



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

دور بعض المعايير الفسلجية وعلاقتها بتعدد الأشكال الوراثية
لجين بيتا كلوبيين و جين مستقبل فيتامين D في مرضى التلاسيميا
في محافظة ديالى

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من
متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من الطالب
نبراس مجيد رشيد

بكالوريوس علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2008

بإشراف
أ.د. عمار أحمد سلطان القره غولي

**Ministry of Higher Education And
Scientific Research University of Diyala
Collage of Education for Pure Sciences
Detartment of Biology**



**The role of some physiological parameters and
their relationship to genetic polymorphisms of the
beta-globin gene and the vitamin D receptor gene
in thalassemia patients in Diyala Governorate**

A Thesis Submitted to the Council of College of Education for
Pure Sciences / Diyala University In Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of Science In Biology

By

Nibras Mageed Rashid

B.Sc.Biology/ College of Education for Pure Sciences / Diyala
University 2008

Supervised by

Professor. Dr Ammar Ahmed Sultan

1445 A.H.

2024 A.D

Summary

Summary

Thalassemia is a heterogeneous group of genetic disorders that are caused by a decrease in the construction of alpha or beta chains of hemoglobin, hemoglobin acts as an oxygen-carrying element of red blood cells, consisting of four peptide chains 2 alpha and 2 beta, if the body does not make enough of one of these two chains, red blood cells do not form properly and cannot carry enough oxygen; causes anemia, which begins in early childhood and lasts throughout life .The current study aimed to investigate the role of some hematological, physiological, biochemical and molecular indicators on the risk of developing beta-thalassemia in the Diyala community .the study included 50 patients with beta-thalassemia during the period between August 2023 and until February 2024, whose ages ranged from (2-31) years, as well as 50 healthy people without genetic blood diseases as a control group aged(1-35) years.

The results of the study showed a significant increase in the rate of values of blood indicators for patients regardless of gender : indicators recorded White Blood Cells, lymphocytes, Platelet Count, Mid – Range Absolute Count, Red Cell distribution Width - Anemia, ratio Platelet Large Cell, Procalcitonin, elevated levels in patients((13.07 ± 5.99 VS 7.51 ± 2.19 , ± 2.67 vs 3.04 ± 1.06) 7.01) 0.8 ± 0.25 vs 0.45 ± 0.21)) \cdot (69.94 ± 10.02 VS 53.94 ± 11.86), 459.30 ± 188.80 VS 276.26 ± 54.09) (\cdot (30.68 ± 12.37 VS 24.59 ± 8.76), (0.47 ± 0.19 VS 0.24 ± 0.07) respectively. As for the indicators of Red Blood Cells, Hemoglobin, Hematocrit, Mean Corpuscular Volume, low levels were recorded in patients 2.86 ± 0.64 VS 4.62 ± 0.52)) \cdot (7.90 ± 1.48 VS 13.07 ± 1.46), (22.20 ± 4.62 VS 39.13 ± 4.23), (77.42 ± 6.20 VS 82.74 ± 6.20) respectively

Summary

while, we found no statistical differences between the indicators of Granulocytes, Hemoglobin Mean Corpuscular, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, Mean platelet volume blood is in two Study Groups: A patient sample and a healthy control sample. The results also showed a significant decrease in the average values of biochemical indicators and the study groups, as the indicators Calcium and Vitamin D3 recorded low levels in patients 7.72 ± 0.86 VS 8.96 ± 0.63) , (12.13 ± 3.22 VS 28.21 ± 11.56) compared to healthy people. As for ALKaline phosphatase, it recorded high levels in patients (194.68 ± 56.07 VS 120.74 ± 44.50) compared to healthy ones. While, we found no statistical differences between the indicators Total protein and Potassium in the two study groups: patient sample and control sample and healthy. When dividing the disease samples based on the influence of gender on the biochemical indicators in patients, the results of the current study show high levels of ALP and Vitamin D3 in males VS 9.19 ± 3.40 14.64 ± 4.18) , (211.15 ± 55.39 VS 175.35 ± 62.28) compared to females and with significant statistical differences ($p < 0.05$). As for Total protein, Potassium, and Calcium, there was no significant effect of gender on these indicators, the results of the ROC curve showed that the indicators ALP and Vitamin D3 recorded the highest sensitivity (80% and 78%) and specificity (70% and 52%) at the intersection (112.5 and 10.68) in the diagnosis of thalassemia patients and with significant statistical differences ($P < 0.05$) compared to other indicators that recorded low sensitivity and specificity. The results of the current study showed that there is a significant influence of age ($p < 0.05$) on ALP levels in patients, with the highest ALP level (55.29 $227.56 \pm$) recorded in the age group 11-20 years and the lowest level (73.00 ± 0.00) in the age group 31-40

1.1 المقدمة Introduction

الثلاسيميا هي مجموعة غير متجانسة من الاضطرابات الوراثية التي تنتج عن انخفاض بناء سلاسل ألفا أو بيتا من الهيموجلوبين (Hemoglobin) ، يعمل الهيموجلوبين كعنصر يحمل الأوكسجين في خلايا الدم الحمراء ، ويتكون من أربع سلاسل ببتيدية 2 ألفا و 2 بيتا ، إذا لم يصنع الجسم ما يكفي من أحد هذين السلسلتين، فإن خلايا الدم الحمراء لا تتشكل بشكل صحيح ولا يمكنها حمل كمية كافية من الأوكسجين؛ مما يسبب فقر الدم ، الذي يبدأ في مرحلة الطفولة المبكرة ويستمر طوال الحياة إنَّ الثلاسيميا مرض وراثي، أي أنه يجب أن يكون أحد الوالدين على الأقل بدون أعراض ، وينتج إما عن طفرة جينية أو حذف أجزاء معينة من الجينات الرئيسية (Ali وآخرون ، 2021).

هناك نوعان من الثلاسيميا : هما الثلاسيميا ألفا Alpha thalassaemia ، ويحدث بسبب تعطيل عمل الجين ألفا جلوبين مما يؤدي إلى انخفاض أو غياب إنتاج سلاسل ألفا جلوبين Alpha-globin chains. يحتوي جين ألفا جلوبين على 4 أليلات وتتراوح شدة المرض من خفيفة إلى شديدة اعتماداً على عدد عمليات حذف الأليلات (Musallam وآخرون ، 2023) وثلاسيميا بيتا Beta thalassaemia التي تنتج من طفرات نقطية في جين بيتا جلوبين beta-globin gene تقسم بيتا إلى ثلاث فئات بناءً على الزيجوتية zygoty لطفرة جين بيتا. تؤدي الطفرة المتغايرة الزيجوت heterozygous mutation (بيتا بلس ثلاسيميا beta-plus thalassaemia) إلى ثلاسيميا بيتا الصغرى إذ يكون إنتاج سلاسل بيتا ناقصاً . أما بيتا ثلاسيميا الكبرى Beta thalassaemia major فتتجم عن طفرة متماثلة الزيجوت homozygous mutation (ثلاسيميا بيتا صفر beta-zero thalassaemia) في جين بيتا جلوبين، مما يؤدي إلى الغياب التام لسلاسل بيتا وتسمى الحالة

الواقعة بين هذين النوعين بيتا ثلاسيميا المتوسطة beta-thalassemia intermedia مع أعراض سريرية خفيفة إلى متوسطة (Lee وآخرون، 2022) .

إنَّ للحديد الزائد Excess iron دور مهم في تحفيز المزيد من الجذور الحرة Free Radicals المسؤولة عن نخر Necrosis العديد من الأعضاء لدى العديد من مرضى الثلاسيميا. هناك العديد من الدراسات التي أشارت إلى أهمية خفض مستوى الحديد عن طريق العلاج بالاستخلاب Chelation therapy. عدم التوازن يجعل الأوكسجين التفاعلي يسبب تسمم الخلايا Cytotoxicity (Faiq وآخرون، 2022). أظهر الباحثون انخفاضاً في مستويات الهيموجلوبين والهيماتوكريت وكريات الدم الحمراء و Mean corpuscular volume test لدى المرضى الذين يعانون من الثلاسيميا بيتا مقارنةً بالأشخاص الأصحاء (Gharehdaghi وآخرون، 2023). أظهرت دراسة حديثة أن عمليات استئصال الطحال Splenectomies قللت من متطلبات نقل كريات الدم الحمراء في مجموعة من مرضى الثلاسيميا المعتمد على نقل الدم -transfusion dependent thalassemia (TDT) (Osataphan وآخرون، 2023).

سبق أن تبين إنَّ إنزيمات ناقلة الأمين Transaminase enzymes في الكبد يمكن أن ترتبط بمستوى الفيريتين خاصة عندما يتجاوز فيريتين المصل 1000 نانوغرام / لتر (Faisal وآخرون، 2022). أظهر الباحثون زيادة كبيرة في مستويات Alkaline phosphatase والبيليروبين بين مرضى الثلاسيميا بيتا مقارنةً بالأصحاء (Jwaid و Gata، 2020) ، وقد يرجع السبب إلى أن نشاط هذا الإنزيم يعمل على قطع مجموعة الفوسفات الموجودة بالعظم مما يسبب ذوبان وتخر العظام، إذ يعاني مرضى الثلاسيميا من تدمير هذه الأنسجة (Marbut وآخرون، 2020).

من خلال عمليات نقل الدم المنتظمة Regular blood transfusions وإعطاء مخليبات الحديد (Deferoxamine) iron chelators، تتم إدارة المرضى بشكل جيد وتزداد longevity أعمارهم (Hashemieh ، 2020) إلا أن تراكم الحديد في أنسجة الأعضاء بما في ذلك الغدد الصماء ونخاع العظام يؤدي إلى تدمير هذه الأعضاء أو تعطيل وظيفتها (Hamidpour وآخرون ، 2022). أظهرت الدراسات لمجموعة الباحثين انخفاضاً في مستويات البوتاسيوم والبروتين الكلي والكالسيوم وفيتامين D لدى مرضى التلاسيميا بيتا مقارنة بالاصحاء Gharehdaghi و Yasuj ، (2023) (Naghshi وآخرون ، 2020). إن أحد مضاعفات مرض التلاسيميا هو نقص كالسيوم الدم Hypocalcemia الدم الذي يصاحبه تتمل وتشنج عضلي وانخفاض الكالسيوم في الدم وتراكم كميات عالية من الكالسيوم في أنسجة الجسم منها الجمجمة والعظام مما يؤدي الى تصلب هذه الأنسجة. إن نقص كالسيوم الدم Hypocalcemia يمكن أن يؤثر على مرضى التلاسيميا عبر آليات مختلفة . وبعد الحمل الزائد للحديد المرتبط بنقل الدم والمستقل عن نقل الدم Transfusion-related and transfusion-independent iron overload ، والآثار الجانبية للأدوية، ونقص فيتامين D3، والاضطرابات الوراثية وتعدد الأشكال من بين مسببات نقص كالسيوم الدم في مرضى التلاسيميا الكبرى (Bahadoram وآخرون ، 2023).

يتم إنتاج بروتين بيتا جلوبين β -globin protein (HBB) وهو أحد الوحدات الفرعية للهيموجلوبين بواسطة تشفير الجين بيتا جلوبين *HBB* الموجود على الذراع القصير P للكرموسوم 11 بحجم 1.6 كيلو قاعدة ، ويتكون من ثلاث أكسونات (Origa ، 2017) في العراق، كشف التحليل الجزيئي لمرضى التلاسيميا ألفا وبيتا عن عدة طفرات في جين *HBB* بما في ذلك طفرات الإزاحة والحذف والاستبدال في المجتمع الذين ثبتت إصابتهم بنوع بيتا تلاسيميا. يمكن أن يكون هذا

الفحص مفيداً في الاستشارة الوراثية قبل الزواج وفي اتخاذ تدابير الوقاية والعلاج في جنوب العراق إذ يشكل مرض الثلاسيميا الكبرى مصدر قلق بالغ (Al-Musawi وآخرون ، 2022).

يمثل مستقبل فيتامين D Vitamin D receptor D عامل النسخ النووي الذي ينظم تصنيع البروتينات التي تساهم في توازن المعادن في العظام وتكاثر الخلايا يوجد جين *VDR* على الكروموسوم 12 (q12-q14) ويتكون من 11 إكسوناً و 10 أنترونات يمتد حجم *VDR* من 75 إلى 100 كيلو قاعدة. يحتوي الطرف غير المشفر 5 للجين *VDR* على مناطق من الإكسونات 1a و 1b و 1c (Al- Eisa و Haider ، 2016) يتم تشفير بروتين *VDR* المترجم بالإكسونات من 2 إلى 9. تلعب الإكسونات 7 إلى 9 دوراً حاسماً في ربط مستقبل فيتامين D (Zhou وآخرون ، 2009)

1. 2 الهدف من الدراسة Aim of study

هدفت الدراسة الحالية إلى :-

- 1- التحري عن تأثير بعض المؤشرات الفسلجية والدموية والكيموحيوية .
- 2 - تأثير تعدد الأشكال الوراثية لجيني *HBB* و *VDR* على خطر الإصابة بمرض بيتا ثلاسيميا .
- 3 - قياس مستويات المؤشرات الدموية والكيموحيوية والفسلجية في مرضى بيتا ثلاسيميا ومقارنة نتائجها مع الأصحاء .
- 4 - تضخيم كل من الجينين *HBB* و *VDR* باستعمال تقنية PCR وعمل تسلسل نيوكليوتيدي لنتائج التضخيم للكشف عن تعدد الأشكال الوراثية للجينين وعلاقتها بخطر الإصابة بالمرض .