 2012 .

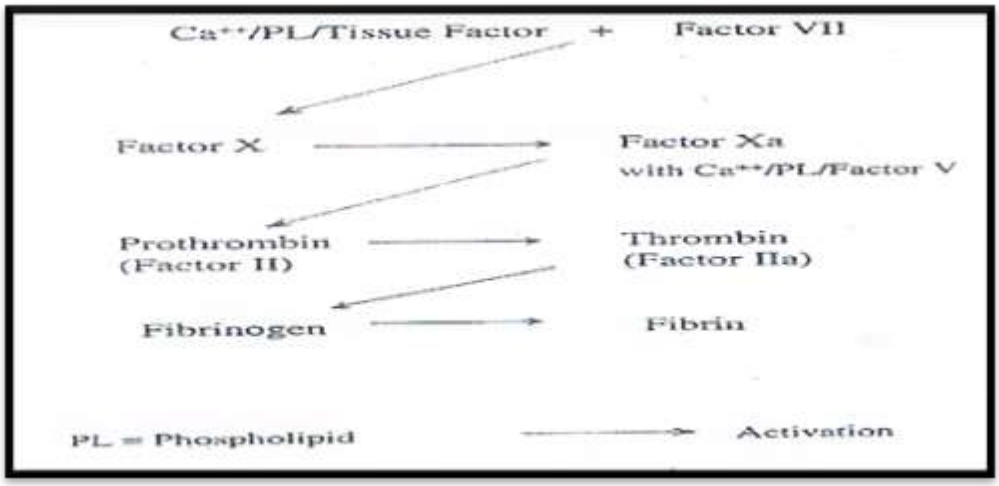
3-3-1 جمع العينات :

تم سحب 5 مليلتر من الدم الوريدي من المرضى المصابين بنزف الدم الوراثي نوع A بوساطة محاقن نبيذة قبل أعطائهم العلاج , وقسم النموذج الى جزئين، وضع 2.5مليلتر من الدم في إنبوبة إختبار أضيف لها 0.2 مليلتر من سترات الصوديوم Tri-sodium citrat المانعة للتخثر. وعرضت للطرد المركزي بسرعة 1000 دورة/ دقيقة ولمدة 10 دقائق لفصل البلازما عن باقي مكونات الدم الأخرى، ثم نقلت البلازما الى أنابيب نظيفة لغرض تقدير زمن البروثرومبين (PT) وزمن الثرمبوبلاستين الجزئي (PTT) وفعالية عامل تخثر الدم الثامن (FVIII) وتم هذا الفحص في مختبر ردهة الأمراض النزفية الوراثية في مستشفى حماية الطفل بمدينة الطب . ووضع بقية نموذج الدم 2.5 مليلتر في أنابيب نبيذة حاوية على مانع تخثر EDTA لغرض إجراء إستخلاص الحامض النووي الدنا منه وتم هذا الأستخلاص في مختبر علم الحيوان في كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة ديالى .

3-4 الفحوصات المختبرية:-

3-4-1 تقدير زمن فعالية البروثرومبين PT (Prothrombin time):- تم أتباع الطريقة السريعة (Quick Method) الموصوفة من قبل الباحث Talib لحساب زمن البروثرومبين (Talib,1996) وأجري الإختبار كالاتي : وضع 0.1 مليلتر من بلازما في أنبوبة إختبار معقمة وجافة مثبتة في حمام مائي وبدرجة 37 مْ بوساطةحامل الأنابيب Tube rake

ولمدة 10 دقائق ،وبعدها تم إضافة 0.2 مليلتر من كاشف الثرومبوبلاستين المسخن مسبقاً بدرجة حرارة 37مْ المزج بالرج الخفيف وسجل الوقت اللازم لظهور الخثرة بالثانية . وقت ظهور الخثرة للمكرر يجب أن لايختلف بما يزيد عن 10 % .



الشكل (3-1) المسار الذي يتم فحصه بإختبار زمن تخثر البروثرومبين .

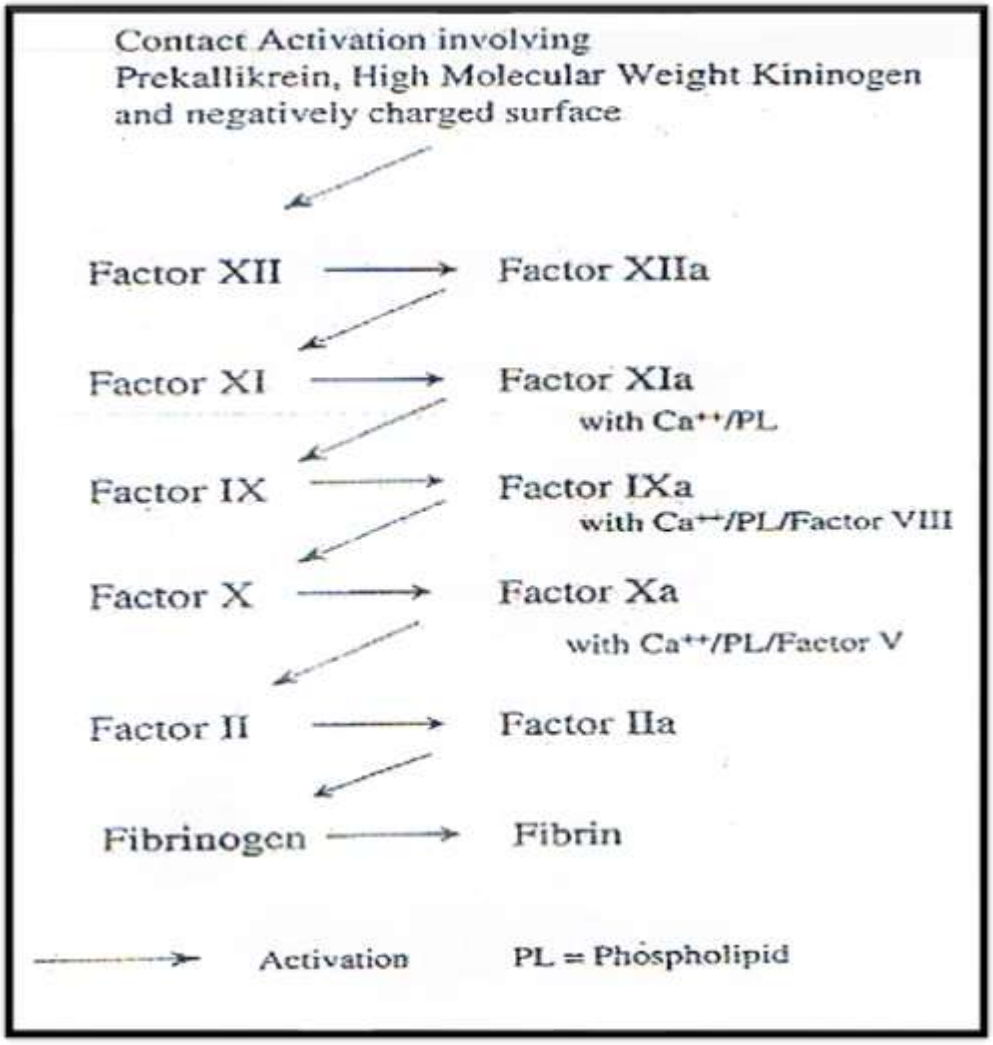
2-4-3 تقدير زمن فعالية الثرومبوبلاستين الجزئي activated Partial thromboplastin time aPTT:- تم إتباع الطريقة الموصوفة من قبل الباحثين Dacie وLewis لحساب زمن فعالية الثرومبوبلاستين الجزئي aPTT (Dacie & Lewis ,2002) وأجري الإختبار بمكررين كالآتي :

1 – وضع 0.1 مليلتر من كاشف السيفاليت (APTT reagent) في إنبوبتي أختبار زجاجيتين خاصة بإختبار التخثر (75x10 mm) مسخنة الى 37مْ ,أضيف للإنبوبة الأولى 0.1 مليلتر من البلازما القياسية Control Plasma ,مع تشغيل ساعة التوقيت الرئيسة .يعقبها إضافة البلازما القياسية الى الإنبوبة الثانية ونمزج. تترك الإنبوبتان في الحمام المائي على درجة 37مْ لمدة 3 دقائق . عندها يضاف 0.1 مليلتر من محلول كلوريد الكالسيوم المسخن بدرجة 37مْ

الى كل إنبوبة بالتعاقب وتمزج ,مع تشغيل ساعة قياس جديدة لكل إنبوبة ويسجل وقت تكون الخثرة بالثانية

2 – تعاد الخطوات نفسها من الأختبار في الفقرة (1) أعلاه, ويستخدم فيها البلازما قيد الإختبار بدلاً من البلازما القياسية .ويسجل وقت تكون الخثرة بالثانية , زيادة زمن aPTT للبلازما قيد الإختبار (مقارنة بالبلازما القياسية) مع قيمة طبيعية لزمن البروثرومبين (PT) يؤشر إحتمال نقص بالعوامل VIII,IX,XI,XII والكاينينوجين ذي الوزن الجزئي العالي (High molecular weight kininogen) والبريكاليكرين Prekallikrein أو إحتمال توافر مثبط لأحد العوامل.

3 – عند تسجيل زيادة زمن aPTT يتم إجراء إختبار قياس مقدار التصحيح , وذلك بعمل خليط متساوٍ , جزء واحد من البلازما القياسية مع جزء واحد من البلازما قيد الإختبار (50:50) وإعادة الإختبار أعلاه , فإذا كان مقدار التصحيح في زمن تكون الخثرة أكثر من نصف قيمة الفرق بين زمن التخثر للبلازما القياسية والمختبرة يدل على توافر نقص في أحدعوامل التخثر . فإذا كان التصحيح قليلاً دلَّ على توافر مثبط لأحد عوامل التخثر.



الشكل (3-2) المسار الذي يتم فحصه بإختبار زمن تخثر الثرومبوبلاستين الجزئي .

(Activated Partial Thromboplastin Time).

3-4-3 تقدير فعالية العامل الثامن FVIII :

تم تقدير فعالية العامل الثامن بحسب الطريقة الموصوفة من قبل الباحثين Dacie وLewis لحساب فعالية العامل الثامن ذات المرحلة الواحدة المستندة على حساب زمن الـ aPTT (Dacie and Lewis,2002) في هذه الطريقة يتم تقدير فعالية العامل الثامن من خلال الموازنة بين قابلية تخافيف محلول البلازما القياسي ,وتخافيف البلازما قيد الإختبار على تصحيح قيمة زمن aPTT للبلازما الخالية تماماً من العامل الثامن . إستخدمت الكواشف

والمحاليل المجهزة مع عدة تقدير فعالية العامل الثامن (STAGO France) وتم التقدير كالآتي:

1 – حُضر التخفيف 1/10 من البلازما القياسية والبلازما قيد الإختبار بأستخدام المحلول المتعادل (Owrens buffer Saline) (OBS) في أنابيب بلاستيكية (في حالة توقع مستوى منخفض جداً للعامل الثامن في البلازما قيد الأختبار يتم البدء بالتخفيف 1/5).

2 – بالحجم 0.2 مليلتر من البلازما قيد الإختبار والبلازما القياسية حُضر تخافيف الضعف بأستخدام المحلول المتعادل (OBS) من 1/10 الى 1/20 و 1/40 في أنابيب بلاستيكية .وتمزج جيداً وتحفظ في الحمام الثلجي (هذه الخطوة ضرورية في حالة عدم التقدير مباشرة بعد التحضير او إذا كانت درجة حرارة المختبر اعلى من 25 مْ وذلك لتلف العامل الثامن).

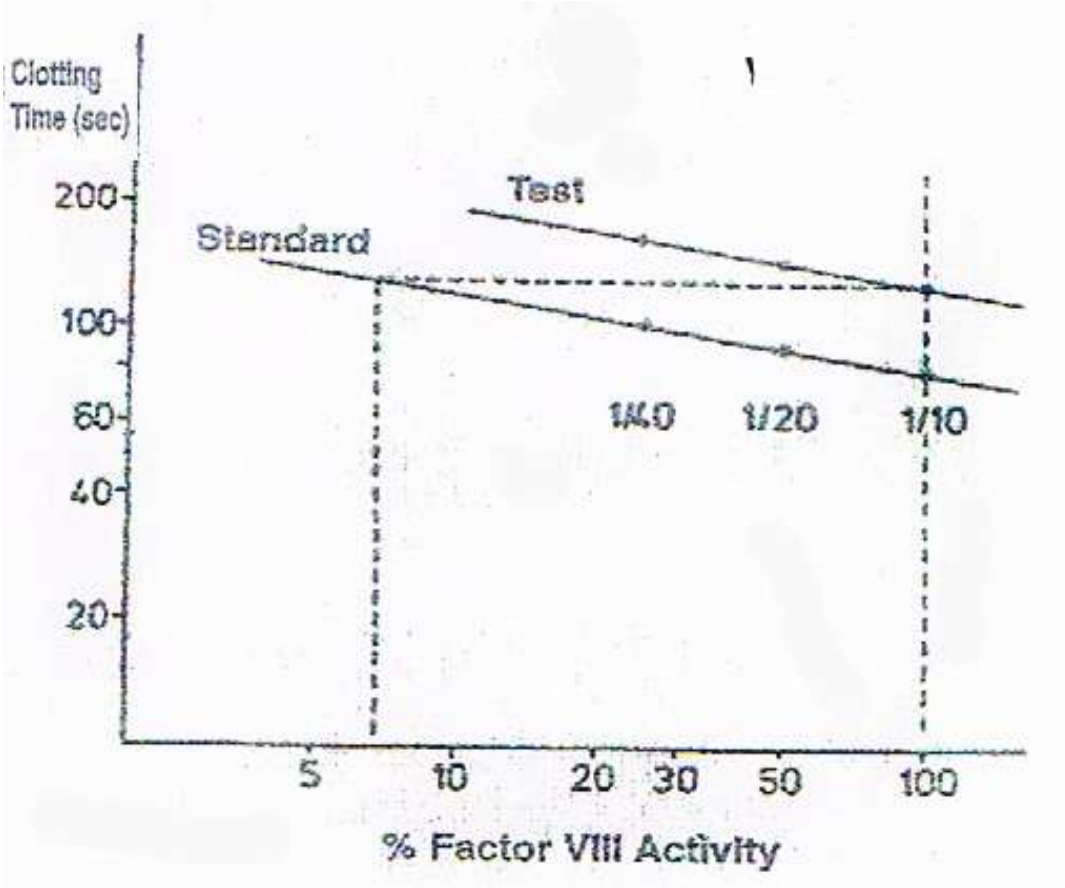
٣–أضيف من كل تخفيف من البلازما قيد الإختبار والقياسية 0.1 مليلتر في إنبوبة زجاجية (75x10mm) وأضيف لكل إنبوب 0.1 مليلتر من البلازما الخالية من العامل الثامن (Factor VIII deficient) وينقل الى الحمام المائي على درجة 37 مْ .

4 – أضيف لكل إنبوبة 0.1 مليلتر من كاشف aPTT وتترك في الحمام المائي لمدة 5 دقائق ، عند الدقيقة الخامسة أضفنا 0.1 مليلتر من محلول كلوريد الكالسيوم وسجل الوقت اللازم للتخثر لكل تخفيف.

5 –حُضر مع التخافيف أعلاه إنبوبة وتتضمن 0.1 مليلتر من محلول (OBS) و0.1 مليلتر من بلازما خالية من العامل الثامن و0.1 مليلتر من كاشف aPTT و0.1 مليلتر من محلول

كلوريد الكالسيوم . وزمن التخثر للمحلول يجب أن يكون أطول من زمن التخثر عند توافر 1% فعالية من العامل الثامن FVIII المسجلة في المنحنى القياسي.

6 – يرسم لوغارتم ناتج من (التركيز مقابل زمن التخثر) للمنحنى القياسي ويعتمد التخفيف 1/10 بوصفه الفعالية 100 % والتخفيف 1/20 بوصفه الفعالية 50 % والتخفيف 1/40 بوصفه الفعالية 25 % . ويتم الحصول على خطين متوازيين للبلازما قيد الإختبار والقياس كما موضح بالشكل(3– 3) .



شكل (3–3) المنحني القياسي لحساب فعالية العامل الثامن للتخثر%.

حيث يلاحظ أن العينة المختبرة تمتلك فعالية 7 % من العينة القياسية فإذا كانت البلازما القاسية تحتوي 485 / dl من فعالية العامل الثامن فإن البلازما المختبرة تحتوي 0.07xdl/485 =46/dl فعالية).

3-5 إستخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (الدنا) (DNA Extraction)

تم إستخلاص الدنا DNA من عينة الدم البالغة 2.5 مليلتر خلال بضع ساعات من سحب الدم (Fresh blood) بأستخدام عدة إستخلاص الدنا الجينومي المجهزة من شركة (Geneaid Korea)) , وتفصيل عملية الإستخلاص بحسب طريقة العمل المرفقة مع العدة كالآتي :

الخطوة الأولى :-تحلل خلايا الدم الحمراء

أخذ 300 مايكروليتر من الدم الكامل في أنابيب إبندروف بحجم 1.5ml , وأضيف لها ٣ أضعاف حجمها أي بمقدار 900 مايكروليتر من محلول دارئ تحلل خلايا الدم الحمر RBC Lysisالمجهز مع العدة, PH للدارئ = ٧ ومزج بوساطة القلب اليدوي الهادئ (عدم إستخدام المازج الميكانيكي) لغرض تحلل خلايا الدم الحمر , وترك لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة 25 مْ ,ثم فصل الخليط بجهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق عند سرعة 3000 xg إذ أزيل الطافي بالكامل, ثم أعيد تعليق راسب الخلايا بكمية 100مايكروليتر من دارئ تحلل الخلايا الحمر .

الخطوة الثانية :-تحلل الخلايا

أضيف الى عالق الخلايا المتحصل عليه بالخطوة الأولى 200مايكروليتر من محلول GB buffer المجهز مع العدة , و مزج الخليط بالرج الشديد بجهاز المازج الميكانيكي vortex .ثم حضن الخليط في درجة حرارة 65-70 مْ لمدة 10 دقائق أو لحين زوال عكورة الخلايا المنحلة مع التقليب مرات عدة كل 3 دقائق .

الخطوة الثالثة:- إرتباط الدنا DNA Binding

1- يضاف 200مايكروليتر من الإيثانول المطلق Absolute ethanol الى العينة المنحلة في الخطوة الثانية ويمزج بالرج الشديد بجهاز المازج الميكانيكي وفي حالة ظهور راسب يتم تكسيره بالسحب المتكرر بالماصة الدقيقة .

2- يركب أنبوب GD column داخل أنبوب الجمع collection tube المجهزين مع العدة التشخيصية . وينقل كامل المزيج (مع الراسب إن وجد) الناتج من الفقرة (1) أعلاه الى أنبوب GD column، ثم طرد بجهاز الطرد المركزي على سرعة 16.000-14.000 xg لمدة 5 دقائق ،وتم التخلص من الراشح المتجمع في أنبوبة الجمع.

الخطوة الرابعة :-الغسل Washing

1- أضيف 400 مايكروليتر من محلول دارئ الغسل(W1 buffer) المجهز مع العدة الى أنبوب GD column . وطرد بجهاز الطرد المركزي عند سرعة 16-14.000 xg لمدة 30 ثانية ،وتم بعدها التخلص من السائل المتجمع بأنبوب الجمع collection tube ويعاد أنبوب GD column الى موضعه في أنبوب الجمع مرة ثانية و يضاف له 600 مايكروليتر من محلول الغسل Wash bufferالمجهز مع العدة , وبعدها طرد بجهاز

الطرد المركزي عند سرعة 14.000 xg–16لمدة 30 ثانية , بعدها تم التخلص من السائل المتجمع في إنبوب الجمع , وأعيد إنبوب GD column الى موضعه في إنبوب الجمع مرة ثانية

2 – لتجفيف مادة (matrix) إنبوب GD column التي إرتبط بها الدنا طردنا مرة أخرى لمدة 3 دقائق عند سرعة 14.000 xg-16 ونقل بعدها إنبوب GD column الجاف الى إنبوب إبندروف جديد بحجم 1.5 ml

الخطوة الخامسة :-إسترداد الدنا DNA Elution:

حجم محلول الإسترداد القياسي لإسترداد الدنا المرتبط مع مادة عمود GD column 100 مايكروليتر ، خفض الى 50 مايكروليتر في حالة صغر حجم العينة المتوفرة لضمان الحصول على التركيز المناسب للدنا. وفي حالة الحاجة للحصول على كمية أكبر من الدنا المستردة يتم إستخدام 200 مايكروليتر من محلول الإسترداد, يضاف 100مايكروليتر من محلول الإسترداد Elution Buffer المسخن مسبقاً في الحمام المائي على درجة حرارة ٧٠ مْ الى إنبوب GD column ويترك لمدة 3–5 دقائق حتى يتم إمتصاص محلول الإسترداد من قبل شعيرات قالب العمود .ثم طردنا على سرعة 14.000 xg-16 لمدة 30 ثانية لإسترداد الحامض النووي منقوص الاوكسجين الدنا المستخلص في إنبوب الإبندروف .

3–6 قياس تركيز ونقاوة عينة الدنا DNA:

إستخدم جهاز القطرة النانوية Nanodrop (Mecacys;Korea) لتقدير تركيز ونقاوة الدنا المستخلص إذ تم وضع 4 مايكروليتر من العينة على عدسة الجهاز الذي يقيس الإمتصاصية عند الطول الموجي 260 نانوميتر والطول الموجي280 نانوميتر ، وبين النتائج بشكل رقمي.



شكل (3-4) إستخدام جهاز النانودروب Nanodrop.

3-7التنميط الوراثي للمنطقة البينية 1 (Intron 1)والمنطقة البينية 22 (Intron22)من مورث العامل الثامن Genotyping of Factor VIII gene :-

إستخدمت طريقة تغير نواتج تفاعل البلمرة المقلوب Inverse Shifting Polymerase Chain reaction (IS-PCR) للكشف عن أحداث الإنقلاب Inversion والحذف Deletion و التضاعف Duplication في المنطقة البينية 1 و22 من مورث العامل الثامن الموصوفة من قبل الباحثة (Rossetti *et al*.,2008) مع بعض التحويرات بالطريقة إذ يستخدم تفاعل البلمرة المقلوب لمضاعفة قطعة دنا غير معروفة (لايتوافر لدينا بادئ متخصص لها) مرتبطة بأحد طرفي تتابع دنا معروفة . وتتضمن العملية الهضم بالأنزيم القاطع للحصول على

قطع تقييد تتضمن التتابعات المعروفة والقطعة غير المعروفة المرتبطة بها ، ثم تحول قطع التقييد هذه الى الشكل الحلقي من خلال الإلتحام الذاتي لطرفي القطعة, ثم نستخدم الدنا الحلقية الناتجة قالب في تفاعل بلمرة السلسلة PCR يتم خلالها إكثار القطعة غير المعلومة بإستخدام زوج من البوادئ المتخصصة بالإرتباط الى التتابع المعروف لكن التضاعف يكون بإتجاهين متعاكسين.

1-7-3 تصميم تفاعل البلمرة المقلوب IS-PCR design:

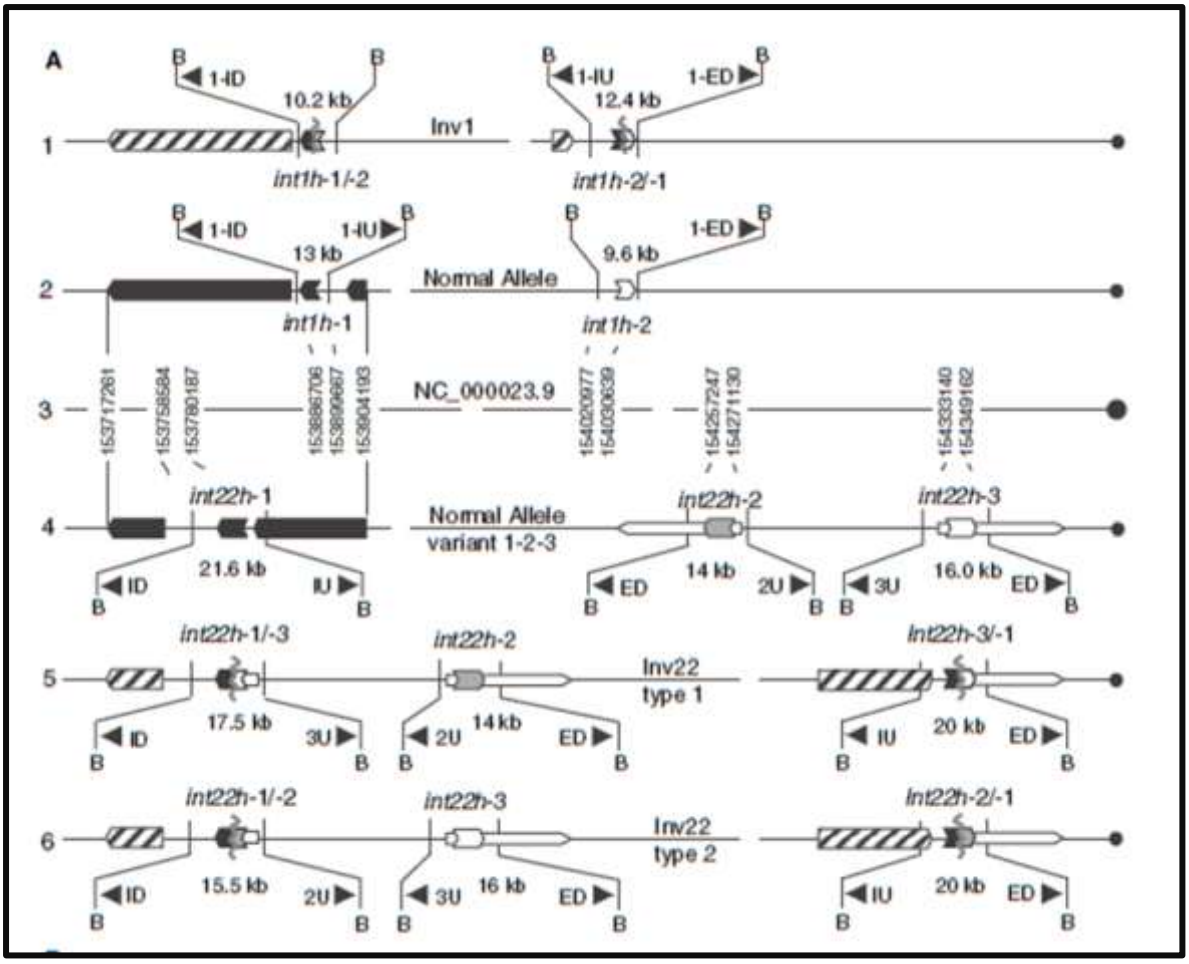
إتبع تصميم تفاعل البلمرة المقلوب الموضوع من قبل الباحثة (Rossetti *et al*.,2008) إذ صُممت البوادئ بحيث تعطي أحجام مختلفة لنواتج الـ PCR وكما مفصل في الجدول (4-3)

الجدول (3-4) مجموعتين من البرايمرات المستعملة في هذه الدراسة والمقترحة بواسطة الباحثة (Rossetti *et al* .,2008)

primer	Sequence 5 to 3	Length
ID	ACATACGGTTTAGTCACAAGT	٢١ mer
IU	CCTTTCAACTCCATCTCCAT	٢٠ mer
2U	ACGTGTCTTTTGGAGAAGTC	٢٠ mer
3U	CTCACATTGTGTTCTTGTAGTC	٢٢ mer
1-IU	GCCGATTGCTTATTTATATC	٢٠ mer

1-ID	**TCTGCAACTGGTACTCATC**	**١٩ mer**
1-ED	**GCCTTTACAATCCAACACT**	**١٩ mer**

إذ يوضح الشكل (3–5) قطع التقييد المقطعة بأنزيم BcLI وجميعها تولد حلقات التقييد التي يتم تضاعفها في الـ PCR بالإضافة الى موقع زوج البوادئ المستخدمة للكشف عن كل قطعة. في التنميط الوراثي لإنقلاب الأنترون 1 (Inv 1) النمط البري (Wild tupe) يعطي حلقة ذات حجم 13 كيلو زوج قاعدي (13kb) تحتوي على المنطقة المتماثلة الأولى في المنطقة البينية 1 (int 1h-1) وتحمل موقعا زوج البادئ IU/ID . والنمط الطافر يعطي دنا حلقية هجينة حجمها 12.4 كيلو زوجاً قاعدياً (12.4kb) مؤلفة من جُزئين من المنطقة المتماثلة الأولى والثانية (int1h-2/-1)نتيجة حدوث الإنقلاب في المنطقتين وتحمل زوج البوادئ IU/1-ED .



الشكل (3-5) قطع التقييد المقطعة بأنزيم BcI 1 جميعها.

بينما في التنميط الوراثي للإنقلاب في المنطقة البينية 22 (Inv22) تكون حلقة التقييد في النمط البري (WT) ذات حجم 21.6 kb حاوية على المنطقة المتماثلة الأولى في الأنترون 22 (int22 h-1) وتحمل موقعا زوج البوادئ IU/ID , والنمط الطافر الأول يعطي دنا حلقية هجينة (chimeric) حجمها 17.5kb مؤلفة من جُزئين في المنطقتين المتماثلتين الأولى والثالثة (int22 h-1/-3) وتحمل موقعا البادئ (3U/ID) نتيجة حدوث الإنقلاب البعيد بين المنطقتين المتماثلتين الأولى والثالثة . والنمط الطافر الثاني يعطي دنا حلقية هجينة (Chimeric) حجمها 15.5kb مؤلفة من جُزئين في المنطقتين المتماثلتين

الأولى والثانية (int22h-1/-2) وتحمل موقعي البادئ (2U/ID) نتيجة حدوث الإنقلاب القريب بين المنطقتين المتماثلتين الأولى والثانية.

أجريت الطريقة بأربع خطوات هي هضم الدنا بالأنزيم القاطع BcLI ثمَّ لحم القطع ذاتياً لتكون قطع دنا حلقية بالأنزيم اللاحم ثمَّ إكثار القطعة الخاصة بالأنترون 1 والأنترون 22 بإستخدام بوادئ متخصصة لكل قطعة والكشف عن أطوال القطع الناتجة والتي تعكس طبيعة التغيرات التي حدثت في هاتين المنطقتين وكما مفصل أدناه:

3-7-2 هضم الدنا :-

يتم هضم 1-2 مايكروغرام (ug) من الدنا الجينومي المستخلص وفق الفقرة 3-5 (بحدود 20 مايكروليتر uL من محلول الدنا ذي تركيز 100 نانوغرام / مايكروليتر) بإستخدام الأنزيم القاطع BcLI وذلك بمقدار 10 وحدة (U) من الأنزيم لكل ug من الدنا الجينومي لمدة تزيد على أربع ساعات بحسب تعليمات الشركة المجهزة (الأوربية Thermoscientific,) وكمايأتي :-

1 – نقل حجم مناسب من محلول الدنا الجينومي بحيث تحتوي على الكمية المطلوبة من الدنا (2ug) الى إنبوبة إبندروف سعة 1.5 مليلتر

2 – أضيف 20 وحدة من محلول الأنزيم القاطع BcLI الى الدنا الجينومي (إضافة 2uL من محلول الأنزيم القاطع الحاوي 10U / uL)

3 – أكمل الحجم الى 50 مايكروليتر بأستخدام محلول دارئ الهضم المجهز مع الأنزيم وحضن لمدة 5 ساعات بدرجة حرارة 55 مْ.

4 – ثبط عمل الأنزيم القاطع بعد إنتهاء مدة التقطيع بالحضن على درجة حرارة 70-80 مْ لمدة 10-20 دقيقة في الحمام المائي .

3-7-3 إسترداد الدنا الجينومي :- بعد الأنتهاء من الهضم أسترد الدنا المهضوم بإستخدام عدة (DNA Fragment protocol) المجهز من شركة الكورية Geneaid بحسب التعليمات المرفقة مع العدة :

1 – خطوة إرتباط الدنا DNA Binding :- وضع إنبوب DF في إنبوب الجمع collection tube ونقل كامل المزيج الى إنبوب DF column وطرد بسرعة 16-14000 xg لمدة 30 ثانية , وتم التخلص من الراشح وأعيد إنبوب DF الى مكانه في إنبوب الجمع.

2 – خطوة الغسل Wash :- أضيف 400 مايكروليتر من دارئ الغسل W1 buffer الى إنبوب DF وطرد بسرعة 16-14000xg لمدة 30 ثانية , وتم التخلص من الراشح في إنبوب الجمع وأعيد DF column في إنبوب الجمع مرة أخرى , وأضيف 600 مايكروليتر من دارئ Wash buffer بعد إضافة الإيثانول له ترك المزيج لمدة دقيقة واحدة بداخل إنبوب DF , ثم طرد بجهاز الطرد المركزي بسرعة 16-14000xg لمدة 30 ثانية, وأهمل السائل مرة أخرى ووضع إنبوب DF في إنبوب الجمع مرة أخرى وطرد بسرعة 16-14000 xg ولمدة 10 دقائق ليجف قالب الإنبوب

3 – خطوة إسترداد الدناDNA Elution :-وضع أنبوب DFالجاف في إنبوب إبندروف جديد بحجم 1.5 مليلتر ، وأضيف 30 مايكروليتر من دارئ Elution Buffer الى قالب إنبوب الجمع وترك لمدة دقيقتين ليمتصه قالب الإنبوب ،وطرد بجهاز الطرد المركزي لمدة 2 دقيقة بسرعة 16-14000 xg وأخذ الدنا المزاح في إنبوبة الإبندروف للخطوة اللاحقة .

3-7-4 ربط قطع الدنا DNA :- تحول قطع التقييد من الخطوة السابقة الى الشكل الحلقي بأستخدام الأنزيم اللاحم T4 ligase المجهز مع العدة المصنعة من الشركة الكورية Bioneer بحسب تعليمات الشركة المجهزة للأنزيم أضيف وكما موضح فيمايأتي:-

1 - أضيف 1 مايكروليتر من الأنزيم اللاحم من العاثي T4 (Accu Rapid DNA ligase) الى قطع الدنا المجهزة وفق الفقرة السابقة (1 U/uL وحدة من الأنزيم) وأضيف لها 10 مايكروليتر من دارئ ربط قطع الدنا المجهز مع العدة (2x Accu Rapid DNA ligation buffer) ومزج الخليط جيداً وحضن بدرجة حرارة 15-25 مْ لمدة 5 دقائق في الحمام المائي .

2 – بعد إنتهاء مدة الحضن تم تنقية وإسترداد الدنا الحلقي بالخطوات نفسها المشار اليها بالفقرة 3-7-3 وعلقت بكمية 30 مايكروليتر من الماء المقطر اللاآيوني.

3-8 تقنية تغير نواتج تفاعل البلمرة المقلوب IS-PCR -: إتبعت طريقة Inverse-Shifting PCR الموصوفة من قبل الباحثة (Rossetti *et al*.,2008) وإنجز تفاعل البلمرة في خليط يحتوي على 3 مايكروليتر أو 6 مايكروليتر من الدنا الحلقي لتحليل الإنقلاب في المنطقة البينية 1 (Inv1) أو الإنقلاب في المنطقة البينية 22 (Inv22) على التوالي (200-400 نانوغرام من الدنا الحلقية) وأضيف له 2 مايكروليتر من محلول تفاعل البلمرة PCR Premix المجهز من الشركة الكورية Bioneer الحاوية على المتطلبات الضرورية لأنجاز التفاعل والمدرجة في الجدول (3-3) وأضيف لكل تفاعل (Inv1 و Inv22)

2 مايكروليتر من كل بادئ من البوادئ الخاصة بالتفاعل بحسب ما مبين في الجدول (3-4) وأكمل الحجم الى 20 مايكروليتر بالماء المقطر اللاآيوني .

3-9 -: تفاعل البلمرة في جهاز الـ PCR المتضمن ثلاثين دورة 30cycler

جدول (3-5) برنامج تفاعل البلمرة المقلوب في جهاز الـ PCR .

	stage	Temperature	Time
	Initial Denaturation	٩٤ مْ	2 min
30CYCLER	Denaturation	٩٤ مْ	30sec
	Annealing	٥٦ مْ	1min
	Extension	٧٢ مْ	1.5min
	Final Extension	٧٢ مْ	5min

أنجز تفاعل البلمرة بجهاز الـ PCR نوع (Global Genomics Partner My Genie 32 Thermal Block) بثلاثين دورة تفاعل تضمنت كل دورة منها خطوة المسخ

(Denaturation) على درجة حرارة ٩٤ مْ لمدة 30ثانية وخطوة إرتباط البادئ (primer annealing) على درجة حرارة ٥٦ مْ لمدة دقيقة واحدة , وخطوة الإستطالة (Extension) على درجة حرارة ٧٢ مْ لمدة 1.5 دقيقة . سبقت دورات التفاعل هذه خطوة مسخ أولية مدتها دقيقتان على درجة حرارة ٩٤ مْ وختمت دورات التفاعل بخطوة إستطالة نهائية على درجة حرارة ٧٢ مْ لمدة 5 دقائق (Abou-Elew *et al*.,2011) .

3-9-1 تحليل نواتج تفاعل البلمرة :-

تم تحليل نواتج تفاعل البلمرة بالترحيل الكهربائي للنواتج على هلام الأكاروز بتركيز 2 % المصبغ بصبغة بروميد الإثيديوم (Ethidium bromide) وصورت تحت الأشعة الفوق البنفسجية وكمايلي:-

1 – حضر محلول دارئ 1XTBE بإضافة 10 مليلتر من محلول 10XTBE buffer الى 90 مليلتر من الماء المقطر اللاآيوني .

2 – حضر هلام الأكاروز طبقاً للطريقة الموصوفة من قبل الباحثين (Brody& Kern,2004) بوضع 100 مليلتر من محلول 1XTBE buffer في دورق سعة 250 مليلتر وأضيف له مقدار 1 غم من مسحوق الأكاروز المجهز من الشركة الكورية Bioneer وخلط جيداً لحين ذوبان مسحوق الأكاروز ثم وضع في الفرن الكهربائي على درجة حرارة ٨٠ مْ لمدة 5 دقائق حتى ذاب تماماً , وأخرج من الفرن , وأضيف اليه 3 مايكروليتر من صبغة الإثيديوم

بروماید وترك قلیلاً حتى یبرد الهلام عند درجة حرارة 45-50 مْ وصُب الهلام آنیاً في قالب الجهاز .

3 – تحمیل عینات الدنا بحفر هُلام الآكاروز :- بعد تصلب هلام الأكاروز بمدة 45 دقیقة أزیل المشط منه بحذر ونقل الصحن tray الى حوض جهاز الترحیل الكهربائي الحاوي على دارئ من (1XTBE buffer) بحیث یكون مستوى إرتفاع المحلول ملیمترات فوق هلام الأكاروز , ثم أضیفت نواتج تفاعل البلمرة في الحفر المخصصة لها في الهلام , وأضیف الدنا الواسم (DNA Leader) تدرج 100 زوج قاعدي في الحفرة المخصصة له في الهلام وشغل الجهاز على 75 فولت لمدة 45-60 دقیقة ثم نُقل قالب الهلام بعد إنتهاء الترحیل الى جهاز الفاحص بالأشعة الفوق البنفسجیة Wise-UV لمشاهدة الحزم وتصویرها .

3-10 التحلیل الإحصائي :-

أنجز التحلیل الإحصائي بأستخدام البرنامج الحاسوبي SPSS الإصدار 15 لنظام برمجة windows من شركة مایكروسوفت , حیثُ استخدمتُ اختبار مربع كايχ^2 في تحلیل نتائج قیاس فعالیة العامل الثامن للتخثر ووجدتُ إن قیمة مربع كايχ^2 المحسوبة تساوي (٤١.٢٠٠) وهي اكبر من قیمة مربع كايχ^2 الجدولیة (٥.٩٩) مما یدّل على إن هناك فرق معنوي ذو دلالة إحصائیة عند مستوى $P < ٠,٠٥$, وكذلك في تحلیل نتائج مرحلة IS-PCR وجدتُ إن قیمة مربع كايχ^2 المحسوبة تساوي (٣٨.٦١٥) وهي اكبر من قیمة مربع كايχ^2 الجدولیة (١٢.٥٩) مما یدّل على ان هناك فرق معنوي ذو دلالة إحصائیة عند مستوى $P < ٠,٠٥$.

٤. النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1 : تأثير الإصابة بالهيموفيليا A على فحوصات الإتزان الدموي:

شملت الدراسة 44 نموذجاً من المرضى الذكور المصابين بمرض نزف الدم الوراثي نوع A وتم إجراء فحوصات الأتزان الدموي Haemostatic test على المرضى المصابين بالمرض وشملت هذه الفحوصات زمن تخثر البروثرومبين Prothrombin time (PT) , وزمن الثرومبوبلاستين الجزئي activated Partial ThromboPlastine Time (aPTT), وفعالية العامل الثامن للتخثر FVIII:C للأنماط الثلاثة التي شملت (severe-Moderate- Mild) وتم إستخراج المتوسط الحسابي لهذه الفحوصات.

4-1-1 : تأثير الإصابة بالهيموفيليا A على زمن تخثر البروثرومبين وزمن الثرومبوبلاستين الجزئي aPTT لدى المرضى المصابين بالهيموفيليا A :

تم تقدير زمن تخثر البروثرومبين وزمن تخثر الثرومبوبلاستين الجزئي في المرضى المصابين بالهيموفيليا A فضلاً عن القيم الطبيعية Normal value , وقد بين إختبار زمن تخثر البروثرومبين (PT) أن معدل زمن التخثر للمرض كان 13.34 ثانية , وكانت القيمة الطبيعية للإختبار Normal value 12-13 ثانية (Columan *et al* . , 1987) , وبغياب العامل المساعد على التخثر تصبح القيمة 0.8-1.2 ثانية .

الجدول (4-1) زمن تخثر البروثرومبين PT وزمن تخثر الثرومبوبلاستين الجزئي aPTT لدى المرضى المصابين بالهيموفيليا A بالمقارنة مع القيم الطبيعية .

زمن البروثرومبين / ثانية	زمن الثرومبوبلاستين الجزئي/ ثانية

القيم الطبيعية	المتوسط الحسابي	القيم الطبيعية	المتوسط الحسابي
13-12	13.34	41-25	83.13

تشير نتائج الجدول (4–1) الى عدم توافر فروقات معنوية في قياس زمن تخثر البروثرومبين PT فعلى الرغم من توافر إرتفاع في الوقت اللازم للتخثر إلا إن هذا الإرتفاع لم يكن معنوياً, إذ بلغت 13.34 ثانية بالمقابل 12–13 ثانية لمجموعة المرضى بالمقارنة مع القيم الطبيعية على التوالي , ويعكس إختبار زمن البروثرومبين الكفاءة الإجمالية للنظام الخارجي للتخثر (Exterinsic system) , الذي يكون حساساً للتغيرات في عوامل التخثر الخامس V والسابع VII والعاشر X وبدرجة أقل العامل الثاني II (Prothrombin) , لكنه غير مناسب للكشف عن التغيرات الحاصلة في مستويات الفايبرينوجين (Fibrinogen) في حالة تدني مستويات الفايبرينوجين أو في حالة توافر مثبطات .

من خلال النتائج تبين إن المرضى المشمولين جميعاً في هذه الدراسة لايعانون من أي خلل في مكونات هذا المسار التي تصنع هذه العوامل في الكبد (Dacie and Lewis,2002) , وهذه النتائج إتفقت مع ماجاءت بها كثير من الدراسات التي إجتمعت على عدم تغير زمن تخثر (PT) للمرضى المصابين بنزف الدم الوراثي نوع A يدل على أن سبب الإصابة بالمرض تعود الى نقص في أحد عوامل التخثر التي لها علاقة في المسار الداخلي (Interinsic pathway) لتخثر الدم , (Russel *et al*., 2003,Bolton and Pasi, 2003) .

أما قياس زمن الثرومبوبلاستين الجزئي aPTT الذي إبتكر من قبل (Langdell and Brinkhus,1953) فهو إختبار غير متخصص (non-specific test) للمسار الداخلي للتخثر , وبالإشتراك مع إختبار زمن البروثرومبين (PT) يكونان إختبار الغربلة الأكثر فائدة للكشف عن النقص في عوامل التخثر الثامن VIII والتاسع IX والحادي عشر XI والثاني

عشر XII . كما أن زمن التخثر في إختبار aPTT أطول في حالة أي نقص لعوامل التخثر في المسار المشترك Common Pathway (النقص في العوامل الخامس V والعاشر X و II وبدرجة أقل للفايبرينوجين) وفي حالة توافر المثبطات , كما إن قيمة زمن التخثر في إختبار aPTT تزداد أما نتيجة حالة خلقية مثل مرض الهيموفيليا A,B أونتيجة حالة مكتسبة مثل أمراض الكبد(Laffan *et al*.,2006) , وإن الدراسات السابقة إجتمعت على زيادة زمن تخثر الثرومبوبلاستين الجزئي لدى المرضى المصابين بنزف الدم الوراثي نوع A (Giangrande,2003;Turgeon,2004).

4-1-2: تأثير الإصابة بالهيموفيليا A على تركيز عامل التخثر الثامن FVIII لدى المرضى المصابين بالهيموفيليا A :

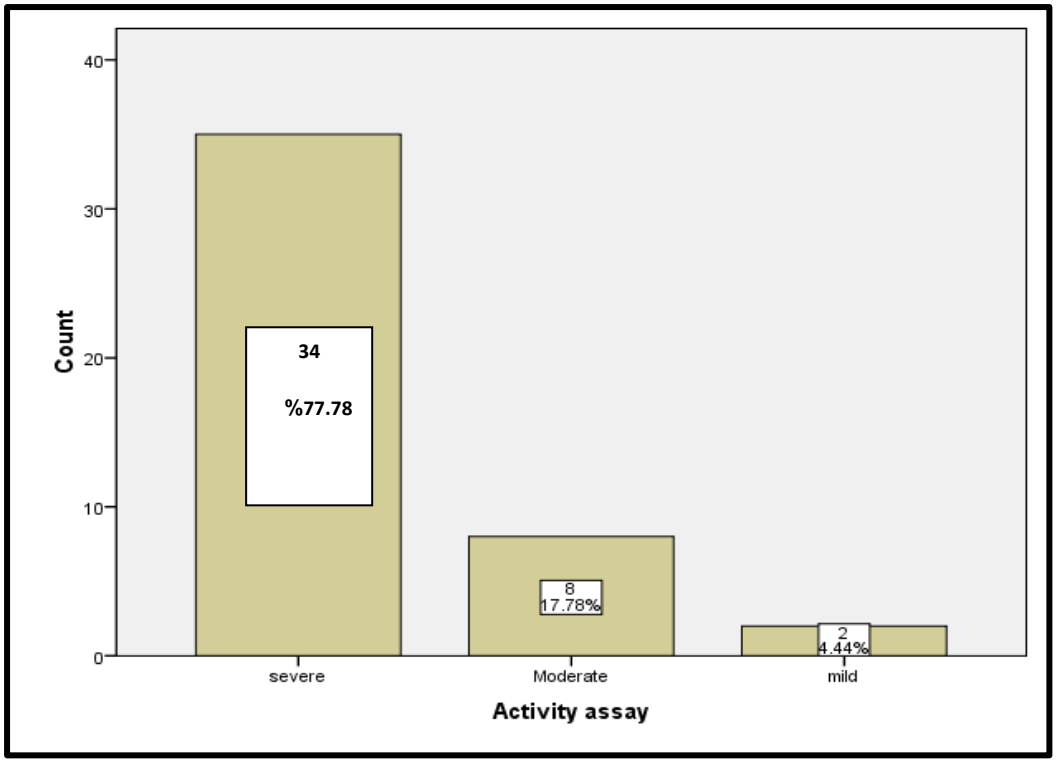
العامل الثامن FVIII هو أحد بروتينات تخثر الدم ومن نوع البروتينات المرتبطة بالسكر Glycoprotein. له وظيفة أساسية وجوهرية في عملية التخثر الداخلية المنشأ (Kane & Davie,1988;Lenting *et al*.,1988) ، وقد بينت نتائج إختبار فعالية العامل الثامن لدى المرضى أن 77.78 % منهم (34 حالة) كانت من النوع الحاد، و 17.78 % من المرضى (8 حالة) كانت من النوع المعتدل. في حين كان 4.44 % من المرضى (2 حالة فقط)من النوع الخفيف كما مبين بالشكل (4-1).

إذ سجل إنخفاضاً معنوياً في فعالية العامل الثامن للمرضى المصابين جميعاً بالمرض , وهذه النتيجة تتفق مع الدراسات السابقة التي صنفت المرض تبعاً لمستوى فعالية العامل الثامن بالبلازما الى ثلاثة أنواع حاد Severe عندما يكون مستوى فعالية العامل أقل من 1 % ومعتدل Moderate عندما يكون مستوى فعالية العامل بالبلازما بين 1- 5 % وخفيف

Mild عندما يكون مستوى فعالية العامل بالبلازما من 5- 35 % كما مبين بالجدول (2-4) (Briet *et al*.,1984; Kamiya *et al.*,1995).

الجدول (4-2) تركيز فعالية العامل الثامن للتخثر لدى المرضى المصابين بالهيموفيليا A مقارنة بالقيم الطبيعية علماً أن قياس فعالية العامل الثامن للتخثر بالـ % .

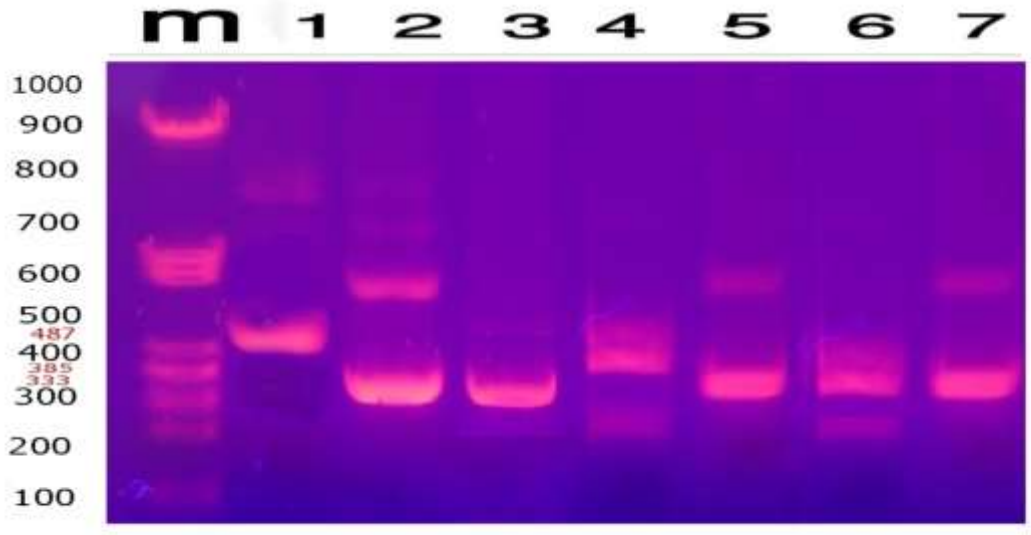
الانماط	القيم الطبيعية (%)	المتوسط الحسابي للمرضى
النمط الحاد Severe	less than 1	0.46
النمط المعتدل Moderate	1-5	2.04
النمط الخفيف Mild	5-35	30



شكل (4-1) فعالية العامل الثامن للتخثر لدى مرضى الهيموفيليا A .

(4-2) التنميط الوراثي لحوادث إعادة الترتيب الوراثي (Rearrangement) في تتابعات المنطقة البينية 22 بتقنية تغير نواتج تفاعل البلمرة المقلوب Inverse-Shifting PCR (IS-PCR):تم إجراء التنميط الوراثي لحوادث إعادة الترتيب الوراثي في المنطقة البينية 22 على عينات المرضى الذين ثبتت إصابتهم بالنوع الحاد من المرض فقط , والبالغ عددهم 22 عينة , وذلك لأن الاستراتيجية المتبعة في التنميط الوراثي تختلف بحسب نوع المرض , إذ يتم أولاً التنميط الوراثي للهيموفيليا A والتوجه بالبدء في كشف الطفرات المتوافرة في المنطقة البينية 22 بحسب الدليل العملي للتشخيص الجزيئي للمرض المتبع من قبل مراكز الهيموفيليا في المملكة المتحدة (UKHCDO) ؛ لأن هذا المدخل يسهم في الكشف عن 40–50 % تقريباً من الطفرات المسببة للمرض الحاد (Steven *et al*.,2005) , وإستخدمت تقنية تغير نواتج تفاعل البلمرة المقلوب (IS-PCR) للتنميط الوراثي في

المنطقة البينية 22 إذ تعد وسيلة ذات قدرة على الكشف عن قطع تقييد معينة بالإعتماد على إستخدام بوادئ تستهدف التتابعات الطرفية لكل موقع قطع للأنزيم القاطع . وأن تغيراً محدداً في حجم نواتج تفاعل البلمرة المقلوب لقطع التقييد سوف يعكس في النهاية تبدلاً معيناً في محتوى قطعة الدنا المضاعفة من النيوكليوتيدات نتيجة حدوث إعادة الترتيب وان تصميم تفاعل البلمرة المقلوب للكشف عن الانقلاب وإعادة الترتيب في الأنترون 22 يعتمد على الكشف عن قطع التقييد الحلقية الناتجة من الهضم بأنزيم التقييد Bcl1 (Rossetti *et al*.,2008) الذي يعد بديلاً للتحليل بتقنية وصمة سوذرن Sother blot ويستخدم في هذه التقنية أربعة بوادئ هي ID,3U,2U,1U كما مبين بالجدول (3–4) لتحليل الحلقات المتكونة من القطع بأنزيم التقييد وتعطي تشخيصاً حساساً لنمط الإنقلاب من النوع الأول (البعيد) Distal Inv22-1 والإنقلاب من النوع الثاني (القريب) Proximal Inv22-2 والأليل الطبيعي (الشكل 4–2)



شكل (2-4) الترحيل الكهربائي على هلام الآكاروز لنواتج تقنية IS-PCR للتنميط الوراثي لآحداث إعادة الترتيب في المنطقة البينية 22 في جين العامل الثامن تركيز الهلام ٢٪ ,٧٥ فولت/ سم لمدة ٤٥ -٦٠ دقيقة.

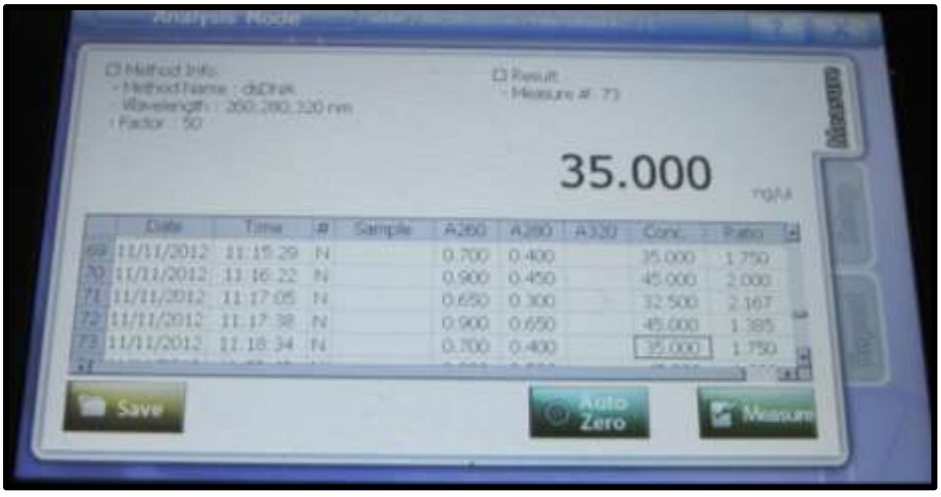
M = الدليل الحجمي (١٠٠ bp)

المسار في العينة رقم ١ = أليل الطراز البري لفرد غير حاوي على أنقلاب أنترون ٢٢ حجم الحزمة بحدود (٤٨٧ bp)

المسار في العينات ٢ ,٣ ,٥ ,٦ ,٧ = لأفراد حاملين طفرة أنقلاب الانترون ٢٢ من النوع الاول Inv22-I حجم الحزمة (٣٣٣ bp)

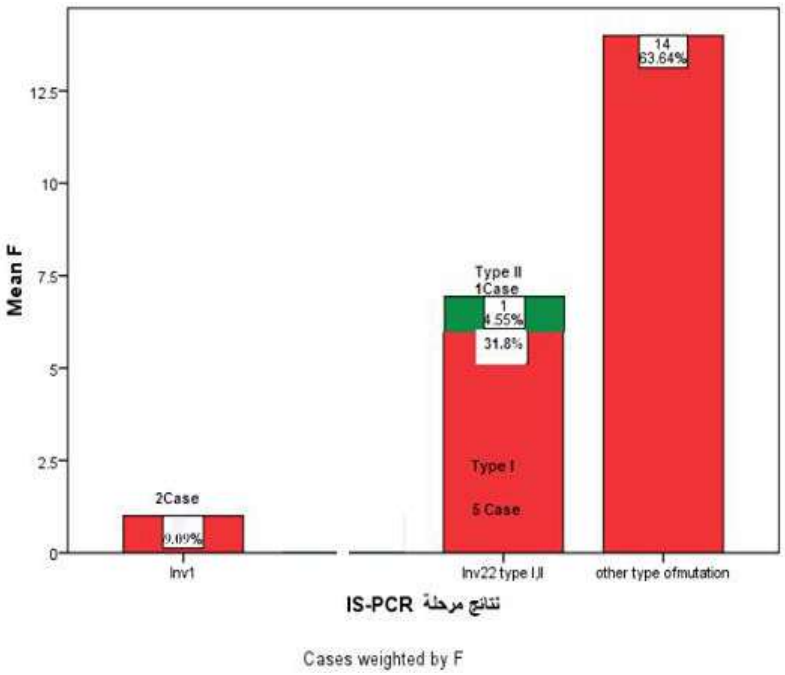
المسار في العينة رقم ٤ = لفرد حامل طفرة أنقلاب ألانترون ٢٢ من النوع الثاني Inv22-II حجم الحزمة (٣٨٥ bp).

وقد كشف الإختبار التشخيصي بهذه التقنية على عينات الدنا المأخوذة من المرضى المصابين بالنوع الحاد من المرض حيث كانت نتائج تقدير نقاوة وتركيز الدنا المستخلص من المرضى المصابين يتراوح من (١.٧-٢) كما موضح في الشكل (٤-٣)



شكل (4-3) نتائج تقدير نقاوة وتركيز الدنا المستخلص بأستخدام جهاز النانودروب.

أذ أن حدوث إعادة الترتيب في المنطقة البينية 22 في جين العامل الثامن كان في 5 من 22 مريضاً وحيث كانت نسبتهم 31.8 % وكما موضح في الشكل (4-4)



شكل (4-4) نتائج التحليل الاحصائي لتقنية تغير نواتج تفاعل البلمرة IS-PCR.

إن حدوث تردد إنقلاب الأنترون 22 في مورث العامل الثامن في المصابين بالنوع الحاد من المرض في العراق بنسبة 31.8 % تقارب النتائج التي بينتها دراسة أخرى عن المرض في أنحاء العالم الباقية , إذ أكد Keeney وجماعته أن تردد إنقلاب الأنترون 22 يكون متغيراً ضمن مدى يتراوح بين 17.6-46.9 % (Keeney *et al*.,2005) .وقد سجلت الدراسة حدوث كلا نوعي الإنقلاب في الأنترون 22 (النوع الأول والنوع الثاني) وكانت بنسبة تردد الإنقلاب الأول الى الثاني 1:6 31.8 % و4.55 % من الحالات المتغيرة على التوالي . وهذه النتائج مقاربة لما سجل في دراسات أخرى (De Brasi *et al*.,2000) إذ أشاروا الى حدوث إنقلاب النوع inv22-1 بنسبة 35 % وإنقلاب النوع الثاني inv22-2 بنسبة 6 %.

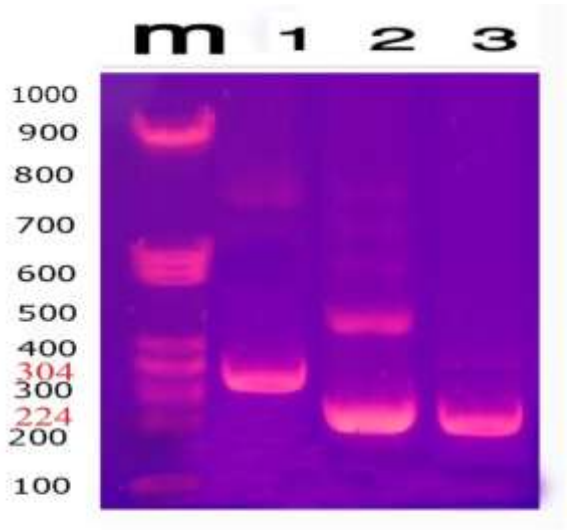
عدّ Andrikovics وجماعته إن إنقلاب الأنترون 22 هو تغير تركيبي كبير ضمن جين العامل الثامن سوف يمنع تكون البروتين الكامل الطول من mRNA وينتج عنه المرض الحاد (Andrikovics *et al*.,2003) ويعود السبب في إختلاف النسبة بين نوعي الإنقلاب الى إن الطرف البعيد distal بإتجاه المنطقة الطرفية (التيلومير) تكون أكثر قرباً عند إلتفاف الكروموسوم , وهذا هو السبب في إنقلاب الجينوم وفقدان أكثر من من 50 bp من جين العامل الثامن . إن هذا النوع من الإتحاد المتماثل يحدث بكثرة كلما إتجهنا نحو تيلومير مورث العامل الثامن . وأشار Jenkin وجماعته الى أن الإنتشار العالي لإنقلاب الأنترون 22 بين مجاميع المصابين بالمرض الحاد في العديد من المجاميع السكانية مثل القوقازيين 47% والهنود 46% والصين 37 % واليابان 33.3 % والألبينو10.5 % (Jenkins *et al*.,1994) .

وقد سجلت نتائج متغايرة الى حد ما في دراسة أجريت على مجموعة المصابين من عوائل في تايوان غير أقارب إذ شكلت نسبة تردد Inv22 36.7 % , وكانت نسبة تردد الإنقلاب من النوع الأول Inv22-1 بحدود 7.6 % (Chen *et al*.,2010) . وقد أشارت الباحثة طنطاوي الى أنه خلال العشر سنوات الأخيرة زادت بسرعة عدد مسببات تبدلات الجين التي وصفت في مجاميع عرقية مختلفة (Tantawy *et al*,.2010) , وفي الدول العربية كانت النتائج مقاربة ايضأ لما سجل في هذه الدراسة حيث كانت النسبة 36.84 % في تونس (Elmahmoudi *et al*.,2012) وفي مصر 23.3 % (Abu-Elew *et al*.,2011) .

إنّ جميع العينات من المرضى المصابين بالنوع الحاد من مرض الهيموفيليا A أختبرت لتوافر إنقلاب الأنترون 1 في جين العامل الثامن , وذلك بإستخدام حلقات التقييد الناتجة نفسها

من الهضم بالأنزيم القاطع Bcl 1 التي إستخدمت في الإختبار الأول مع إستخدام مجموعة مختلفة من البوادئ 1-ID,1-IU,1-ED كما مبين بالجدول (3-4)(Rossetti *et al*.,2008)

إذ ان الحلقة الناتجة من النمط البري Wild type للجين ذات الحجم 13kb مترافقة مع البوادئ 1-ID/1-IU والحلقة الهجينة التي حدث فيها إنقلاب الأنترون 1 في جين العامل الثامن في حالتين من 22 حالة تمت غربلتها 9.09% كما في الشكل (4- 5) .



الشكل (4-5) الترحيل الكهربائي على هلام الآكاروز لنواتج تقنية IS-PCR للتنميط الوراثي لأحداث إعادة الترتيب في المنطقة البينية 1 في مورث العامل الثامن. تركيز الهلام ٢٪ ,٧٥ فولت/ سم لمدة ٤٥ -٦٠ دقيقة.

M = الدليل الحجمي (١٠٠ bp)

المسار في العينة رقم ١ = أليل الطراز البري لفرد غير حاوي على أنقلاب أنترون ١ حجم الحزمة بحدود (304 bp)

المسار في العينات ٢ ,٣ = لفردين حاملين طفرة أنقلاب الانترون ١ حجم الحزمة (٢٢٤ bp)

ويوضح الشكل (4-4) توافر تردد بإنقلاب الأنترون 1 من جين العامل الثامن بنسبة 9.09% وهذه النتيجة سجلت نتائج مغايرة الى حد ما مع ماتوصل إليه (Liang *et al.*,2008) على مجموعة من المصابين بالمرض من الصين إذ كان تردد إنقلاب الأنترون 1 بنسبة 1.26 % وكان هذا الإنقلاب منخفضاً جداً في مصابين الهيموفيليا A الصينيين بالموازنة مع جماعات سكانية آخرى.

نتيجة دراستنا لم تتفق مع ماتوصل اليه (Bagnall *et al.,*2002;Cumming,2004) على جماعة من المصابين بالمرض الحاد من سكان الولايات المتحدة إذ كان تردد إنقلاب الأنترون 1 (Inv1) بنسبة 1.8 % والسبب يعود الى أستخدام تقنية L-PCR بالكشف عن الإنقلاب لكن أكد إن هذه التقنية كثيرة المطالب تقنياً وإستعاض عنها بطريقة أكثر حداثة وعصرية هي Inverse-PCR من ميزاتها أنها تعطي النتائج في غضون 24 ساعة وتحتاج كميات قليلة من الجينيوم. ودراستنا نتائجها أتفقت مع ما توصل اليه (Ghosh *et al*.,2007;Laurie *et al*.,2007) إذ وجد إن تردد إنقلاب الأنترون 1 بنسبة 11 % إذ إتبع طريقة DHPLC التي تميزت بمعدل كشف عالٍ عن الطفرات ،وهي تقنية قليلة التكلفة ، وذات إستعمال واسع .

نتيجة دراستنا جاءت متفقة مع ماتوصل اليه (Chen *et al*.,2010) من خلال فحصه لمجموعة من المصابين بمرض نزف الدم الوراثي نوع A من عوائل من تايوان غير أقارب إذ شكّل تردد إنقلاب الأنترون 1 بنسبة 7.6 % من المصابين بالمنط الحاد للمرض.

تم التعرف حديثاً على 1209 طفرة فريدة من أنواع مختلفة جمعت المعلومات عنها في قاعدة بيانات واسعة (HAMsTeRS) ووجد 797 من طفرات إستبدالات قاعدة مفردة point mutation و تقريباً نصف حالات المرض هي التي تسبب بوساطة إنقلابات بين موقع تتابع

داخل الأنترون 22 من جين العامل الثامن (int22-1) وتتابع خارج الجين (int22-2) (Rossetti *et al*.,2011) .وماتبقى من الطفرات التي لم تشخص بوصفها طفرة إنقلاب تفسر على إنها طفرات *(Nonsense mutation-Splicing mutation-Insertion and Deletion mutation –Missense mutation)* إذ بينت الدراسات التي تهدف الى كشف الطفرات المسببة للنزف الوراثي أن معظم المرضى يظهرون ضمن المناطق الأساسية في جين العامل الثامن المسببة للمرض وهذه المناطق تشمل تتابعات الحفاز في الطرف'5 '5) (promoter sequence والتتابعات المشفرة (Exons) ومناطق إرتباط التتابعات المشفرة مع التتابعات البينية (Intron-exon boundaries) والمنطقة الطرفية '3 المحيطة بتتابعات عديد الأدنيل

(3' region around the Polyadenylation signal sequences) إذ وجدت الطفرات في جميع التتابعات المشفرة (26 exons) .لذلك فإن الأستراتيجية المباشرة للكشف عن هذه الطفرات سوف تتضمن مضاعفة هذه المناطق من الدنا الجينومي بإستخدام تقنية تضاعف السلسلة PCR وغربلة نواتج الـ PCR لكشف الطفرات . وبسبب الحجم الكبير والتعقيد الموجود في جين العامل الثامن فإنه سوف يتطلب غالباً إجراء 30 تضاعف لقُطع من الدنا الجينومي لتغطية هذه المناطق المهمة من الجين .وهذه الأستراتيجية تتبع من قبل بعض المختبرات (Higuchi *et al*.,1991;Goodeve ,1998) (Vidal *et al*.,2001; Goodeve *et al*.,2000) وبدلاً عن ذلك يمكن إستخدام الرنا الرسول mRNA للعامل الثامن في غربلة المناطق المشفرة (exons) 1-13 و 15-26 ، أما الإكسون 14 كبير الحجم ومنطقة الحفاز في الطرف '5 ومنطقة عديد الأدنيل في الطرف '3 يمكن غربلتها لتوافر الطفرات من الدنا الجينومي (Naylor *et al*.,1991) وإن الرنا الرسول للعامل الثامن لايتم الحصول عليه من موقع الإستنساخ الرئيس

لهذا الجين وهو الخلايا الكبدية , وبدلاً عن ذلك يتم الحصول عليه من خلايا الدم البيض في الدم والتي يتم فيها تعبير أستنساخ قليل لهذا الجين(Ectopic (leaky) expression) (Naylor *et al*.,1991) ويمكن إستخدام تقنيات كشف الطفرات في غربلة نواتج الـPCR من جين العامل الثامن وأحد أكثر التقنيات فائدة تقنية (Mismatch Cleavage) (Montandon *et al*.,1989) إذ إستخدمت هذه الطريقة في تحديد الطفرات المسببة لمرض الهيموفيليا نوع B في السويد (Green *et al*.,1991) وفي المملكة المتحدة (Saad *et al*.,1994) وإستخدمت بشكل كبير في الجهود المبذولة لتوصيف الطفرات المسببة في الهيموفيليا نوع A في المملكة المتحدة (Waseem *et al*.,1999) . ومن الطرائق الآخرى التي إستخدمت للكشف عن الطفرات هي طريقة التعدد الصوري للشريط المفرد SSCP (Single-Strand Conformation Polymprphism) ,وطريقة الترحيل الكهربائي بالجل المتدرج المدنتر DGGE (Denaturing GradientGel Electrophoresis) , أو طريقة الكروموتوغرافي السائل عالي الكفاءة المدنتر (Denaturing High Performance Liquid Chromotography) DHPLC (Schwaab *et al*.,1997).

٥. الأستنتاجات والتوصيات

5-1 الأستنتاجات Conclusions :-

من خلال الدراسة الحالية يمكن وضع الأستنتاجات الآتية :-

1.إنقلابات الأنترون 1 (Inversion1) والأنترون 22 (Inversion22) أصبحت عيباً جزيئياً مهم ينتج عنه مرض نزف الدم الوراثي نوع A الحاد severe Haemophilia A وعُدت هذه الأنقلابات واحدة من عوامل الخطورة التي ينتج عنها أجسام مضادة ضد العامل الثامن للتخثر FVIII .

2.أن طفرة (Inversion) في الأنترون1 و 22 من جين العامل الثامن هي المسؤولة عن حوالي ثلث الطفرة المسببة للمرض بين المصابين بالهيموفيليا A النوع الحاد .وتحليل الطفرة بوساطة طريقة (Inverse-Shifting PCR) أنجز ليصبح أداة ووسيلة نصح وقبول للتحليل الوراثي في مصابين الهيموفيليا A وبالأخص الحالات الحادة من المرض في الأقطار المتقدمة لكل الأنواع التركيبية المترافقة مع المناطق الحارة طفورياً Hotspot ذات التكرار العالي للطفرات فضلا عن الكلفة المتوسطة للأختبار بحدود (150$) للعينة , علماً أن هذا الأختبار طبق في العراق لأول مرة في هذه الدراسة .

2-5 التوصيات Recommendations :-

1.المريض الذي هو أول شخص بالعائلة لديه شك وإشتباه بأعتلال النزيف ،هو أو هي عليهم الخضوع الى سلسلة من الفحوصات تدعى (Coaggulation Study) وهذه الفحوصات لتشخيص الهيموفيليا A تتضمن :

a. قياس زمن Prothrombin time(PT).

b.قياس طول فترة activated Partial thromboplastin time(aPTT).

c. قياس فعالية العامل الثامن بالبلازما . وهناك فحوصات حديثة أخرى إقترحت لتقييم وظائف الخثرة وتتضمن فحص توليد الثرومبين .

2.يوصى بالعوائل المصابة بالمرض أن تخضع للمشورة الوراثية وتحليل شجرة العائلة Family pedigree لتمييز الحالات المتوارثة عن حالات ظهور المرض تلقائي، والدراسات على مستويات الـ DNA ، وذلك بالخضوع الى تحليل التعدد الصوري Polymorphisim للمناطق(Extragenic-Intragenic) , لكن هذا التحليل ليس مرضياً دائماً ؛ لأنه يخفق العديد من الحالات التي معظمها طفرات . أذ أن مرض الهيموفيليا A هو إعتلال واسع الأنتشار على مدى العالم ، ويتطلب موارد إقتصادية عالية ومهمة غير متاحة وغير متوافرة للأغلبية , ويتطلب تخصيص موارد لغرض ادخال التقنيات الحديثة للغربلة الجزيئية للتشخيص والبحث والتدريب.

3. العناية في أدخال تقنيات تقديم الأستشارة الوراثية للعوائل المصابة بالمرض من خلال تقنيات التشخيص ماقبل الولادي prenatal diagnosis وتقنية ماقبل الزرع preimplantation في حالات الإخصاب الصناعي .

4. تحديد فعالية FVIII في دم الجنين لمعرفة مستوى الفعالية من حيث (Antigen-Activity) من عينات دم الحبل السري للجنين.

شالمصادر الأجنبية:-

AbouElew,H.;Ahmed,H.;AbdelWahab,M.;Hammoud,R.;Mokhtar,D.(2011):Genotyping of Intron 22-related rearrangements of F 8 by inverse Shifting PCR in Egyption hemophilia A patients .***Ann Hematol***;90:579-584.

Adcock,D.M.; Jensen,R.; Johns,C.S. and Macy,P.A. (2002): ***Coagulation Handbook***; Austin,Texas:Esoterix coagulation Academic Pub,Hungaria:246-254.

Albanes,S.; Ruiz-Saez,A. and Boadas,A. (2011):Identification of Factor VIII gene mutations in Patients with severe haemophilia A in Venezuela:identification of Seven novel mutations .***Haemophilia***;17(5): 913-8.

Ananyeva,N.M.;Lacroxi-Desmazes, S.;Hauser, CA.(2004): Inhibitors in Haemophilia A:mechanisms of inhibition ,management and perspectives. ***Blood Coagul fibrinolysi***s;15:109-24.

Andrew, J. G.; Pellequer, J.; Getzoff, E.D.(2000): Structural Basis for Hemophilia A caused by Mutations in C Domains of Blood Coagulation Factore VIII. ***Thromb Haemost***;83:78-85

Andrikovics,H.;Klein,I.;Bors,A.;Nemes,I.;Marosi,A.;Varadi,A.; Tordai,A.(2003): Analysis of Large Strucural Changes of

the Factor VIII involving introne 1and 22, in severe haemophilia A ***.Haematologica***; 88,7:778-784.

Antonarakis,S.E.(1995):Molecular genetics of Coagulation factor VIII gene and Haemophilia A.***Thromb.Haemost***;74(1):322-8

Antonarakis,S.E.; Rossiter,J.P.; Young ,M.; Horst ,J.; De Moerloose ,P.;Sommer ,S.S.;Ketterling ,R.P.; Kazazian,H.H.;Negrier,C.;Vinciguerra,C.;*et al*. (1995) Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A:results of an internation consortium study . ***Blood***;86,2206-2212.

Antonarakis,S.E.(1988):Molecular genetics of Coagulation factor VIIIgene and haemophilia A**.**State of the art issue 1995 XV Congress ISTH ***Thrombosis Haemost***;74:322-327.

Aronson,T.(1973):The Royal disease in Grandmama of Europe:the Crowend L Queen Victoria:170-180

Awidi, A.; Ramahi, M. and Alhattab, D.(2010): Study of mutations in Jordanian patients with hemophilia A; identification of five novel mutations. ***Haemophilia***;16(1):136- 42.

Bagdanova, N.; Markoff,A.; Pollmann,H.; Nowak-Gottl, U.; Eisert,R.;Dworniczak,B.;Eigel,A.;andHorst,J.(2002):Pr

evalence of small Rearrangements in the factor VIII Gene F8C among patients with severe haemophilia A.***Human Mutation in Brief# 533*** .

Bagnall,R.D.;Wassem,N.;Green,P.M.;Giannelli.;F.(2002):Recurrent inversion breaking intron 1 of the facror VIII gene is afrequent cause of severe haemophilia A.***Blood***;99:168-174.

Bagnall,R.D.; Giannelli,F.; Green,P.M. (2006): .int22h-related inversions causing hemophilia A:Anovel insight into their orgin and anew more discriminant PCR test for their detection .***J.Thromb.Haemost***; 4:591-598.

Bagnall,R.D.; Giannelli,F.; Green,P.M. (2005**):** Polymorphism and hemophilia a causing inversions in distal Xq28 acomplex picuter ***.J.Thromb .Haemost***;3:2598-2599.

Bao-lai,H.; Zhen-Yu,Y.; Yan, L.(2010): identification of seven novel mutation in the factor VIII gene in 18 unrelated Chinese Patients with hemophilia A. ***Ghinese Medical Journal***;123(3):305-310.

Bary,G.L. and Luban,N.L.(1987**):** Haemophilia presenting with intracranial (hemorrhage.N approach) to the infant with intracranial bleeding and Coagulopathy ***.Am J Dis Chid;***141:1215-1217**.**

Basu,U.and Banerjee,S.(2004):An engineered EBV vector expressing human factor VIII and vonWillebrand factor in Cultared B-cells .***J Gene Med***;6(7):760-8

Bern ,R.M.and Levy, M.N.(1983):Haemostasis and blood Coagulation in physiology .***Toraranto CV Mosby company***;411-35.

Bidichandi, S.I.;Lanyon, W.G.,Shiach, C.R. (1995):Detection of mutations in ectopic Factor VIII transcripts from nine haemophilia A Patients and the Correlation with phenotype. ***Hum Genet***;95(5):531-8.

BinAbid,N.;Hussai,R.;Yasmin,N.;Zafar,T.;Iqbal,S.;andNiazi,G. A. (2007): Identification of factor VIII Gene Mutation in Haemophilia a patients from Punjab. ***World Journal of Medical sciences*** ;2 (1):25-27,1817-3055.

Bianco,R.P.and Detezano,P.M. (2000):Intron 22 Factor VIII gene inversions in Argentine families with severe haemophilia A.***Haemophilia*** ;6:21-22.

Blanchette, V.S.;Sparling, C.;Turner, C. (1991): Inherited bleeding disorders. ***Baillieres Clin Haematol***;4(2):291-332**.**

Bolton-Maggs, P.H. and Pasi, K .J.(2003):Haemophilia A and B.***Lance***t;361:180-91.

Bombeli ,T.and Spahn D.R. (2004):Physiology and management of Thromboebolism and haemorrhage.***Br J Anaesth*** ; 93(2):275-87.

Bowen,D.J.and Keeney ,S. (2003**):** the long distance PCR for detection of intron 22 inversion of the Factor VIII gene in severe Haemophilia A.***Thromb.haemost***.,89:201-202.

Briet,E.;Reisner, H.M.;Roberts, H.R.(1984):Inhibitors in Christmas Disease .***Prog Clin Biol Res***;105:123-139.

Briet,E.and Peters,M.(2001):The incidences of inhibitors in haemophilia A and the induction of immune Tolerance***.Adv Exp Med Biol***;489:89-97.

Brinkhous,K.M.(1975): Ashort hisrory of haemophilia with some comments on the Word" Haemophilia" Brinkhous KM;Hemker HC;eds.***Handbook of haemophilia***; Newwork:3.

Brody,J.R.andKern,A.P.(2004):Historyand Principle of conductive media for Standard DNA electrophoresis.***Anal.Bio.Chem***;33(1):1-13.

Bowen,D.J.(2001): Haemophilia A and B :molecular insights **:*Mol Pathol***;2002 ;55(2):127-144.

Cai, X.H.; Wang, X.F .;Dai, J .;Fang, Y.; Ding, Q. L.; Xie, F.(2006)**:**Female hemophilia A heterozygous for ade novo

Framishift and novel missense mutations of VIII . ***J Thromb Haemost*** .;4(2):1969-74.

Ceskych,C.L. and Habart, D. (2005): Molecular Diagnosis of Haemophilia A in Clinical practice**.** In statute of Hematology and Blood Transfusion;144:795-800

Chamberlain,G.(1995):Obstetries.6th .ed.Edward Arnold.London .NW.3BH.

Chen, Y.C.;Hu, S.H.; Cheng, S.N.;Chao, T.Y .(2010) :Genetic analysis of Haemophilia A in Taiwan. ***Haemophilia*** ;16(3):538-44.

Chetta,M.;Drmanac,A.;Santacroce,R.;Grandone,E.;Surrey,S.;Fo rtina,P. and Margaglione,M.(2008):Identification of FVIII gene mutation in Patients with haemophilia A using new Combinatorial sequencing by hybridization.***Indien J of human genetics;***14(2):55-64.

Columan,R.W.; Hirsh,J. and Marder,V.(1987): Hemostasis and Thrombosis-Basic Principles and Clinical Practic. 2nd ed. ***Philadephia ;J.B Lippin Cott.Co***: 3-11**.**

Connie,H.Miller.;Margaret,W.;Hilgartner,Louis.M.;Aledor t,John.M,;Opitz,James.F.;Reynolds.(1987):Reproductive choices in haemophilic men and Carrier ***.Am J Med Genet***;26,3:591-598.

Cumming, A.M. (2004):the factor VIII intron 1 inversion mutation Prevalence in the UK.***J Thromb Haemost*** ;205-206.

Dacie,J.V.andLewis,S.M.(2002):PracticalHaematology Churchill.6th ed Edinburgh.

Dalal,S.; Pradhan,M. and Agarual,S. (2006): Genetic of Bleeding Disorders .***Int J Hum Genet***;6(1):27-32A.

Dasanu, C. A. and Alexandrescu,D.T. (2000):"A Case of Prekallikrein Deficiency Resulting in severe Recurrent Mucosal Hemorrhage"***.American Journal Of Medical Sciences;*****338(5):429-30**

De Brasi ,C.D.; Candela,M.; Cermelj,M.; Slavutsk ,I.R.; Larripa,I.B.;PerezBianco,R.;deTezanosPinto,M. (2000):Intron 22 Factor VIII gene inversions in Argentine families with severe haemophilia A. ***Haemophilia***;6:12-22.

Dietz, H.C.;Valle, D.;Francomano, C.A.(1993): The Skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutation .***science***;259:680-3.

Ding, P.F.;Sun, W.S.; Wang, Q.Y.;Liu, D.C.;Zhang, X.Q.;Teng, B.Shen, F.K. (2003): Long distance-PCR for detection of Factor VIII gene inversion in Patients with severe

hemophilia A. ***Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*** ;11(4):309-2**.**

Duncan, B.K.and Miller, J.H.(1980):Mutagenic deamination of cytocine residaes in DNA**.*Nature***;287:560-1.

Elmahmoudi,H.; Khodjet-elKhil,H.; Wigren, E.; Jlizi, A.; Zahra,K.; Pellechia,D.; Vinciguerra, Ch.; Meddeb, B.; Elggaaied ,A.; Gouider,E.(2012):First report of Molecular diagnosis of Tunisian Hamophiliacs A:Identification of 8 novel causative mutation .***Diagnostic Pathology***;7:93.

Fulcher,C.A.;Graff,M.S.and Zimmerman,T.S.(1987):FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting .***Blood;***69:1475-1480.

Fidanci, I.D.;Kavakli, K.; Ucar, C.; Timur, C.; Meral, A.;Kilinc,Y.; Sayilan, H.;Kazanci, E.;Caglayan, S. H. (2008): Factor 8 (F8)gene mutation profile of Turkish hemophilia A patients with inhibitors. ***Blood Coagula fibrinolysis;*** 19(5):383-8.

Fijnvandraat,K.;Turenhout,E.A.;VandenBrink,E.N.;Peters,M.and Voorbery,J.(1997):The missense mutation Arg 593-Cys is related to antibody formation in apatients with mild haemophilia A**.*Blood***;89:4371-4377.

Forbes,C.D.; Malodor ,L.M.; Madhok, R.(1997): haemophilia. ***London***; England Chapman & Hall. 1-371.

Freije,D.and Schlessinger,D.A. (1992): conting of Yeast artificial Chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS 115 locus and two for the DXYS64 locus ***.Am.J.Hum.Gene***; 51:66-80.

Fritsma,G.A. (2002):" Evalulation of Haemostasis" Hematology:Clinical Principles and Application .Ed.Bernadette Rodak.W.B.Saunders Company :***Philadelphia;***719-53.

Frusconi,S.;Passerini,I.;Girolami,F.;Masieri,M.;Linari,S.;Longo, G.;Morfini,M.;Torricelli,F. (2002):Identification of seven novel mutations of F8C by DHPLC.HumMutat; 20(3):231-2.

Fukuda,K.;Naka, H.;Morichika, S.;Shibata, M.;Tanaka, I.;Shima, M. and Yoshioka, A.(2004):Inversion of the Factor VIII gene in Japaness patients with severe haemophilia A.***Int J Hematol;***79(3):303-6.

Gab-Allah, M.R. and Ahmed, B.M.(1990):Prevalence of hereditary hemorrhagic blood disorders among adult Egyptian males.***NewEgypt J Med***;4:823-824.

Ghosh ,K.;Shetty, S.;Mohanty, D.(2007):Inversion of intron 1 is arare cause of severe hemophilia A in Indian population.***J Thromb Haemost***;2:1481-2.

Ghosh,K. (2004): Coagulation disorderds seen through the window of biologymolecular**.** ***Indian Journal of human Genetics****;13,*3: 0971-6866**.**

Giangrande,P.L.(2003):Six Characters in search of an author:the history of the nomenclature of Coagulation factors .Br ***J Haematol***;121:703-12.

Gilbert, G.E. and Drinkwater, D.(1993):specific membrane binding of factor VIII is mediated by serine,amoiety of Phosphatidyl serin.***Bio Chemistry***; 21;32(37):9577-85.

GillChrist ,G.S.;Piep gras, D.G.;Roskos, R. R.(1989): Neurologica Complication in haemophilia .In Pochedlyc C,ed.Haemophilia and the Child and adult .***New York ,Ny:Raven press***:45-68.

Gitchier, J.;Wood ,W.I.;Tuddenham EG.;Shuman, M.A.;Goralka, T.M.;Chen, E.Y.;Lawn, R.M.(1985): Detection and Sequence of mutations in the Factor VIII gene of Haemophiliacs. ***Nature***;5; 315(6018):427-30.

Gitschier,J.; Higuchi,M.; Bidichandani,S.; Connor,J.M.; Hoyer,L.W.; Yoshioka,A.; Peake,I.R.; Olek,K.; Kazazian,H.H.; Lavergne,J.M.; Giannelli,F.;

Antonarakis,S.E. and Cooper,D.N. (1994): Haemophilia A:database of nucleotide substitution deletions, insertions and rearrangement of factorVIII gene , ***Nucleic acids Rasearch***; 22, 17:3511-3533.

Gitschier,J.; Wood,W.I.; Goralka,T.M; Wion,K.L.; Chen,E.Y.; Eaton,D.H.; Vehar,G.A.; Capon,D.J.; Lawn,R.M.(1984): Characterization of the human Factor VIII gene ***.Nature***,312:326-330.

Goodeve,A.C. (1998):Laboratory methods for the genetic diagnosis of bleeding disorders. ***Haematol;***20:3-19.

Goodeve,A.C.;Williams,I.; and Bray,G.L.(2000):Relationship between factor VIII mutation type and imhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate).Recombinate PUP study group.***Thromb Haemost***;85:580-3.

Green,P.M.;Montandon,A.J.;and Ljung,R.(1991):Haemophilia B mutations in a complete Swedish population sample :a test of new strategy for the genetic counseling of diseases with high mutational heterogeneity.***Br J Haematol***;78:390-7.

Guillet, B.;Lambert ,T. and D Oiron, R *et al*. (2006): Detection of 95 novel mutations in Coagulation Factor VIII gene F8

responsible for hemophilia A:results from Single institution. ***Hum Mutat***;27(7):767-85.

Guyton,A.C. and Hall,J.E.(2006):Textbook of Medical Physiology .W.B.Saunders company, ***Philadelphia; 11ed***: 957-1015.

Habart,D.(2005):Molecular Diagnosis of Haemophilia A in Clinical practice.***Cas.Lek.ces***;144:795-800.

Haig,H.; Edward,G.D.; Stylianos, E.A.(1995): Haemophilia A and Parahemophilia .Deficiencies of Coagulation Factor FVIII and V. Chapter106.In:Charles,R.Scriver; Arthur,L.Beaudel; Williams. Sly,David Valle: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease .Seventh Edition ,volume III, Newyork .Mc Graw-Hill,Inc: 3241-3261**.**

Hay, C.R.;Bahlin,T.p.;Collins,P.W.(2000):The diagnosis and management of factor VIII inhibitors:aguideline from the UK haemophilia center Doctors organization Haemophilia.***Haematol***.;111(1):78-90.

Hay,C.R.(2002):the 200 united Kingdom haemophilia center doctors organization inhibitor guidelines Pathophysiol.***Haemost Thromb*;**32(1):19-21.

Herrmann, F.H. and Wulff,K.(2004). Factors VII,VIII,IX,and X:moleculargeneticsandgenediagnosis.***Hamostaseologie***;24(2):94-107.

Heyworth, B.E.; Figgie, M.P.; Acharya, S.S.; Sculco, T.P.(2005): Orthopedic management of Haemophilia . ***Am J Ortho***;34(10):479-87.

Higashigama, S.;Oh Kubol, I.;Ishiguro, H.;Kunimatsu, M.;Sawaki, k.;Sasaki, M.(1986):Human HMWK as athiol proteiens as inhibitors:presence of the entire inhibition capacity in the native form of heavy chain .***Biochemistry;*** 25(7):1669-75.

Higuchi,M.;Wong,C.;Kochhan,L.;Olek,K.;Aronis,S.;Kooper,C. K.;Kazazian,H.H.;JrAntonarakis,S.E.(1990):Characterization of mutation in the factor VIII gene by direct Sequencing of amplified genomic DNA.***Genomics***; 6, 1:65-71.

Higuchi,M.;Antonarakis,S.E.;Kasch,L.;Oldenburq,J.;Economon -Petersen,E.;Olek,K.;Arai,M.;Inaba,H.;Kazazian,H.H. (1991): Mollecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: Detection of the mutation in 25 0f 29Patients by denaturing gradient gel electrophoresis.

Hollestelle,M.J.;Thinnes, T. and Crain,K.(2001):Tissuse distribution of factor VIII gene expression in Vivo:acloser look. ***Thromb Haemost***;86:855-861.

Hoyer,L.(1994):Haemophilia A.***New England journal of Medicines*** ,330:38-47.

Hutton ,R.A.(1989):Normal homeostasis :Postgraduate Haematology ,ed.By Hoffbrand ,A.V.and Lewis,S.M.,***3ed .Heinemann Medical Books ,London***:560-597.

Hwang ,S.H.;Kim, M.J.; Lim,J.A.; Kim,H.C. and Kim, H.S.(2009): Profiling of Factor VIII mutations in Korean haemophilia A. ***Haemophili***a:15,6:1311-1317.

Jacquemin, M.; De Maeyer,M .; D Oiron,R.; Lavend Homme, R.; Peerlinc,K.;Saint – Remy, J.M.(2003): Moleular mechanisms of mild and moderate hemophilia A**.** ***J Thromb Haemost***;1(3) : 456-63.

Jandle, J.H.(1990):Disorders of coagulation.In:Jandle JH(ed)**Blood textbook of hematology,2nd** edn.Little Brown and Company,Boston:1361-1366

JaYandharan, G.;Shaji, R.V.; Baidya, S.;Naira, S.C. and Chandy, M. (2005): Identification of FVIIIgene mutations in 101 patients with Haemophilia A:mutation analysis inversion screening and multiplex PCR and CSGE and

molecular modeling of 10 novel missense substitutions. ***Haemophilia;*** 11(5):481-91.

Jenkins, P.V.;Collins, P.W.;Goldman, E.; Mc Craw, A.;Riddell, A.;Lee, C.A.;Pasi, K.J.(1994):Analysis of intron 22 inversions of the Factor VIII gene in severe haemophilia A:implication for genetics counseling.***Blood***;84(7):2197-2201.

Jenkins,P.V.; Collins,P.W.; Goldman,E.; Mc Craw,A.; Riddell,A.(2012): Analysis of intro 22 inversions of the Factor VIII gene in severe hemophilia A:implications for genetic Counselling ***Blood***; 84,7:2197-2201

Kamiya T.;Takahashi, I. and Saito, H.(1995):Retrospective study of inhibitor formation in Japanese haemophiliacs. ***Int J Hematol***;62:175-181.

Kane,W.H. and Davie,E.W.(1988):Blood Coagulation factors V and VIII:Structural and Functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders ***.Blood***;71:539-555.

Kasper, C.K. and Lin, J.C. (2007): Prevalence of Sporadic and familial haemophilia***.Haemophilia***;13:90-92.

Kasper,C.K.and Buzin,C.H.(2007):Genetics of Haemophilia A,B

Keeney, S.;Mitchell, M.;Goodeve, A.(2005):The Molecular analysis of Haemophilia A:aguideline from the UK Haemophilia center doctors organization haemophilia genetics laboratory network. ***Haemophilia***;11:387-397.

Keeney, S. (2011): Clinical Utility gene cardfor :Haemophilia A.***European Journal of human Genetics***; 19,10:1038-107.

Keeney,K.; , Mitchell,M. and Goodeve.;A. (2010): Practice Gaidelines for the Molecular Diagnosis of Haemophilia A. ***(UKHCDO) UK Haemophilia Centere Doctors Organisatio***

Konkle,B.A.(2011): Haemophilia A.

Korkoo, J.; Annuney,S.; Pihlajamma,T.;J.Prockop,D. and Alakokko. (1998) :Conformation Sensitive gel electrophoresis for Simple and accurate detection of mutation :Comparison with denaturing gradient gel electrophoresisandnucleotideSequencing.***Genetics***;(95):1681-1685.

Lacroix-Desmazes,S.;Bayry, J.;Misra, N *et al*. (2002):the Prevalence of Proteolytic antibodies against factor VIII in haemophilia A.***N Engl J Med*** ;346(9):702-703.

Laurie,A.D.;Sheen,C.R.;Hanrahan,V.;Smith,M.P. And George,P.M.(2007): The molecular aeitiology of haemophilia A in aNewZealand Patients group.***Haemophilia*** ;13:420-427.

Laffan, M.;Mine, R.; Dacie, J.V. and Lewis, S.M.(2006):Practical haematology.10th ed:380-401.

Lakich, D.; Kazazian, H.H.;Jr.Antonarakis, S.E.;Gitschier,J. (1993): Inversions disrupting the Factor VIII gene are acommon cause of severe haemophilia A .***Nat Genet;***5:236-41.

Langdell,R.D.;Wagner,R.H.;Brinkhous,K.M.(1953):Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests;apresumptive test for hemophilia and asimple one-stage antihemophilic factor assay procedure.***J.Lab.Clin.Med***;41(4):637-47.

Leissinger,C. A.(2004):Prevention of bleeds in haemphilia patients with inhibitors:emerging data and Clinical direction .***Am J Hematol***;77(2):187-93.

Lenting,P.J.;Van Mourik,J.A. and Mertens,K. (1988):The life cycle of Coagulation factor VIII in View of its structure and function .***Blood Journal:***92.11;3983-3996.

Levine ,P.H. and Brettler,D.B.(1991):Clinical Aspects and therapy for Haemophilia A. ***Haematology***:1290-1304.

Levinson,B.; Kenwrick,S.; Gamel,P.; Fisher,K.; Gitschier,J. (1992): Evidence For a third transcript from the human factor VIII gene. ***Genomies***;14, 585 – 589.

Levinson,B.; Kenwrick,S.; Lakich,D.; Hammonds,G.; Gitschier,J. A. (1990): transcribed gene in an intron of the human Factor VIII gene. ***Genomics;*** 7,1-11.

Liang,Y.;Yan,Z.Y.;Yan,M.;Hua,B.L.;Xiao,B.(2009):Detection of Factor VIII intron 1 inversion in severe haemophilia A.(2009): ***Zhonghua Yi Xue yi chuan Xue Za Zhi***; 26(3):323-5.

Liang Y.Y.;Yan, M.;Fan ,L. K.; Xiao, B.;Hua, B.L.;Liu, J.Z.; Zhao, Y.Q.;(2008): Frequency of intron 1 inversion of Factor VIII gene in Chinese Hamophilia A patients with Case report of afemale patients with heterozygose intron 1 inversion. ***Zhonghuna Yi Xue Za Zhi Yan ZY*** ;21;88(38):2672-4.

Liu ,Q.;Thorland ,E.C.;Heit, J.a.;Sommer, S.S.(1997): Overlaping PCR for bidirection PCR amplification of specific alleles :Arapid one –tube method for simultaneously differentiating hemozygotes and heterozygous. ***Genome Res***; 7,389-398.

Liu, H.X.;Cartegni, L.;Zhang, M.Q *et al*.(2001) :Amechanism for exon Skipping caused by nonsense or missense

mutation in BRCA1 and other genes.***Nat Genet***;27:55-9.

Liu,M.L.;Shen,B.W.;Nakaya,S.;Pratt,K.P.;Fujikawa,K.;Davie E.W.;Stoddard,B.L.;andThompson,A.R.(2002):Haem

philic factor VIII C1-and C2 domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure **.*Blood***;96,3:979-987.

Liu,Q.;Nozari,G.;Sommer ,S.S. (1998): single tube Polymerase Chain reaction for rapid diagnosis of inversions hotspot of mutation in haemophilia A**.** ***Blood*** ;92,1458-1459

Ljung, R.C.(1995):Gene Mutations and inhibitor formation in patients with haemophilia B.***Acta Haematol***;94(1):49-52.

Ljung, S.C.(1999):Prophylactic infusion regimens in the management of haemophilia .***Thrombo J***;28(5):525-30.

Lollar, P. And Aledort, L.(1995): Action of factor VIII In inhibitors to coagulation factors .***Plenum Press***; N.Y:3-13.

Mahajan,A.; Chavali, S.;Kabra, M.;Chowdhury, M.R.;Bharadwaj, D.(2004):Molecular Characterization of Haemophilia B in north Indian families:identification of novel and recurrent molecular events in the factor IX gene.***Haematologica***;89(12):1498-503.

Mandalaki,T.(1998):Haemophiliainhibitors.Anoverview.***Haema*** ;1(2):77-85.

Mantilla-Capacho,J.M.; Beltran –Miranda,C.P.; Zaizar,H.L.; Aguilar –Lopez,L.; Esparza –Flores,M.A.; Lopez-Guido,B.; Troyo-Sanroman ,R.;and Jaloma- Cruz,A.R. (2007): Frequency of Intron 1 and 22 inversions of factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. ***American Journal of Hematology***; 82:283-287.

Marder,V.T. and Sherry ,S.(1988):Thrombolytic therapy current Status **.*Med***.,318:1512-1585.

Marlar,R.A.; Kleiss,A.J. and Griffin,J.H. (1982): An alternative extrinsic Pathway of human blood Coagulation. ***Blood***; 60:1353-1358.

Mazurier, C. (1992): Von Willebrand disease masquerading as haemophilia A**. *Thromb Haemost***;67:391-6.

McKenna,R.*;*Greenberg,C.S.;Schwartz,R.A.;Besa,E.C.;Klujszo, E.;Cascon,P. (2005):Factor VIII***.*Medscape;***10(5):15-84.

McMillan,C.W.;Shapiro, S.S.;Whitehurst, D.;Hoyer,L.W.; Rao,A.V. and Lazerson,J.(1988):The natural history of factor VIII :C inhibitors in patients with haemophilia A:anational cooperative study.II.Observations on the initial development of factor VIII:C inhibitors .***Blood;***71:344-348.

Meacham,J. and D.pedersen .(1995):"Was Queen Victoria abastrand?" Newsweek.

Michael,M.D.(2002):Cholesterol.Medical.Education at the academy ***.J.Anti.-Aging Research.California***; 1-4.

Michiels, J.J .;Gadisseur, A.;Vangenegten, I .; Schroyens,W.; Berneman,Z.(2009): Recessive Von Willebrand disease type 2 Normandy variable expression of Mild hemophilia and VWD type I . ***Act Haematol***;121(2-3):119-27.

Montandon,A.J.;Green,P.M.;and Giannelli,F.(1989):Direct detection of point mutations by mismatch analysis :application to haemophilia B.***Nucleic Acid res***;17:3347-58.

Naylor, A.J.;Buch, D.;Green, P.;Williamson,H.; Bently, D.;Giannelli. F .(1995).Investigation of the Factor VIII intron 22 repeated region (int22h)and the associated inversion junctions .***Hum.Mol.Genet***;1995,4,7:1217-1224.

Naylor, J.;Brinke, A.;Hassock,S.;Green,P.M.;Giannelli,F. (1993):Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe Haemophilia A is due to large DNA inversions.***Hum. Mol. Genet***;2:1773-8.

Naylor,J.A.;Green,P.M.;and Montandon,A.J.(1991):Detection of three novel mutations in two haemophilia A patients by

rapid screening of Whole essential region of factor VIII gene.***Lancet***;337:635-9.

Nishino, M.; Girma, J.P.;Roth Schild, C.;Fressinaud,E.;and Meyer,D. (1989): New Variant of Von Willebrand disease with defective binding to Factor VIII **.** ***Blood***;74:1591-9.

Nurden,P.;and Nurden,A.T.(2008):Congenital disorders associated with Platelet dysfunction.***Thromb Haemost***;99(2)253-93.

Ochman,H.;Gerber,A.S.;Hartl,D.L. (1988): Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. ***Genetics***; 120: 621-623.

Oldenburg,J.(1997):HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII.***Thromb Haemost***;77:238-42.

Oldenburg,J. and Rost,S. (2000): Denovo Factor VIII gene introne 22 inversion in afemale Carrier presents as asomatic mosaicism**.** ***Blood***; 96, 8: 2905-2906

Oldenburg, J.;Ananyva, N.M.;Saenko, E.L.(2004):Molecular Basis of Haemophilia A.***Haemophilia*** ;10:133-139.

Pasi,K.J.(2001):Gene therapy for Haemophilia .***British Journal of Haematology*** ;115:744-757.

Patel,S.R.;Hartwig,J.H.;Italiano,J.J.(2005):The biogenesis of Platelet from megakaryocyte pro Platelets.***J Clin Invest;***115(12)3348-54.

Pattinson, J.K.; Millar, D.S.; McVey,J.H.; Grudy,C.B.; Wieland, K.; Mibashan,R.S.; Martinowitzk,U.;Tan-Un,K.;Nidaud,M.;and Goossens,M.(1990):The molecular Genetics Analysis of haemophilia A:Adirected Search strategy for the Detection of Point mutation in the human Factor VIII gene ***.Blood***;76,11:2242-2248.

Peters,M.F.and Ross,C.A. (2001): Isolation of auok-Da huntingtin-associated protein***.J.Biol.Chem;***276,3188-3194.

Payandeh,M.;Zare,M.E.;Kansestani,A.N.;Mansouri,K.;Rahimi,Z.;Hashemian,A.H.(2011):Protien C and S deficiency in Deep Vein Thrombosis Patients Referred to Iranian Blood Transfusion Organization ,Kermanshah.***International Journal of Hematology Oncology and stem cell Research(IJHOSCR)***;5,2:5-8.

Ramanarayanan,J.(2005):Factor FVII***.eMedicine Specialties.***

Reding,M.T.;Wu,H.;Krampf,M.*et al* (2000):CD4T cells specific to factor VIII as atarget for specific suppression of inhibitor production .In:Monroe D.ed.Haemophilia

Care in New Millennium .***New York,NY:Kluwer Academic /Plenum Publisher***:119-134.

Repesse, Y.;Slaoui, M.;Ferrandiz, D.;Gautier, P.;Costa, C.;Costa, J.M.;Lavergen, J.M.;Borel-Derlon, A. (2007):Factor(FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A:detection of 26 novel mutations and Correlation with FVIII inhibitor development. ***J Thromb Haemost***;5(7):1469-76.

Rich,ME.;Christopher, E. and Nigel, S.(2003):Congenital bleeding disorders***.Hematology***.559-574.

Rijken,D.C. and Lijnen,H.R.(2009):New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system.***J Thromb Haemost***;7:4-13.

Robert,H.R.and Escobar,M.A.(2002): Less common Congenital disorders of hemostasis. In Kitchens C.S., Alving ,B.M.,and Kessler,C.M.,(eds***).Consultative hemostasis and thrombosis***:57-71.

Roelse JC,Delaaf RT,Timmermans SM,et al. (2000): Intracellular accumulation of Factor VIII induced by missense mutations Arg 593_Cys and Asn 618_Ser explains cross reacting material reduced haemophilia A. ***J Haematol***;108:241-6.

Ross,M.T.; Grafham,D.V.; Coffey,A.J.; Scherer,S.; Mclay,K.; Muzny,D.; Platzer,M.; Howell,G.R.; Brurrows ,C.; Bird,C.P.; et al. (2005): The DNA sequence of the human X chromosome .***Nature***;434,325-337.

Rossetti,L.C.; Radic,C.P.; Larripa,I.B. and DE Brasi ,C.D.(2008):Developing anew generation of tests for genotyping hemophila Causative rearrangements involving int22h and int1h hotspot in the factor VIII gene ***J Thromb Haemost***;6:830-6.

Rossiter ,J.P.;Young ,M,Kimberland ,M.L.; Hutter,P, Ketterling,R.P.; Gitschier,J.;Horst,J.;Morris,M.A.;Schaid ,D.J.;Do Moerloose,P. (1994): Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germcells .***Hum.Mol.Genet***; 3,1036-1039.

Rossetti,L.C.;Radic,C.P.;Larripa,I.B. and De Brasi,C.D. (2005) Genotyping the hemophilia Inversion Hotspot by Use of Inverse PCR**.** ***Hemostasis and Thrombosis***;51,7:1154-11.

Rossetti , L.C.; Radic , C.P.; Abelleyro, M.M.; Larripa,I.B. and De Brasi,C.D. (2011)**:** Eighteen Years of Molecular Gerotyping the Hemophilia Inversion Hotspot : From southern Blot to Invers shifting – PCR**.** ***Int.J.Mol.Sci***; 12:7271-7285.

Rossetti,L.C.; Radic,C.P.; Candela, M.; Bianco,R.P.; De Tezanos Pinto,M.; Goodeve,A.; Larripa,I.B.; De Brasi,C.D. (2007): Sixteen novel haemophilia A causative mutations in the First Argentinian series of severe molecular defects**.** ***haematology Journal***;92(06).

Rossetti,L.C.;Goodeve,A.;Larripa,I.B.;DeBrasi,C.D.(2004):Ho meologyous recombinant between AIuSx-Sequences as acause of Haemophilia.***Hum Mutat;***24(5):440.

Russell, K. E.;Eva, H.N.;Robin, A.R.;Elizabeth, P.M.;Dwight, A.B.;Marjorie, S.R.;Bonita, J.R.;James, C.K.;Kyle, P.M.;Robert, G.S.and Timothy, C.N.(2003):Reduced bleeding events with subcutaneous administration of recombinant human factor IX in immune-Tolerant haemophilia B dogs.***Blood.***102(13):3493-4398.

Saad,S.;Rowley,G.; and Tagliavacca,L.(1994):First report on UK database of haemophilia B mutations and pedigrees.UK haemophilia centres.***Thromb Haemost:***71:563-70.

Saenko,E.L.;Ananyeva,N.M.;Kouiavskaia,D.V.;Khrenov,A.V.; Anderson,J.A.;Shima,M.;Qian,J.;Scott,D.(2002):Haemoph ilia A:effects of inhibitory antibodies on factor FVIII Function interactions and approaches to prevent their action ***Haemophilia;***8(1):1-11.

Saenko, E.L.;Shima, M.S. and Fanon, A.G. (1999):Role of activation of the Coagulation FVIII in interaction with vwf, Phospholipid and Functioning with the factor Xase complex. ***Ends Cardio vasc Med***;9(7):185-92.

Salviato, R.;Belvini, D. and Radossi, P.(2007): F8 gene mutation Profile and ITT response in acohort Italian haemophilia A patients with inhibitors. ***Haemophilia;*** 13(4)361-72.

Scandella, D. H.;Nakai, H. and Felch, M.(2001):In Haemophilia A and antibody inhibitors factor VIII A2 domain and light chain are most immunogenic .***Thromb Res.***85.

Scharrer, I.;and Bray, G.L.(1999): Incidence of Inhibitors in haemophilia A patients –areview of recent studies of recombinant and Plasma –derived Factor VIII concentrates. ***Haemophilia;***5(3):145-54.

Schwarts,R.A.;Klujszo,E.;Gascon,P.;Mckenna,R.;Greenberg,C. S.(2012):FVIII. ***Medscape.***

Schwaab,R.;Oldenburg,J.;Lalloz,M.R.;Schwaab,U.;Pemberton,S .;Hanfland,P.(1997):Factor VIII gene mutations found by acomparative study of SSCP,DGGE and CMC and their analysis on amolecular model of factor VIII :protein.***Hum Genet;***101:323-32.

Seligsohn, U.;White, G.C.;Beutler, E.;Lichtman, M.A.;Coller, B.S.;Kipps, T.J.;Williams.(2001):Inherited deficiencies of Coagulation factors II,V,VII,XI and XIII and the combined dificiencies of factors V and VII and of the Vitamin K-dependent factors.***Hematology 6th ed NewYork,NY:McGraw-Hill***;1617-38.

Shatos ,M A.;Orfeo,T. and Doherty, J.M.(1995):Alpha-thrombin Stimulates urokinase production and DNA Synthesis in cultured human cerebral microvascular endothelial cells .Arteriosclerosis ,***Thrombosis and Vascular Biology;*** 15:903-911.

Shetty,S.; , Ghosh,K. and Mohanty,D. (2003): Prenatal Diagnosis in aHaemophilia A Family by Both Factor VIII activity and Antigen Measurements .***JAPI;*** 51.

Sergue,S.;Hammond,D.;Nataly,M.A.;Anderson,J.AM.;Charlotte ,A.E.(2002):Expression of factor VIII in recombinant and Transgenic system.Bloodcells,Molecules and Disease.***Blood***;28(2)234-248.

Shah,M.; DinKhattak,I.U.; Khattak, S.T.; Jan Mahsud,M.A.(2011):Medical conditions associated with prolonged activated partial Thromboplastin time in swat.***Gomal Journal of Medical Sciences;9,1***

Simon,D.; Kunicki,T. and Nugent,D.(2008): Platelet Function defects: ***Haemophilia***; 14(6):1240-1249.

Singh,M. and Singh,P. (2010): Singh Role and Relevance of Factor 8 gene Haplotyping for the Indirect Genetic Analysis of Carrier Diagnosis in Hemophilia .***Journal of Coagulation Disorder***;000:000

Spiegel P.C.;Jacquemin, M. and Saint-Remy, T.M. (2001):Stracture of factor VIII C2 domain immunoglobulin Gukappa F ab complex:identify.cation of antibody epitope surface of factor VIII***.Blood;***98(1):13-9.

Spiegel, PC.;Murphy, P. and Stoddard, BL.(2004):surface-exposed haemophilic mutations across the factor VIII C2 domain have variable effects on stability and binding activities ***.J Biol Chem***.;17;279(51):53691-8.

Steffel, J.;Luscher, T.F. and Tanner, F.C.(2006):Tissuse factor in cardio Vasculardisease.molecular mechanisms and Clinical implications .***Circulation;***113(5):722-731.

Talib,V.H.(1996):Ahandbook of medical laboratory technology,W.H.O.CBS**.**Publishers and Distributors.

Tavassoli,K.;Eigel, A.;Wilke,K.;Pollmann,H.;Horst,H.(1998):Molecular diagnostics of 15 hemophilia A patients:Characterization of eight novel mutations in

the factor VIII gene,two of Which result in exon Skipping.***Hum Mutat***;12:301-3.

Tantawy,A.A.(2010):Molecular genetics of Haemophilia A:Clinical perspectives .***The Egyption Journal of Medical Human Genetics***;11:105-114.

Theophilus, B.D.;Enagat, M.S.; and Williams, M.D.(2001):Site and Type of mutation in the Factor VIII gene in Patients and Carriers of Haemophilia A***.Haemophilia***;7(4):381-91.

Thiagarajan, P.;Seiter,K.;Talavera,F.;Besa,C.E. (2013):Platelet Disorders Overview of Platelet Disorders.***Medscape***

Thrompson, A.R. (2003): Structural and Function of the factor VIIIgene and Protiens. ***Semin Thromb Hemost***; 29(1):11-22**.**

Tizzeno ,E.F.;Domenech,M. and Baiget,M. .(1995): Inversion of intron 22 in isolated cases of severe hemophilia A***.Thromb.Haemost***,73:6-9.

Tuddenham, E. and Cooper, D.N.(1994):Factor VIII and Haemophilia A.Oxford Monographs on ***Medical Genetics***;25:19-76.

Tuddenham,E.G.D.; Schwaab,R.; Seehafer,J.; Millar,D.S. (1994):Haemophilia A: database of nucleotide substitutions deletions ,insertion and rearrangement of

FVIII gene. ***second edition Nucleic Acid Research*** 22, 17:3511-3533**.**

Turgeon, M. L.(2004):Clinical Hematology Theory and procedures.4th edition:381.

Valentijn.K.M.;Sadler,J.E.;Valentijn,J.A.;Voorberg,J.;Eikenboo m,J. (2011): Functional Chitecture of Weibal–paladebodies: ***Blood*** ;12;117(19): 5033-43.

Valleix,S.; Jeanny,J.C.; Elsevier,S.; Joshi R.L.; Fayet ,P.; Bucchini,D.; Delpech,M. (1999): Expression of human F8B,agene nested within the Coagulation Factor VIII gene .produces multiple eye defects and developmental alterations in chimeric and transgenic mice ***.Hum.Mol.Genet***; 8,1291-1301.

Van den Biggelaar ,M.;Bierings, R.;Storm. G.;Voorberg, J.;Mertens,K. (2007): Requirementa for cellular Co.trafficking of factor FVIII and Vonwillebrand Factor to Weibel–Palade bodies. ***J.Thrombhaemost***,5:2235-42.

Van den Biggelaar,M.;and AM.Bouwens,E.(2011):Storage of factor VIII variants with impaired von Willebrand factor binding in Weibel Palade bodies in Endothelia cells.***PLosONe***.6(8):24163.

Vander Bom, J.G.;Mauser-Bunschoten, E.P.;Fisher, K.;Vander Bery, H .M.(2003):Age at first treatment and immune tolerance

to factor VIII in severe Haemophilia***.Thromb Haemost***.89:475-479.

Vehar,G.A.;Keyt,B.;Eaton,D.;Rodriguez,H.;O Brien,D.P.;Rotblat,F.;Oppermann,H.; Keck,R.;Wood,W.I.;Haekins,R.N.;Tuddenham,E.G.;La wn,R.M.;Capon,D.J. (1984): Structural of human factor VIII**.** ***Nature***: 312:337-342.

Vidal,F.;Elisenda,F.;and Carme,A.(2001):Rapid hemophilia A molecular diagnosis by asimple DNA sequencing procedure:identification of 14 novel mutations.***Thromb Haemost***;337:580-3.

Vogelstein,B. and Gillespie,D.(1979):Preparation and analytical Purification of DNA from Agarose.***Proc Natl Acad Sci USA*** ;76(2):615-619.

Wang, X.F.; Zhao, Y.Q.; Yang, R.C .(2010): The prevalence of Factor FVIII inhibitors and genetics aspects of inhibitor development in Chinese patients with haemophilia A**.** ***Haemophilia*** ; 1.16(4):632-9.

Wassem,N.H.;Bagnall,R.;and Green,P.M.(1999):Start of UK confidential haemophilia A database:analysis of 142 patients by solid phase fluorescent chemical cleavage of mismatch.Haemophilia centers.***Thromb Haemost***:81:900-5.

Yossounfian, H.;Kazazian, HH Jr.;Philips, D.G.;Aronis, S.;Tsiftis, G.;Brown, V.A.;Antonarakis, S.E. (1986):Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. ***Nature*** ; 324:308,

المعاجم

World Health Organization (WHO) ,The Unified Medical Dictionary (UMD) ,WWW.emro.who-nit/ Unified-Medical-Dictionary .html

سلامة ،ميرفانا ياسر ،معجم الأحياء (التعريفات العلمية)، دار الصفاء للطباعة والنشر والتوزيع ، عمان ، الطبعة الأولى ٢٠١٠ .

ملحق رقم (١)

Patient Information Sheet

File No. Date of first registry

الإسم الرباعي : اللقب :

تاريخ الولادة : محل الولادة : الجنس:

العمر عند التشخيص: الجنسية :

التحصيل الدراسي: المهنة:

إسم الأب : إسم الأم:

التحصيل الدراسي : التحصيل الدراسي:

المهنة: المهنة:

العنوان: المدينة:

المحلة: الزقاق: رقم الدار: الهاتف:

Diagnosis

Deficient Factor level

Viral Status inhibitor Status

Blood Group

Age at diagnosis type of bleeding

Age at onset of bleeding type of bleeding

Bleeding History

Bleeding at brith	Hematuria
Bleeding after vaccination	GI bleeding
Joint bleeding	Menorrhagia
Skin bleeding	bleeding after operation
Muscle bleeding	bleeding after trauma
Epistaxis	Tooth or gum bleeding

ملحق رقم (2)

Clinical Data Sheet

إسم المريض : التشخيص:

Parental Consanguinity No: Yes:

Family history of bleeding disorder

Father: Mother: Siblings: Male: female:

Mother side: Cousin: Grandfather: GrandMother: Uncle:

Aunt:

Father side: Cousin: Grandfather: GrandMother:
Uncle: Aunt:

Other family members:

Maternal history of abortion: Yes: No:

Family history of death due to bleeding: Yes: No:

Social history:

School attendance: Regular: Irregular: Leave School Why:

School performance: Good: school absence: School failure:

Target Joint	Right	Left
Knee		
Ankle		
Elbow		
Shoulder		
Hip		
Wrist		

ملحق رقم (٣)

Diagnostic technique (check all that apply) Reason for diagnostic

Clinical symptoms only:

Screening test only:

Specific factor assay:

Unknow :

Others:

Treatment type:

On demand:

Prophylaxis:

Others:

Bleeding symptoms:

Other family history:

Mother is Know carrier:

Unknow:

Others:

Treatment products used:

FFP:

Cryoprecipitate:

Platelets:

Factor concentrates:

Summary

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

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

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

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

in most groups patients with disease Haemophilia type A and especially that all the groups affected by type of severe and that the fact that the concentration of the effectiveness factor blood clotting VIII is less than 1%.

DNA was extracted and the results of estimating the concentration and purity of purified DNA ranged between 60.000,50,000,35.000 ug The purity ranged between (1.7-2) and demodulation for the purpose of the analysis was disease-causing mutation technology (IS-PCR) and characterized this technique as a quick and Technology gave us the results within 24 hours .

The results of the analysis of mutations have indicated that the the intron coup boom 22 (Inv22type I) has formed a percentage 31.8% and frequency doubled five times higher mutation frequency Inv22 type II which formed the percentage 4.55% The reason that the distal tip be closer as we head towards the telomere (Part Terminal for chromosome) and this is the reason coups Alginyum and the loss of more than 50bp from Jane factor VIII and this kind of re-union replication occurs frequently as we head towards the telomere Factor VIII. While The results of the analysis of mutations have indicated that the intron 1 has formed apercentage 9.09% .

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

Genetic Study of Patients Haemophilia A

A thesis

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

(Zoology)

By
Hind Taher qader Al-najar
B.Sc.Biology

Supervised by
Assis.Prof.Dr.Hameed M.Majeed **Dr. Mothana Abdel –Qader AlMahdawy**

2013 ***1434***