الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الطب البشري

قسم الطب المخبري

تحديد النمط المورثي لعامل الريزوس RHD الجنيني لدى الحوامل سلبية RHD بطريقة غير باضعة باستخدام DNA الجنيني الحر الجائل في البلاسما الوالدية

أطروحة علمية أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الكيمياء الحيوية الطبية والبيولوجيا الجزيئية

في قسم الطب المخبري.

إعداد طالبة الدكتوراه

د. أحلام محمود حميد

إشراف

أ.د تهاني علي

إشراف مشارك

د. رامي جرجور

2020

الإهداء

أَبي ... غِبْتَ جَسَداً... لكنَّ روحكَ مَعي دوماً

أُمي .... أَيقونةُ الحبِّ وَرَمزُ العطاءِ

زوجي الغالي وسيم .... رفيقُه الدربِ .... معكَ يتحقّقُ الحلم

أبنائي الَّذينَ تحملوا معي قسوةَ الأيام .....

إخوتي وَ أَخواتي.... الَّذين شاركوني الحياةَ حلوها وَمُرَّها

صديقاتي اللّاتي كنَّ خيرَ مَنْ جادَ بهمُ الزمانُ لي

لا بد لي وأنا على مفترقِ طريقٍ طَويل، أَنْ أَعترِفَ كمْ كانت الرحلة شاقة، متعبة، لكنها كانت على الرغم من كل ذلك ممتعة، وكانت لهفتي لخوض غمار المجهول شيئاً جميلاً رغم الصعاب، مدت خلال هذا الطريق لي ايادٍ لن انساها ساعدتني وأمدتني بالطاقة لاكمل المسير.

الشكر المفعم بأجمل عبارات الود لأستاذتي القديرة د.تهاني علي التي آمنت بقدراتي ورافقتني بكل تفاصيل العمل.

الشكر الجزيل لد.رامي جرجور لما أبداه لي من نصائح وإرشادات أغنت البحث.

الشكر الجزيل للأستاذ الدكتور مروان الحلبي، والأستاذ الدكتور محمد عماد خياط، والاستاذة الدكتورة عبير الكفري، والأستاذ الدكتور وليد الأشقر لتفضلهم بالمشاركة في لجنة الحكم.

الشكر الجزيل لأساتذتي في قسم الطب المخبري.... كنتم لي خير سند لي.

الشكر الكبير للطاقم المخبري في مشفى التوليد الجامعي، ومخبر زرع الخلايا الجذعية في مشفى الأطفال، وفي قسم البيولوجيا الجزيئية و التقانة الحيوية في هيئة الطاقة الذرية.

الشكر الكبير للكادر التمريضي في مشفى التوليد الجامعي، وطلاب الدراسات العليا الذين رافقوني في مرحلة جمع العينات في مشفى التوليد الجامعي.

فهرس المحتوى	الصفحة
الإهداء	IV
رسالة شكر	V
فهرس المحتويات	VI
قائمة الاشكال	IX
قائمة الجداول	XI
قائمة المخططات	XIII
قائمة الاختصارات	XIV
الملخص باللغة العربية	XVI
المقدمة: introduction	1
الباب الأول: القسم النظري	2
الفصل الاول : نظام الريزوس RH	3
1-1 مقدمة	4
1-2 مستضدات نظامRH	4
1-3 البنية الكيميائية لمستضدات نظام RH	5
1-4 الجينات المرمزة لمستضدات RH	8
1-5 الأساس المورثي للنمط الظاهري RhD السلبي	9
1-6 الأساس المورثي للنمط الظاهري RhD الإيجابي	11
1-7 أضداد نظامRH	12
الفصل الثاني: الدّاء الانحلالي لدى الأجنّة والولدان HDFN الناتج عن عدم التّوافق الجنيني الوالدي بـ RHD	**14**
2-1 التعريف	15
2-2 الآلية الأمراضية لRHD-HDFN	15

2-3 التّظاهرات السّريريّة لـHDFN -RHD	18
2-4 العوامل المؤثرة على شدة الدّاء الانحلالي HDFN RHD	21
2-5 التّوارد Incidence	22
2-6 التشخيص والمتابعة لحالات التّمنيع لدى الحوامل سلبياتRHD	24
2-7 الوقاية منRHD-HDFN	34
الفصل الثالث :DNA الجنيني الجائل في الدوران الوالدي	36
3-1 مقدمة	37
3-2 مصدر ccffDNA في بلاسما الأم	38
3-3 التوّزع الحجمي للحمض النووي للأم والجنين	40
3-4 المتغيرات التي تؤثر على عزل ccffDNA	44
3-5 طرائق عزلccffDNA	45
3-6 تصفية ccffDNA من الدّوران الوالدي	46
3-7 التّطبيقات السّريريّة ccffDNA في مجال التّشخيص ما قبل الولادة	47
7-3-1 تحديد الجنس	49
7-3-2 تحديد زمرة دم RHD الجنين قبل الولادة باستخدام ccffDNA في سياق متابعة الداء الانحلالي لدى الجنين و الوليد HDFN	51
الباب الثاني: الدّراسة العمليّة	45
الفصل الأول: أساس البحث	55
1- أهمية وخلفية البحث	55
2- الهدف من البحث	55
الفصل الثاني: مواد البحث وطرائقه	56
1- تصميم الدراسة	56
2- مكان وزمان الدراسة	56
3- عينة الدراسة	58
4- حجم العينة	58
5- طرائق جمع البيانات	59

6- خطة العمل	59
7- طرائق إجراء الاختبارات المخبرية	60
8- ضبط الجودة	47
9- التحليل الاحصائيStatistical analysis	74
الباب الثالث: النتائج	75
أولا :الدراسة الوصفية للحوامل المشتملات في الدراسة	80
ثانيا: دراسة العلاقة بين حدوث وتطور شدة التمنيع مع متغيرات (توافق ABO بين الأم والطفل) وترتيب الحمول والوقاية ب Anti-D.	18
ثالثاً: مقارنة نتائج التنميط المورثي الجنيني لكل من الجين *RHD –RHCE* مع التنميط الظاهري لزمرة RhD لحديثي الولادة	88
رابعاً: دراسة العلاقة بين نتائج التنميط المورثي RHD الجنيني مع محصول الحمل	94
الباب الرابع : المناقشة	96
أولاً: مناقشة نتائج الدراسة الحالية	96
ثانياً: مناقشة نتائج الدراسة الحالية مع الأبحاث المقارنة	101
الباب الخامس : الاستنتاجات	081
الباب السادس : المقترحات والتوصيات	111
الباب السابع :المراجع	113
الملحق (1) صورة الاستبيان	129
الملحق (2) الموافقة المستنيرة للمرضى المشاركين في البحث	130
الملحق (3) تأكيد تسلسل البادئات المستخدمة في تضخيم الجين *RHD*، RHCE باستخدام برنامج PRIMER -BLAST	131
الملحق (4) تأكيد تسلسل البادئات المستخدمة في تضخيم الجين SRY باستخدام برنامج PRIMER –BLAST	132
ABSTRACT	134

قائمة الأشكال

الشكل	العنوان	الصفحة
1	وجود المستضد RhD على سطح الكرية الحمراء أو غيابه	5
2	تركيب مستضدات نظام RH	6
3	الطراز الجزيئي لبروتين RHD أو RhCE	7
4	رسم تخطيطي لموضع *RHD* و*RHCE*	9
5	مخطط يمثل 10 اكسونات في كل من الجين *RHCE*–RHD	10
6	رسم تخطيطي لموضع الجين Rh على الصبغي 1	12
7	الآلية الإمراضية للداء الانحلالي للجنين والوليد	16
8	الموجودات الصدوية عند الجنين المصاب ب HDFN	19
9	مقطع عرضي في مستوى المعدة يوضح تجمع السوائل المرضي في المنطقة البطنية (الحبن)	19
10	مقطع طولاني يوضح انصباب التامور بالمراقبة بالتصوير بفائق الصوت	19
11	الدّاء الانحلالي عند الوليد	21
12	مقطع عرضي عبر الجزء العلوي من بطن الجنين بالتصوير فائق الصدى للجنين قبل الولادة	25
13	قياس السعة الانقباضية بوساطة دوبلر الشريان المخي المتوسط (MCA–PSV) وفق العمر الحملي	27
14	تصوير بإيكو دوبلر المقطعي الملون للدماغ الجَّنيني	28
15	يبين طريقة اخذ العينة في مرحلة قبل الولادة من سائل السّلى	29
16	مخطط ليلي	30
17	مخطط Queenan	30
18	اعتيان دم الجنين الحبل السري عبر الجلد	32
19	يبين طريقة اخذ اعتيان الزّغابات المشيميائية عبر المهبل	32

20	مصدر Cell-free DNA في الدم المحيطي للام الحامل	39
21	رسم تخطيطي يوضح الزّغابات المشيمائية الأولية	40
22	العوامل المؤثرة على كل من ال ccffDNA-cfDNA	44
23	المتابعة المتسلسة للتسلسل النكليوتيدي لجين SRY المشتق من الجنين في بلازما النساء بعد الولادة القيصرية	47
24	اختبار IAT: A نتيجة سلبية لاختبار IAT - B: نتيجة إيجابية لاختبار IAT	61
25	العتيدة المستخدمة لاستخلاص ccffDNA	63
26	محتويات العتيدة المستخدمة في عزل g DNA	65
27	مراحل استخلاص ccffDNA باستخدام العتيدة QIAamp DSP VIRUS	67
28	شكل توضيحي يبين مراحل الاستخلاص اليدوي ل gDNA	68
29	هلام الاغاروز + إضافة مادة الايثيديوم بروماید	68
30	قياس تركيز DNA بوساطة جهاز Nanodrope	69
31	نتيجة قياس تركيز gDNA	69
32	جهاز المدوار الحراري- خيمة لاضافة DNA	72
33	وزن الهلام باستخدام ميزان حساس	72
34	إضافة مادة الايثيديوم بروماید الى الهلام	72
35	جهاز الترحيل على الهلام مع وحدة التغذية	73
36	نتائج دوبلر الشريان المخي المتوسط لسيدتين	84
37	نتائج تضخيم كل من الجين *RHD-RHCE* بعد اظهارها بواسطة UV (1)	88
38	نتائج تضخيم كل من الجين *RHD-RHCE* بعد اظهارها بواسطة UV(2)	89
39	نتائج تضخيم *SRY* بعد اظهارها بواسطة UV	89

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1	تواتر المستضد RHD	10
2	الاختلافات بين طرائق التشخيص الباضعة	32
3	توصيات ACOG في تقديم الوقاية ب Anti-D	35
4	محتويات العتيدة QIAamp DSP Virus Spin	62
5	محتويات العتيدة QIAamp DNA blood mini	65
6	المشرعات المستخدمة في تنميط الجين *RHCE*، *RHD*	70
7	تسلسل المشرعات المستخدمة لتضخيم شدفة من جين *SRY*	71
8	تفسير النتائج المخبرية	73
9	توزع السّيدات الحوامل وفقا للعمر الحملي	77
10	توزع السّيدات الحوامل حسب عدد الحمول	78
11	ارتباط حدوث التّمنيع مع الوقاية ب Anti-D	80
12	توزع السيدات عديدات الولادة بالنسبة للوقاية بanti-D	81
13	نتائج زمرة ABO المواليد	81
14	يبين العلاقة بين حالة التّمنيع وتوافق نظام ABO	82
15	توزع العينة حسب سوابق الموه الجنيني أو فقر دم انحلالي عند الوليد	83
16	توزع الحالات بالنسبة للموجودات الصدوية في الحمل الحالي	83
17	نتائج قياس MCA-PSV للسيدات المحسسات	85
18	يوضح عدد الحمول وتوزعها حسب حالة التمنيع	86
19	نتائج تحديد الجنس والتنميط المورثي RHD قبل الولادة باستخدام ccffDNA	88
20	يوضح تحديد النمط الظاهري RhD بعد الولادة	90
21	نتائج تحديد الجنس بعد الولادة	90

22	يبين الحساسية والنوعية لاختبار تحديد RHD بواسطة ccffDNA	91
23	ربط نتائج تحديد جنس الجنين والنمط المورثي RHD الجنيني وفق توزع العمر الحملي لدى السيدات المحسسات	92
24	ارتباط التنميط المورثي RHD مع محصول الحمل الحالي لدى الحوامل المحسسات	93
25	ارتباط التنميط المورثي RHD مع محصول الحمل الحالي لدى الحوامل غير المحسسات	94

قائمة المخططات

رقم المخطط	عنوان المخطط	رقم الصفحة
1	توزع السّيدات الحوامل وفقا لعمر الحمل	77
2	توزع الحالات بالنسبة للتمنيع ب أضداد Anti-D	79
3	توزع الحالات المحسسة وفقا لعيار الضد Anti-D	79
4	نتائج التنميط المورثي RHD قبل الولادة بواسطة ccffDNA	87
5	نتائج تحديد الجنس قبل الولادة بواسطة ccffDNA	87

قائمة المختصرات

AABB	American Association of Blood Banks
ABO	ABO Blood System
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
Anti-D	antibody against D antigen
bp	Base pairs
CAH	Congenital adrenal hyperplasia
ccfDNA	circulating cell-free DNA
ccffDNA	circulating cell-free fetal DNA
CVS	Chorion villus sampling
DAT	Direct Antiglobulin Test
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic
FMH	Feto-Maternal Hemorrhage
HDFN	Hemolytic Disease Of The Fetus And Newborn
H.S.C.T	Hematopioetic Stem Cell Transplant
HPC	Hematopoietic Progenitor Cells
IAT	Indirect Antiglobulin Test
Ib	Indirect Bilirubin
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
ISBT	International Society of Blood Transfusion

Iut	Intrauterine Transfusion
MCA-PSV	Middle Cerebral Arterial Peak Systolic Velocity
Mom	Multiples Of Medians
NGS	Next Generation Sequencing
NIPT	Non-Invasive Prenatal Testing
Qt-PCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RAAPD	Routine Antenatal Anti-D Prophylaxis
RBCs	Red Blood Cell
RHD	Rhesus Genotype
RhD	Rhesus phenotype
SAFE	Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation
SMFM	Society for Maternal-Fetal Medicine
SPSS	statistical package for social science
SRY	Sex-Determining Region
STR	Short Tandem Repeats
TPE	Therapeutic Plasma Exchange
UCB	Umbilical Cord Blood

الملخص

"تحديد النمط المورثي لعامل الريزوس RHD الجنيني لدى الحوامل سلبية RhD بطريقة غير باضعة باستخدام DNA الجنيني الحر الجائل في البلاسما الوالدية"

خلفية البحث وهدفه: يعد التّمنيع الجنيني الوالدي بـanti-D النّاتج عن عدم التّوافق الجنيني الوالدي بنظام RHD السّبب الأهم والأكثر شيوعاً لحدوث الدّاء الانحلالي للأجنّة والولدان HDFN في العديد من دول العالم، ويعدّ التنبؤ الدّقيق بالنمط الوراثي RHD الجنيني باستخدام DNA الجنيني الحر الجائل في الدم المحيطي للأم، من أهم التطورات الحديثة غير الباضعة المستخدمة في تشخيص وتدبير الدّاء الانحلالي لدى الأجنّة والولدان، بديلاً عن الإجراءات الباضعة مثل بزل السّلى ، أو أخذ عينات من الزّغابات المشيميّة.

تهدف هذه الدّراسة إلى تقييم التّوافق بين تحديد النمط المورثي RHD الجنيني بواسطة PCR التقليدي باستخدام ccffDNA من الدّم المحيطي للأمّ، والنمط الظاهري RhDلحديثي الولادة.

الطرائق: أجريت هذه الدّراسة في مستشفى التوليد الجامعي في دمشق على 60 امرأة حامل سلبية RhD بفترات حملية مختلفة تتراوح بين 7 –38 أسبوعاً من الحمل (6.29±23.43)، وذلك في الفترة الممتدة من 2018/10–10/ 2019، وقد اسُتبعدت الحمول التوأمية، وكذلك الحمول المختلطة بحالة ما قبل الارتعاج، ومن يعانين من أدواء مناعية .

وقد تمّ استخلاص ccffDNA من الدّم المحيطي للأمهات الحوامل باستعمال عتيدة QIAamp DSP Virus Kit، ومن ثمّ تم إجراء PCR في مختبر H.S.C.T في مستشفى الأطفال بدمشق لتضخيم كل من الإكسون 7، 10 من الجين *RHD* لتحديد النمط المورثي الجنينيRHD ، وكذلك تم تحديد الجنس بتضخيم الجين *SRY* والتي استخدمت كشاهد إيجابي على وجود ccffDNA.

وقد تمَت مقارنة النّتائج مع النّمط الظّاهري RhD لحديثي الولادة الذي أجري على دم الحبل السَري، وكذلك تمت مقارنة جنس المولود بعد الولادة مع نتيجة تضخيم الجين *SRY*.

تم استخدام برنامج SPSS(الإصدار 25) في تحليل البيانات، وتحديد الحساسيّة والنوعية والقيم التنبئية الإيجابية والسلبية لهذا الاختبار.

النتائج: لقد تم عزل ccffDNA من كل العينات الدموية الوالدية في كل الأشهر الحملية، وقد أظهرت الدَراسة أن النمط المورثي RHD كان سلبياً في 5/56 (9%) من الأجنّة، بينما في 51/56 الحالات (91٪) كانت الأجنّة إيجابية RHD, وقد تم تحديد النمط المورثي RHD الجنيني باكراً بعمر 7 أسابيع حملية، كما استطعنا تحديد جنس الجنين، فكان 22/56 من الأجنّة إناثاً، بينما كان 34/56 ذكوراً.

وقد أظهرت هذه الدّراسة توافقاً تامّاً بين النمط المورثي الجنيني لـ RHD ب استخدام ccffDNA من الدّم المحيطي للأم، والنمط الظاهري RhD بعد الولادة على عينة من دم الحبل السري للوليد، حيث بلغت حساسية ونوعية الاختبار 100%، والقيمة التنبئية الإيجابية والسلبية كانت تساوي 100%.

الاستنتاج: إنَ إجراء التّنميط المورثي الجنيني RHD بطريقة غير باضعة باستخدام ccffDNA هو بديلٌ مثالي لطرائق التشخيص قبل الولادة الباضعة كبزل السّلى، وخزعة الزّغابات المشيمية، والذي سيكون خطوة مهمة في التَّدبير السَّريري للنساء المحسسة بـRHD.

كما يعد تحديد الجنس باكراً خلال المرحلة الجنينية مهمّاً في تدبير الأمراض الوراثية المرتبطة بالجنس بصورة صحيحة.

الكلمات المفتاحية: الدّاء الانحلالي لدى الأجنّة والولدان، DNA الحر الجنيني الجائل، التنميط المورثي RHD الجنيني.

المقدمة: introduction

يعد الدّاء الانحلالي لدى الجنين والوليد Hemolytic Disease Of Fetus And Newborn النّاتج عن التمنيع الخيفي ب RHD من أهم المشاكل التوليدية التي تواجه الأطباء السريريين فهو سببٌ هام في حدوث الإمراضية والوفيات حول الولادة، وذلك على الرّغم من تقديم الوقاية الموجهة ب anti-D للنساء سلبيات RhD خلال 72 ساعة من ولادة أطفال ايجابيي الRhD، والتي خفّضت نسبة حدوث التمنيع الخيفي alloimmunization RHD لدى النساء سلبيات RhD من 16% إلى 1-2% (Tiblad et al., 2013)، لكن تطبيق الوقاية الرّوتينيّة لكل حامل سلبية غير محسسة سابقاً في الأسبوع 28 من الحمل قد ساعد في خفض حالات التمنيع إلى 0.2-0.3%.(Koelewijn et al., 2008; Moise, K. J., 2008)

كما أن إيجاد طريقة لتحديد زمرة دم الجنين RHD في جميع النّساء الحوامل سلبيات RhD، لتقديم الوقاية الرّوتينيّة لغير المحسسات منهن، واللاتي يحملن أجنّة إيجابية RHD بالإضافة إلى متابعة حالات التمنيع الخيفي الناتجة عن عدم توافق بزمرة RHD بما يضمن التداخل المناسب لإنقاذ الجنين، كان له دور هام في خفض نسبة التمنيع في بعض الدول أيضاً.(Yang, 2019)

وقد ساعد التقدم في تقنيات البيولوجيا الجزيئية في تحديد زمرة دم الجنين باستخدام DNA الجنيني، عن طريق بزل السّلى وذلك بعد الأسبوع الخامس عشر، أو بإجراء اعتيان الزّغابات المشيمائية بين 11-14 أسبوعاً حملياً، لكن وبسبب خطورة هذه التقنيات المستخدمة للحصول على المادة الوراثية الجنينية بما يتعلق بزيادة نسبة موت الجنين، وكذلك بالنسبة لزيادة النزف الجنيني الوالدي، الذي يؤدي إلى زيادة مضطردة في حدوث التّمنيع، لذا كان التوجه نحو DNA الحر الجنيني في الدم المحيطي للأم ويعد الحل الأمثل كونه طريقة غير باضعة noninvasive، وسريعة، وآمنة بالنسبة للأم والجنين على حدٍّ سواء. (Clausen, F. B., 2018)

الباب الأول

القسم النظري
Literature Review

الفصل الأول

نظام الريزوس (RH)

1-1 مقدمة

اكتشف نظام RH عام 1940 من قبل العالِمَين كارل لاندشتاينر والكسندر فاينر Landsteiner & Weiner في دم القرد Rhesus Macacus ومنه أطلقت هذه التّسمية على هذا النّظام(العامل Rhesus)،(Landsteiner et al., 1940) حين قام العالمان فاينر ولاندشتاينر بحقن نوع من الخنازير Guinea Pigs بكريات دم القرد Rhesus Macaque، الأمر الذي تسبب بتشكل أضداد في مصل دم الخنزير، وقد تم اختبار دم البشر مع هذا المصل فوجدوا أن كريات دم 85% منهم قد ارتصّت، وأطلق عليها إيجابية RhD، بينماغاب التراص في 15% من البشر وأطلق عليهم سلبيو RhD.

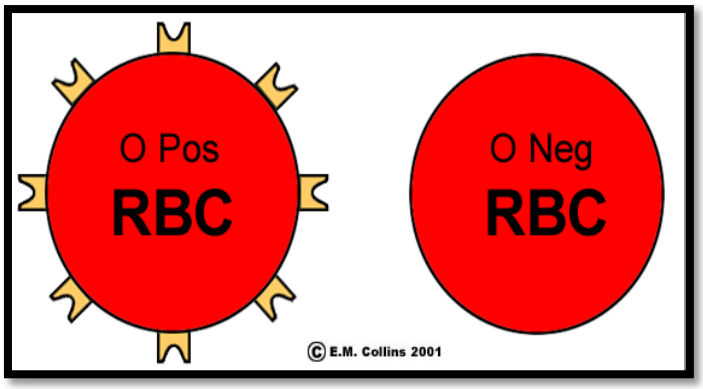
ويعدّ نظام RH (ISBT 004)[1] النّظام الدموي الأكثر تعقيدًا، نتيجة للمورثات المتعددة الأشكال polymorphic التي ترمّز بروتينات هذا النّظام، ولكنّه يأتي ثانياً بعد نظام ABO من حيث الأهمية السّريرية.

1-2 مستضدات نظام RH

يتكوّن نظام الريزوس (RH) من 55 مستضداً موجوداً على سطح الكريات الحمراء، أهمّها المستضدات (C ,c ,D ,E ,e)، ويعدّ المستضد RhD الأشد قدرة تمنيعية، حيث تعد الأضداد Anti-D السبب الأهم في حدوث الدّاء الانحلالي لدى الأجنّة والولدان Hemolytic Disease Of The Fetus and Newborn HDFN وتفاعلات نقل الدم.(Westhoff, 2007)

تعتبر الكرية الحمراء إيجابية RhD عند وجود المستضد RhD على سطحها، وغيابه عن سطحها يجعل منها كرية سلبية الـRhD.**<u>الشكل 1</u>**

[1] ISBT :Intrernational Society Of Blood Transfusion



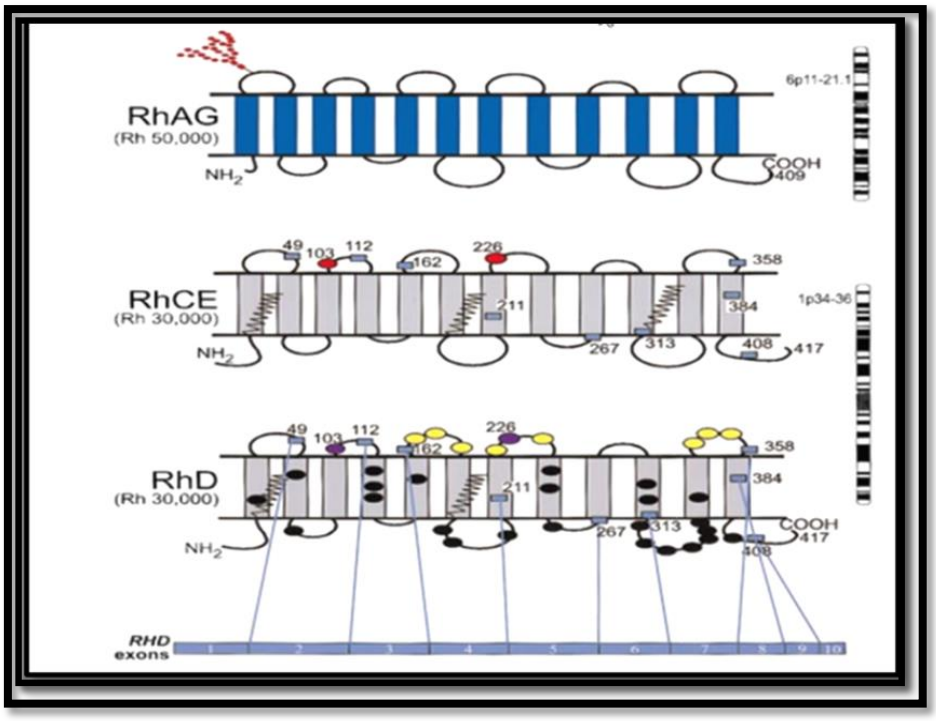
الشكل (1): وجود المستضد RhD على سطح الكرية الحمراء أو غيابه(Collins, 2001)

3-1 البنية الكيميائية لمستضدات نظام RH

هي عبارة عن بروتينات غشائية، يتم التعبير عنها باكراً على سطح الكريات الحمراء وذلك خلال 30 يوم من الحمل، مؤلفة من 417 حمض أميني بوزن حوالي 30 كيلودالتون.(Nardozza et al., 2010b)

1-3-1مستضد RHD: هو بروتينات عابرة للجدار على امتداد الغشاء الخلوي للكرية الحمراء 12 مرة، مما يؤدي لظهور حلقات قصيرة على الوجه الخارجي للكرية، والتي تعد أماكن التعبير الخلوي للمستضدات RH، وتظهر خمس عرى داخلية وتبقى النهايات الأمينية NH3 والكربوكسيلية COOH حرة داخل الهيولى، والتي يمكنها أن تخضع لعملية التحويل لبالميتوليل palmitoylation، حيث ترتبط بقايا حمض البالميتيك الأسيلية بسلاسل السيستين الجانبية، وبعكس كل البروتينات الغشائية وخاصة مستضدات ABO (ذات الطبيعة السكرية)، فان بروتين RhD لا يتمّ إضافة سكر الغلوكوز له.(Daniels, G. et al., 2014) **الشكل 2**

تعتمد مستضدات RhD على شكل الجزيئة وكذلك على التأثير بين أكثر من واحدة من هذه العرى خارج الخلوية، حيث تتواجد المحددات المستضدية epitopes على السطح الخارجي لتتفاعل مع الأضداد الموافقة.**الشكل3**



الشكل (2): تركيب مستضدات نظام RH

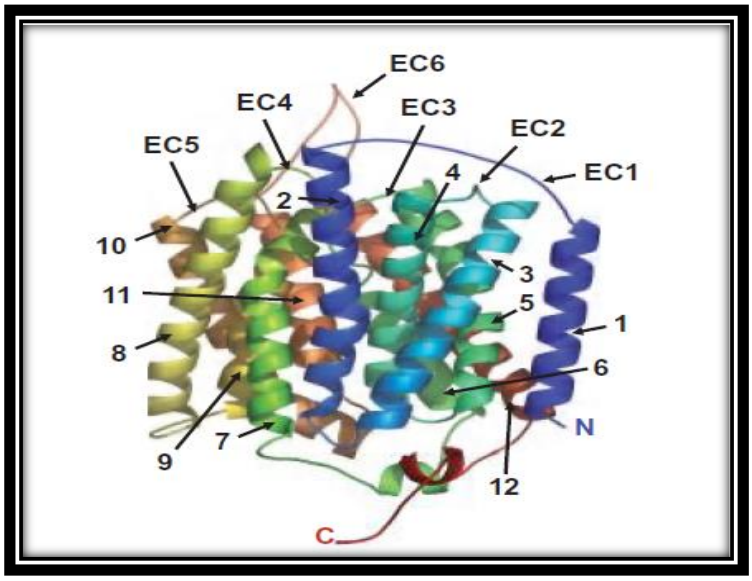
تعبر بروتينات RhD وRhCE 12 مجالًا عبر الغشاء الخلوي. تختلف مواقع الأحماض الأمينية بين RhD وRhCE وتظهر على شكل دوائر على RhD. تغيرات الأحماض الأمينية المسؤولة عن C / c و E e/، تظهر تعدد الأشكال علىRhCE(Westhoff, 2007)

2-3-1 بروتين RhCE:

موجود دائمًا، له نفس بنية البروتين RhD، يتم ترميز مستضد C / c في الحلقة خارج الخلوية 2، بينما يتم ترميز المستضد E / e في الحلقة خارج الخلوية 4، حيث توجد هذه المستضدات بشكل مترافق، حيث تعد المستضدات C و c ذات سيادة مشتركة، لكن غياب أحدها يعني وجود الثاني بشكل مضاعف، كما أن غياب المستضد E يعني وجود المستضد e بشكل مضاعف، ويكون الاختلاف بين هذه المستضدات بأجزاء معينة من السلسلة الببيتدية إذ يعود تعدد أشكال RhCc إلى طفرات مكونة من أربع نقاط، والتي تُحدث أربعة استبدالات بالأحماض الأمينية، تترافق هذه الاستبدالات مع طفرتين نقطيتين أخريتين صامتتين. **الشكل 3**

تختلف الألائل C/c عن بعضها ب 6 نوكليوتيدات في الإكسون 1و2، مما يعطي عديدي ببتيد يختلفان ب4 حموض أمينية في المواقع التالية 68,60,16,103 على السّلسلة الببتيدية.

في الحقيقة، إنَ الاختلاف الأهم هو في الموقع 103 لأنّه الوحيد الذي يظهر على السّطح الخارجي للغشاء، ويساهم في استمناعية الجزيء حيث يكون الحمض الأميني هو السيرين في C، بينما هو البرولين في c (Ser 103 Pro). (Westhoff, 2007)



الشكل(3): الطراز الجزيئي لبروتين (RhD) أو(RhCE)

حيث تظهر فيه النّهايات الامينية N والكربوكسيلية C، المجالات 12 الممتدة ضمن الغشاء، و6 مجالات خارج الخلية (EC)

(Figure provided by Nicholas Burton)

بينما تختلف الألائل e/E بنكليوتيد وحيد في الإكسون 5 (exon5)، مما يعطي عديدَي ببتيد يختلفان بحمض أميني واحد في الموقع 226 حيث يكون الحمض الأميني هو البرولين في E، وهو الألانين فيe(pro 226 Ala)(Knowles et al., 2006) **الشكل 2**

4-1 الجينات المرمزة لمستضدات RH

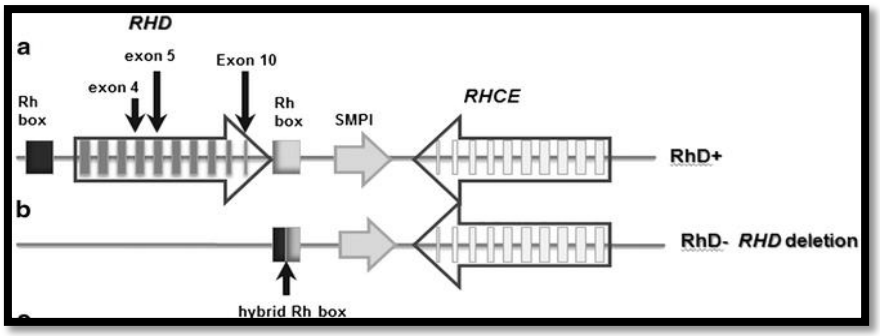
يتم ترميز مستضدات نظام RH من خلال مورثتين متجانستين للغاية، ومرتبطتين ارتباطاً وثيقاً تتوضعان على الصبغي الأول 1p34.1-1p36.1، هما *RHCE*، *RHD*. (Nardozza et al., 2010b)

كما يتشابه التسلسل النكليوتيدي بين المورثتين *RHD*، *RHCE* بنسبة 92% من كل الانترونات والإكسونات، وبالتالي تتماثل نسبة 96 % من تتالي الحموض الأمينية. الأمر الذي يوجه لفرضية التضاعف لجين سلف مشتركة.(Wagner, 2005)

تتميّز هاتان المورثتان أن كلاً منهما تتوّجه بعكس الأخرى5-RHCE-3′-3′-RHD-5′على نفس الصبغي يفصلهما تتالي نكليوتيدي يبلغ 30.000 bp فلا يعدّ أمراً شائعاً أن تكون مورثتين مرتبطتين تتوّضعان على نفس الصبغي بصورة متعاكسة، وباتجاهين متعاكسين على الصبغي نمط (ذيل –ذيل) (ارتباط ذيل–ذيل، تقابل نهايات 3′ من الجينات بعضها البعض)، وهذا يجعل الطاق المرصاف لجين *RHD* مماثل للطاق غير المرمز *RHCE*والعكس صحيح.(Flegel, W. A., 2011) **<u>الشكل 4</u>**

تتألف كلتا المورثتين من 10 اكسونات exons، وتؤدي الترجمة الكاملة Translation لنسخة الرنا المرسال mRNA إلى عديد ببتيد RhD، له حجم وبنية مشابهة لعديد ببتيد RhEe. بينما يتم إنتاج عديدات ببتيد RhC من نسخ إيزوفورم isoform مضفرة أصغر من الجين نفسه، وبالتالي فهي ببتيدات أصغر من نظيراتها في RhD أو RhEe.**<u>الشكل 5</u>**

يعتمد التعبير عن مستضدات Rh في غشاء الخلية على الارتباط بين بروتينات Rh والبروتين السكري المرتبط بـ Rh. يرمز هذا الأخير، بدوره بواسطة الجين *RHAG* الموجود على الصبغي 6 .



الشكل (4): رسم تخطيطي لموضع *RHD* و*RHCE*. (De Haas, M. et al., 2015; Papasavva, 2016)

1-4-1 جين *RHD* : التي ترمّز البروتين D، وتُحصَر جين *RHD* صعداً ونزلاً – downstream upstream بمنطقتين من تتالياتٍ متشابهةٍ بنسبة 98.6% يعادل طولهما 9 KB تدعيان RH BOX.

ان التغير في التركيب المورثي لهذه المنطقة قد يؤثر على حدوث وتكرار الحذف لجين *RHD*. (Wagner, 2005) **الشكل 4**

ويعد الشخص إيجابي RhD في حال وجود أليل واحد أو أليلين، (متغايري الألائل أومتماثلي الألائل) بينما غياب الأليلين يؤدي إلى عدم التعبير عن المستضد D ويعد آنذاك سلبي RhD (Flegel, Willy A., 2007)

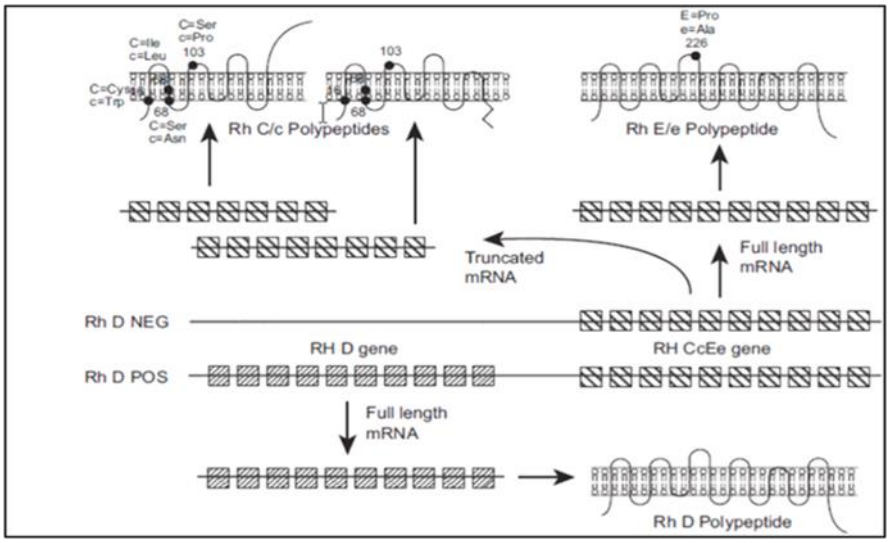
2-4-1 جين *RHCE*: التي تُرمّز عديدات الببتيد الخاصة بـ E/e، C/c وهنا يعبّر كلا الأليلين عن نفسهما بالنمط الظّاهري، كون الجين *RHCE* موجودة دائماً. **الشكل 4**

يتم فصل الجين *RHD* و الجين *RHCE* بواسطة الجين SMP1 ذات7اكسونات.(Kolialexi et al., 2010)

1-5 الأساس المورثي للنمط الظاهري RhD السلبي

ينتج النمط الظّاهري سلبيRhD من الغياب التام لبروتين RhD على سطح RBCs، وتعدّ نسبة حدوث النمط الظاهري سلبي "RhD "dd في البيض(القوقازيين) 15-17%، و التي تنشأ غالباً عن تماثل الألائل بالنسبة لغياب جين *RHD*، الذي يحدث نتيجة عبور صبغي غير متكافئ (Avent, N. D. et al., 1997)، بينما 18%

فقط من الأشخاص سلبيي الRhD من بقية الأعراق، هم متماثلو الألائل بالنسبة لغياب *RHD*، وتكون لدى نسبة 66% من سلبيي RhD الأفارقة السود لنسخة واحدة على الأقل من الجين الصامتة *RHD* * Ψ ، وهي جين *RHD* مُعطلة بتكرار 37 أساس آزوتي في الإكسون 4، بالإضافة إلى طفرة هُرائية Nonsense Mutation في الإكسون 6 TYR269 التي قد تؤدي إلى مرمزة توقف باكرة(Daniels, Geoff, 2005)، هذه الجين الصامتة غير الفعالة لا تنتج أيّ بروتين وبالتالي لا يوجد مستضدD، فيكون الجنين سلبي الـ RhD ظاهرياً، بينما يكون إيجابي RHD مورثيًا(Daniels, G.+Bromilow, 2014) (Singleton, 2000)**الشكل 6** ويظهر الجدول(1) تواتر النمط RHD السلبي باختلاف العرق Race



الشكل (5): مخطط يمثل 10اكسونات في كل من الجين *RHD–RHCE*

في الأسفل تظهر بروتينات RhCE،RhD التي ترمز بواسطة مورثتين متجانستين ، حيث يؤدي ترجمة النص الكامل لنسخةmRNA الى عديد ببتيد RhEe له حجم وبنية مشابهة لعديد الببتيد RHD

بينما يحمل 15% من الأفارقة السود النمط الهجين RHD-CE – D الذي لا يعبّر عن المستضد RhD، بل يشفّر مستضد RhC متغيّر(altered)، حيث ينتج RHD-CE-D الهجين من المرمزات 1 و2 و9 و10 المشتقة من الجين *RHD*، بينما تحل المرمزات من 3 إلى 8 من الجين *RHCE* لتحل محل منطقة *RHD* لتشفير D

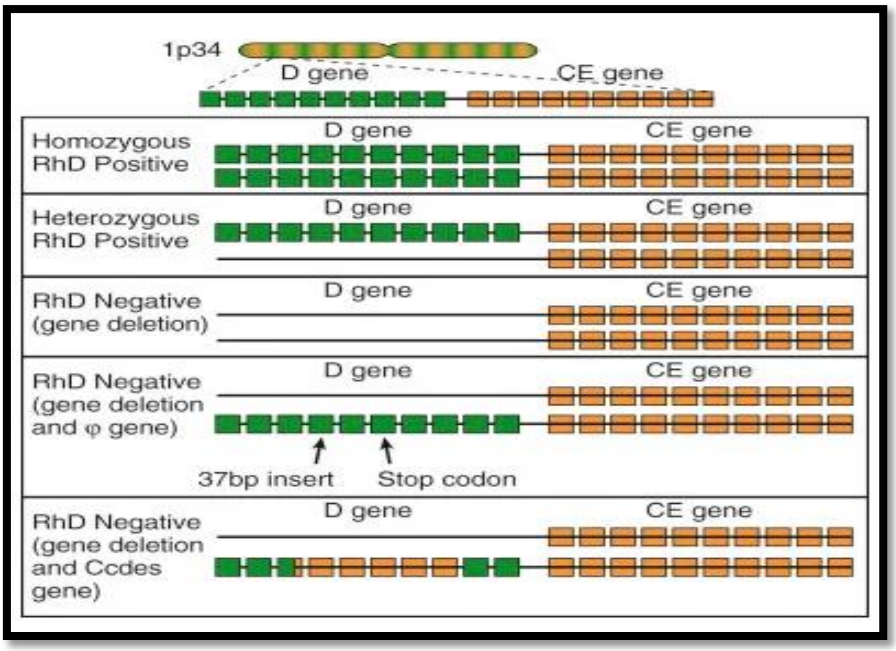
الحلقية. ويكون Exon 3 عادة مكوناً من جزأين أحدهما من RHD والأخر من *RHCE*. **الشكل 6** ، تعدّ كريات الدم الحمراء الحاملة لهذا النمط RHD-CE – D سلبية ال RhD. (Dovč-Drnovšek et al., 2013)

جدول (1): تواتر انتشار المستضد RhD(Dean, 2005)

المستضد	البيض	السود	الاسيويين	سوريا
RHD+	**%85**	**%95**	**%99**	**%90**
RHD-	**%15**	**%5**	**%1**	**%10**

6-1 الأساس المورثي للنمط الظاهري RhD الإيجابي

يورث المستضد RhD بالنمط السائد الجسمي وقد يكون الشخص متخالف الألائل Dd بالنسبة للجين RHD(60% من إيجابي RH) او متماثل اللواقح DD (40% من ايجابيي RH) ، يورث الأشخاص الايجابيون متماثلو الألائل المستضد RhD لابنائهم، بينما يحمل متغايرو الألائل فرصة 50% ليورثوا هذا المستضد، كما يملك الجنين من أم سلبية RhD والأب متغاير الألائل إيجابي RhD فرصة 50% ان يكونوا سلبيي RhD، و50% إيجابي RhD متخالف اللواقح. (Bischoff et al., 1999)



الشكل(6): رسم تخطيطي لموضع الجين *RH* على الصبغي1.

تم توضيح إيجابية RHD المتماثل الألائل والمتخالف الألائل، مع 3 أنماط فردانية لدى سلبيي RhD : RHD–سلبي مع تغاير الألائل للجين الكاذب عند الافارقة السود ، وكذلك RhD سلبي مع تغاير الألائل لجين RHD–CE–D.

Modified from Moise KJ. Hemolytic disease of the fetus and newborn. . .(.Maternal–Fetal Medicine: Principles and Practice, ed 5/ 2004

1–7 أضداد نظام RH:

تعد أكثر الأضداد اللانظامية شيوعاً، وهي بشكل أساسي أضداد لانظامية مناعيّة تنتج بواسطة التّمنيع الخيفي alloimmunization النَّاتج عن الحمل أو عملية نقل دم سابقة، بينما بعضها أضداد طبيعية تظهر دون حمل، أو نقل دم مثل Anti-E،anti-Cw

تكون الأضداد في الغالب من نوع IgG (IgG1 و / أو IgG3)، وهي قادرة على تثبيت المتممة في الدرجة 37 c°، مما يسهل كشفها باختبار غير مباشر لمضاد الغلوبولين IAT (Indirect Antiglobulin Test) وغالبًا ما يتم تحسين الكشف باستخدام الكريات الحمراء المعالجة بالإنزيمات.

تصنف الأضداد حسب شيوعها تنازلياً ابتداء من المستضد D الذي يعد الأكثر قدرة استمناعية في نظام Rh– فهو أقوى بعشرين مرة من المستضد c–كما يلي:

Anti -D ، anti -E، anti –c anti –C، anti -e

كما تعد الأضداد anti –D الأكثر أهمية سريرية لأنها تتداخل في:

1–حوادث نقل الدم الانحلالية المتأخرة: تشكل أجساد ما يقارب 80٪ من الأفراد سلبيي الـ RHD الذين يتلقون منتجاً دموياً ايجابي الـ RHD بعد أول عملية نقل دم.(Nardozza et al., 2010a)

2– حدوث الدّاء الانحلالي للأجنّة وحديثي الولادة HDFN لأن الأضداد anti-D IgG تستطيع المرور عبر المشيمة مؤدية لفقر الدم الجنيني بآلية انحلال دموي خارج الأوعية، ويكون غالبًا في الطحال الجنيني.(Urbaniak, 2000)

الفصل الثاني

الدّاء الانحلالي لدى الأجنّة والولدان HDFN
الناتج عن عدم التّوافق الجنيني الوالدي بـ RHD

2-1 التعريف

يحدث بآلية مناعية بسبب عدم التّوافق الجنيني الوالدي في النّظم الدموية الموجودة على سطح الكريات الحمراء، وتؤدي إلى حدوث فقر دم انحلالي مختلف الشّدة لدى الجنين أو الوليد، وارتفاع البيلروبين وقد يؤدي في الحالات الشّديدة لحدوث الموه الجنيني الذي قد يفضي إلى موت الجنين. (De Haas, M. et al., 2015)

يمكن أن ينتج HDFN عن أنواع عديدة من عدم التّوافق بين المستضدات الدّموية، حيث تعدّ أضداد anti –D، anti -Kell، anti-E ، anti-c من أشيع الأسباب التي تؤدّي إلى حدوث HDFN، ولكن الشّكل الأكثر شيوعاً وشدة من HDFN ينتج عن حالة عدم التّوافق ب RhD الذي يسبب ما يعادل 85% تقريباً من حالات HDFN وذلك بسبب القدرة الاستمناعية العالية للمستضدRhD. (Moise, K. J., 2008)

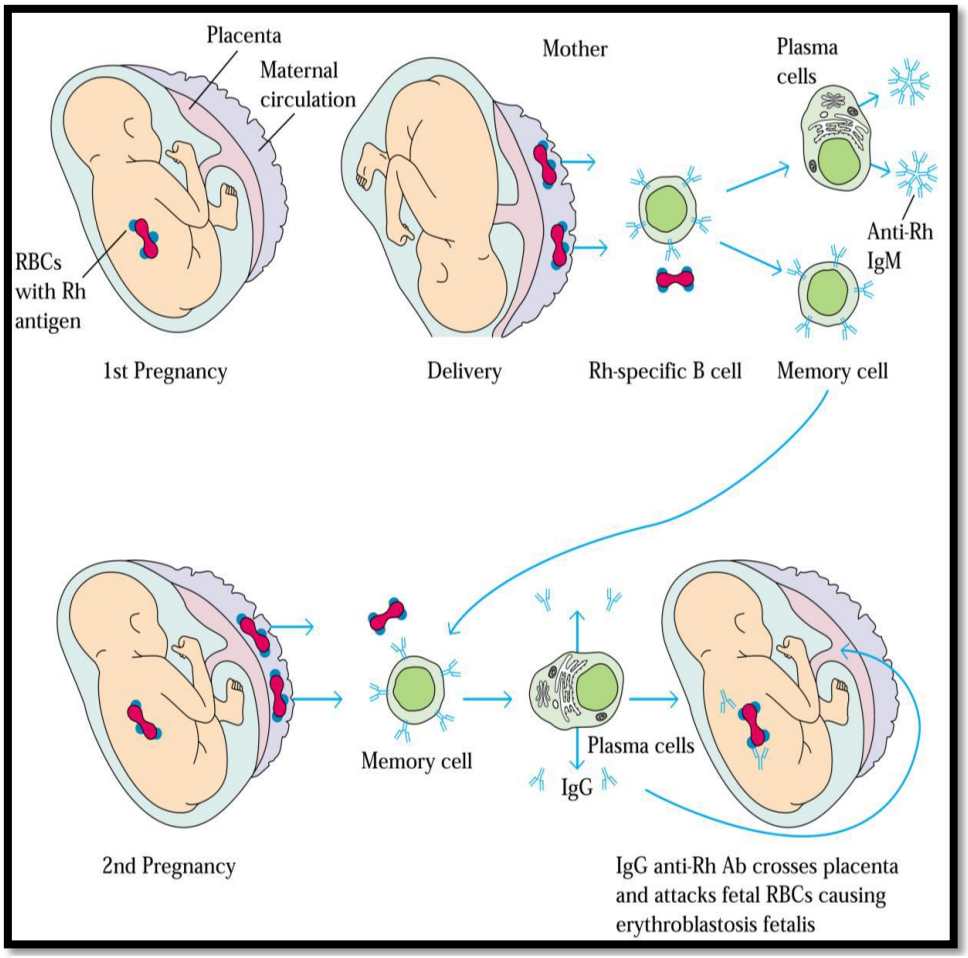
يعدّ كذلك كلّاً من المستَضِدين Kell، RHc سبباً هامّاً في إحداث HDFN بنسبة 10%، 3.5 % على التّرتيب.(Oliveira, 2012)

2-2 الآلية الأمراضية ل RHD-HDFN:

ينتج التمنيع الخيفي alloimmunization عن عدم التّوافق بزمرة RHD بين الأم سلبية RHD، وجنينها إيجابي الـ RHD، حين تعبر الكريات الحمراء الجنينية إيجابية RHD إلى الدّوران الوالدي، حيث تحدث معظم حالات التّمنيع في وقت قريب من الولادة عندما يكون حدوث النزف الجنيني الوالدي FMH (Feto-Maternal Hemorrhage) أعظمياً، فتتشكّل لدى الأمّ أضداد IgG الموّجهة ضد الكريات الحمراء الجنينية، والتي تتميز بقدرتها على عبور المشيمة في الحمول التالية بطفلٍ إيجابي RHD. بينما يمر الحمل الأول بسلام.(Illanes, S. et al., 2009)

في الحمل التّالي بطفلٍ إيجابي RhD: يحدث عبور كريات دم الجنين باكراً، وذلك بدءاً من الأسبوع الحملي الـ 12، وهي قادرة على تحريض الجهاز المناعي للأم لتشكيل الأضداد بعيارٍ عالٍ، ويبدأ انتقال الأضداد

Anti-D IgG في أوائل الثّلث الثّاني من الحمل لتهاجم كريات حمر الجنين، وتؤدي لتحطيمها بآلية مناعية، الامر الذي يؤدي إلى فقر الدم الجنيني الذي قد يتطوّر لحدوث الموه الجنيني.(McEwan, 2018) **الشكل7**



الشكل (7): الالية الامراضية للداء الانحلالي للجنين والوليد(De Haas, M. et al., 2015)

إنّ كمّية الكريات الحمراء الجنينية العابرة للدّوران الوالدي لها دورٌ هامٌ في حدوث التّمنيع، والتي تزداد مع عمر الحمل حيث تمر 0.01 مل من الكريات الحمراء الجنينية عبر المشيمة لدى 3% من الحوامل في الثّلث الاول من الحمل، ولدى 12 % منهم في الثّلث الثاني، ولدى 46 % من الحوامل مع نهاية الثّلث الثّالث من الحمل،(Bowman, 1986) إلا أن كميّة الدّم الجنينية المنتقلة للدوران الوالدي في غالبية الحالات تكون غير كافية لتحريض استجابة مناعية أوليّة، وذلك بسبب تصفية هذه الكريات من قبل الجهاز الشّبكي البطاني.(Urbaniak, 2000)

لكنّ مرور كمية أكبر من الدم الجنيني ايجابي RHD يجعلها قادرةً على تنبيه الجهاز المناعي لدى الأم سلبية RhD، وتنشيط نسيلة اللمفاويات البائية التي تتعرف على المستضد الغريب RhD، فتتشكّل أضداد anti-D IgM ذات الوزن الجزيئي العالي والعمر القصير، والتي لا تستطيع عبور المشيمة فيما يدعى طور الاستجابة المناعية البدئية، و تبقى خلايا الذّاكرة بانتظار تعرض جديد للمستضد RhD على الكريات الحمراء الجنينية لتتكاثر عندئذ الخلايا المصورية بسرعة، وتتشكل anti-D IgG القادرة على عبور المشيمة والتي ترتبط مع الكريات الحمراء الجنينية التي تحمل المستضد RhD، مسبباً تحطمها وبالتالي حدوث فقر الدم الجنيني.(Moise, K. J., 2008)

يغلب وجود IGg1 subclass لدى ثلث الافراد، بينما يظهر مزيج من IGg3,IGg1 لدى الثلثين الباقيين، ويعتبر IGg3 أكثر قدرة على الارتباط بخلايا الجهاز الشبكي البطاني.

إنّ الانحلال الحاصل من النّمط خارج الوعائي الذي يتواسطه الجهاز البلعمي وحيد النّوى - mononuclear phagocytosis ممّيز لأضداد IgG، إذ تملك البالعات macrophage مستقبل Fc القادر على ربط IgG المرتبط بالكريات الحمراء، وبذلك قد تلتهم (الكريات الحمراء المحسسة) بكاملها، أو تفقد جزءاً من غشائها حيث تعاد إلى الدوران ككريات حمراء مكوّرة صغيرة microspherocyte، والتي تعدّ أكثر قبطاً في الطحال من الخلايا الحمراء العادية.

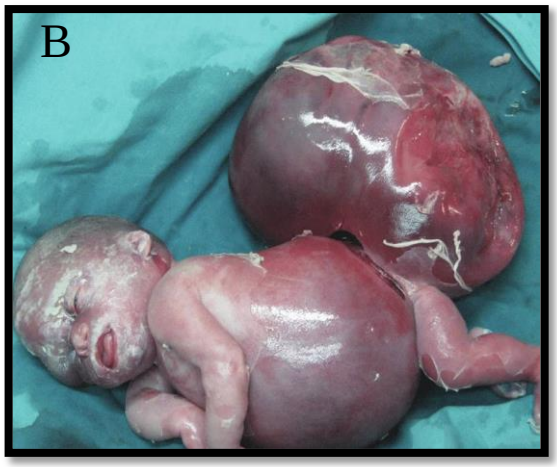
بالإضافة إلى البلعمة بوساطة مستقبلات Fc، فإن السّمية الخلوية التي تعتمد على الأجسام المضادة Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) قد تساهم أيضاً في تلف الخلايا أثناء التّلامس الوثيق مع البلاعم الطحالية، عندما يتم تدمير الخلايا الحمراء خارج غشاء الوحيدات بواسطة إنزيمات الليزوزومات التي تفرزها الوحيدات.

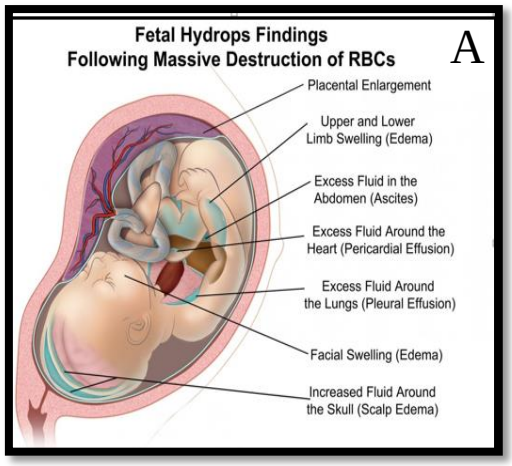
2-3 التّظاهرات السّريريّة لـ HDFN- RHD:

يتظاهر HDFN بفقر دم انحلالي مختلف الشّدة لدى الجنين، تتفاوت شدّته حسب كميّة الأضداد المارّة إلى الدّوران الجنيني، ويعتبر البيليروبين أحد منتجات تفكك الهيم، حيث ترتفع مستوياته لدى الجنين وضمن السّائل الأمنيوسي، على الرغم من أن عملية النقل عبر المشيمة قد تحدَ من هذا التراكم.

إنّ حدوث فقر الدم التدريجي يحفز في البداية نقي العظم، وفي حالة تجاوز قدرته على الحفاظ على مستويات الخضاب، تزداد أهميَة تكوَن الدَم خارج النَقي Extramedullary Hematopoiesis وينتج عن هذا النّشاط المفرط للجهاز الشّبكي البطاني تضخمُ الكبدِ والطحال الجنيني، كما يساهم ارتفاعُ ضغط الدم البابيّ، ونقص ألبومين الدّم Hypoproteinemia النّاتج عن خلل في وظائف الكبد في تراكم السّوائل خارج الخلية لدى الجنين، ويترافق ذلك مع قصور قلب عالي النتاج، ودرجة من نقص الأكسجة مما يضعف انقباض عضلة القلب بشكل مباشر. (Soothill et al., 1987) حيث يُظهر التّصوير بفائق الصوت زيادة في السّائل خارج الخلوي الذي يتظاهر بالحَبَن Ascites، ووذمة الجلد Skin Oedema، ووذمة في فروة الرأس، والانصباب الجنبي والتاموري، بالإضافة الى ضعف الصمام الأذيني البطيني، وتضخم القلب، وموه السّلى polyhydramnios، ونتيجة المعاوضة لنقص الاكسجين قد تتطور ضخامة المشيمة placentomegally، ويدعى اجتماع هذه الموجودات الموه الجنيني Hydrops Fetalis الذي ينتهي غالباً بوفيات الأجنّة وحديثي الولادة.(Azuonwu, 2017; C et al., 2015) **<u>الشكل 9-8-10</u>**

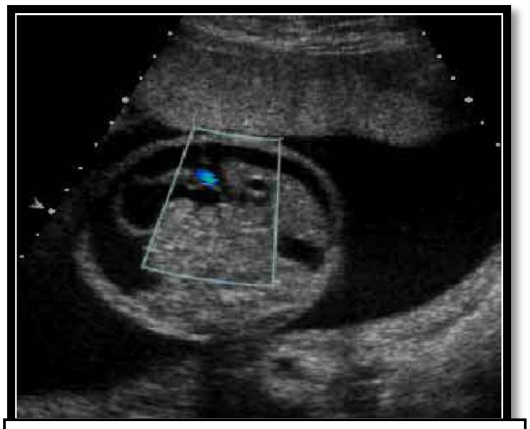
تظهر هذه التغييرات عندما تنخفض مستويات الخضاب الجنينية إلى ما دون المعدل الطبيعي وذلك لاكثر من 6 انحرافات معيارية مقارنة بالمتوسط العادي للعمر الحملي الموافق وهي سمة متأخرة لداء HDFN، و الذي يتطلب العلاج الفوري بنقل الدم بصورة طارئة.(Azuonwu, 2017) وقد لوحظ تكرار حدوث الموه الجنيني في 90 % من حالات الحمل المحسسة ب RHD، والذي يحدث غالبًا في فترة حمل مبكرة. (Moise Jr, 2005)





الشكل (8):A الموجودات الصدوية عند الجنين المصاب ب HDFN

B توضِّح الصورة حالة موه جنيني، يلاحظ وذمة الجلد وضخامة في البطن دلالةً لوجود ضخامة كبديَّة وحبن، كما يلاحظ أيضاً ضخامة المشيمة



الشكل (9): مقطع عرضي في مستوى المعدة يوضح تجمع السوائل المرضي في المنطقة البطنية (الحبن)(Pilu+Nicolaides, 1999)

الشكل (10): مقطع طولاني يوضح انصباب التامور بالمراقبة بالأمواج فوق الصوتية (Pilu et al., 1999)

يعد الطّيف السّريري للإصابة في مرحلة الوليد Rh HDN متغيّراً بدرجةٍ كبيرة، لكن وجود اليرقان وفقر الدم وضخامة الطحال والكبد هي علامات أساسية لتطور HDN، حيث أن 50٪ فقط من الأجنّة إيجابية RhD قد يتأثر بشكل طفيف ولا يحتاج هؤلاء المواليد للعلاج عادةً. في حين يولد 25٪ منهم ويكون لديهم درجة من فقر

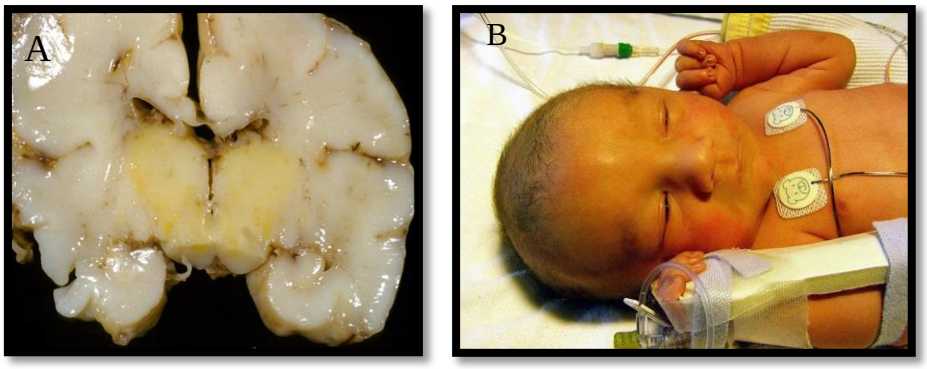
الدم الإنحلالي، وفرط بيليروبين الدّم الذي قد يتطور إلى اليرقان النّووي الذي يؤدي إلى حدوث اضطراباتٍ عصبية حادّة، وقد يتطور حدوث الموه الجنيني في الرّحم في 20–25% من الحالات المتبقية، وذلك قبل الأسبوع 34 من الحمل، وسينتهي بهم الأمر بالموت داخل الرّحم أو خلال فترة الوليد. وبسبب تطور وسائل المراقبة الوالدية والجنينية وإمكانية العلاج داخل الرّحم فقد تراجعت نسبة حدوث الموه الشديد، وبالتالي الموت لتصبح 10% فقط (Papantoniou, 2013).

عند الولادة، يكون الكبد غير الناضج غير قادر على التعامل مع كمية البيليروبين الكبيرة الناتجة عن التدمير المستمر للكريات الحمراء الجنينية المرتبطة بالأضداد، وعادة ما يتطور اليرقان خلال اليوم الأول من الحياة، غالبًا في الساعات القليلة الأولى بشكل شديد لدى المواليد المصابة.

تنخفض المستويات المصلية من الأضداد(IgG) Anti-D لدى الوليد خلال 12 اسبوعاً بعد الولادة، (العمر النصفي يقارب25 يوما). لذا فقد يتظاهر HDN لدى المواليد بفقر دم انحلالي معتدل إلى شديد خلال 8 إلى 12 أسبوعًا من الحياة، فيحدث لديهم فقر الدم المتأخر المرتبط باستمرار انحلال الدم بسبب استمرار وجود الأضداد وفرط التّنكس.

وتعدّ الأعراض العصبيَّة أكثر الاختلاطات النّاتجة عن الدّاء الانحلالي عند الوليد خطورةً ينتج تطور هذه الحالة لدى الوليد عن الاعتلال الدماغي بالبيليروبين kernicterus (اليرقان النووي) النّاتج عن تجمع البيليروبين غير المقترن في الدّماغ، القادر على اجتياز الحائل الدّموي الدّماغي، ليتثبّت بألفةٍ شديدةٍ على الخلايا العصبية وتعدُّglobus pallidus الكرة الشاحبة من العقد القاعدية، ونواة جذع الدماغ هي الهياكل العصبية الأكثر عرضة للتلف وحدوث التنخر نتيجة ترسب البيليروبين غير المقترن. **<u>الشكل 11</u>**

حيث يتظاهر اعتلال الدماغ البيلروبيني بالخمول، وضعف الرضاعة، وغياب منعكس مورو، وضعف الفاعلية hypotonia. والاختلاجات، بينما 10% فقط من المواليد الناجين سيصابون بأذيات عصبيَّة حسيّة شديدة مثل الكنع الرقصي التشنجي والصمم مع أو بدون التخلف العقلي.(Castleman, 2020)



الشكل(11): الذاء الانحلالي عند الوليد

A–يوضح توضع البيلروبين في النويات القاعدية الدماغية

B– تطور اليرقان الوليدي كنتيجة للتمنيع الجنيني الوالدي

/https://www.flickr.com/photos/neonatal-box

4-2 العوامل المؤثرة على شدة الذّاء الانحلالي HDFN -RHD:

☒ **<u>ترتيب الحمول:</u>** من النّادر أن يتطور HDFN في الحمل الأول إلا في حالة التمنيع الخيفي النّاتج عن عملية نقل دم غير متوافق، ففي الحمل الأول تعد كمية 1 مل من الدم الجنيني إيجابي RhD قادرة على تنبيه الجهاز المناعي لدى الأم سلبية RhD بسبب القدرة التمنيعية العالية للمستضدRhD، وأما في الحمل الثاني فان عبور 0.03 مل من الكريات الحمر الجنينية ايجابية RhD، سوف تؤدي لتحريض استجابة مناعية.(Illanes, S. S., P., 2010)

☒ **<u>كمية النزف الجنيني–الوالدي FMH</u>**: إنّ العبور الأساسيّ لكريات دم الجنين إلى دوران الأم يكون أثناء الولادة، حيث يمر أقل من 1مل من الدّم في 50% من الولادات الطبيعيّة. وقد يمر حوالي 5 مل من الدم في 1.3%من الولادات الطبيعيّة، وذلك عند وجود مخاض عسير (انفكاك مشيمة باكر) تصل كميّة الدّم حتى 10–15 مل وحتّى 30 مل أحياناً خاصـــةً بعد التجريف التالي للاجهاض.(Basu et al., 2011)

- كما يزداد الخطر بعد الاسقاط العفوي 3.5%، بينما ترتفع ل 5.5% في الاسقاط المحرض او إذا كانت الإجراءات باضعة مثل بزل السّلى، اعتيان الزّغابات المشيمائية، أو أخذ عينة من دم الجنين والتي يمكن أن تتسبب بحدوث نزيف جنيني والدي.
- **يعد عدم التّوافق المرافق في نظام ABO من عوامل خطورة تطور HDFN:** إذ يبلغ خطر حدوث التمنيع الخيفي بـــRHD 16% إذا كان الجنين الإيجابي RHD متوافقاً حسب ABO مع دم والدته، بينما ينخفض إلى 2% إذا كان غير متوافق ABO، ويعتقد أن الوقاية من حدوث التّمنيع في الحمول غير متوافقة الـــ ABO تنتج عن تحطّم الكريّات الجنينيّة المتسربة للدّوران الوالدي والتي تُقبَط بوساطة الأضداد الجائلة في الدَّم من نوع IgM لنظام ABO، وبمساعدة المتممّة ليتمّ إزالتها من الدَّوران بواسطة الجهاز البلعمي وحيد النواة MPs خاصّـــة في الكبد، قبل تعرّف الجهاز المناعي على المســـتضـــد RhD.(Urbaniak, 2000)
- كذلك تختلف درجة الاستجابة المناعية الوالدية في تشكيل أضداد anti-D لدى النّساء سلبيات RhD كما أنّ لكميّة الأضداد الوالدية التي أُنتجت وعبرت المشيمة للدَّوران الجنيني دوراً هامًّاً، و يُنتج التّعرض المتكرر للمستضد مستويات أعلى من الأضداد.(Esan, 2016)

2-5 التّوارد Incidence:

قبل تطبيق الوقاية الرّوتينيّة الموّجهة عام 1968، كان HDFN سببًا مهمًا لمراضـة ووفيات الجنين والولدان حيث كان معدل إصـابة الولدان بـHDN Hemolytic Disease Of Newborn حوالي 1%، وهو مسـؤول عن وفيات 2200/1 ولادة حية(Liumbruno, 2010)، لكن تطبيق الوقاية الرّوتينيّة(الموّجهة) بعد ولادة طفل إيجابي RhD لدى النساء سلبيات الـRhD خفض نسبة الإصابة والوقوع بشكل ملحوظ حيث أصبح يحدث بنسبة 0.4 من كل 1000 ولادة حية، كما أدَّى انخفاضٍ حادٍّ في نســـبة التّمنيع ب RHD من 16% إلى 2%. (Liumbruno, 2010)

بينما أدّى تشارك الوقاية الموّجهة مع الوقاية الرّوتينيّة Routine Antenatal Anti-D Prophylaxis RAAPD أثناء الحمل لدى النّساء سلبيات RhD خلال الثّلث الأخير من الحمل، إلى تناقص حالات التّمنيع من 1إلى 0.2% (McBain, 2015) وبالتّالي تناقص في الوفيّات حول الولادة من 100.000/46 ولادة حية إلى 100.000/1.6 ولادة حية .(Qureshi et al., 2014)

كما أظهرت نتائج تحليل تلوي لدراسات غير عشوائية انخفاض نسبة التّمنيع إلى 0.9%− 0.3% في البلدان التي تم فيها تقديم RAAPD للنساء سلبيات RhD. (Chilcott et al., 2003)

إنّ نسبة الإصابة بـHDFN في كلّ دول العالم تقريباً لاتتجاوز 3%، لكنْ هذه النسبة أعلى بكثير في دول العالم الثّالث حيث إمكانيات الكشف والوقاية المحدودة، (McBain, 2015) (Al-Dughaishi et al., 2016)

وقد أوضحت نتائج دراسة أجريت في مستشفى الأطفال الجامعي بدمشق عام 2005 أن عدد الأطفال الذين كانوا بحاجة إلى تبديل دم علاجي هم 200 طفل تقريباً، وكان منهم 21 وليداً تم تبديل الدم لديهم بسبب الانحلال الدموي الناتج عن عدم توافق RHD (HDF) أي بنسبة 10.5%، وهي تعد نسبة ليست قليلة وتستوجب منا البحث عن الأسباب الحقيقية لهذه النسبة العالية.

2-6 التشخيص والمتابعة لحالات التّمنيع لدى الحوامل سلبيات RhD:

تختلف المعايير السَّريرية المتبعة في تحري وتشخيص ومتابعة حالات التمنيع الخيفي ب RHD في دول العالم، لكنها تتشارك في عدة مبادئ أساسية وفقاً لتوصيات الكلية الأمريكية للأخصائيين بالتوليد وامراض النساء ACOG American College Of Obstetricians And Gynecologists، أهمَّها(Moise, K. J., Jr.+Argoti, 2012):

<u>2-6-1 البحث عن D الضعيف (Du)</u> للنّساء سلبيات RhD باكراً أثناء الحمل ويفضل خلال الثّلث الأول من الحمل وذلك بطرائق مخبرية معتمدة.

2-6-2 تحرّي الأضداد اللانظامية لدى كل النّساء الحوامل سلبيات RhD في أول زيارة قبل الولادة لكل حمل ثم في الأسبوع 28، وقبل الولادة .(Obstetricians et al., 2018)

2-6 -3 معايرة أضداد Anti-D الوالدية:

تعد الطريقة المخبرية الأسهل والأكثر شيوعاً لتقييم قوة الضَّد اللّانظامي، حيث تعطي معايرة Anti-D مثلاً معلوماتٍ محدودةً حول شدة انحلال الدَّم في حالات التمنيع الخيفي .

بينما لا تزال الكثير من المراكز العالمية الأوروبية تعتمد على عيار الأضداد عند الأم، للمساعدة في توجيه القرار حول تطبيق اختبارات باضعة مثل بزل السلي واعتيان دم الحبل السري عبر الجلد PUBS (Percutaneous Umbilical Cord Blood Sampling)، وذلك عندما تبلغ قيمة العيار المخبري القيمة الحدية ل anti-D وهو 1/32 (القياس الوزني 15 IU/ml).(Kumar, S. et al., 2005; Nicolaides, 1992)

يجب أنّ يتم عيار الضّد من النّمط anti-D، بشكل متواتر كل 4 أسابيع حتى الأسبوع الحملي الـــ 24، في حال بقيت قيمة الأضداد ثابتةً خلال فترة الحمل، بينما تتم المعايرة بعد الأسبوع 24 بفاصل أسبوعين، أو في حال تزايد قيمته قبل هذا الوقت، (Mari, G. et al., 2015)وذلك لأن ارتفاع عيار الأضـــداد اللانظامية، أو حدوث زيادة ســريعة فيها (التضـــاعف خلال 14 يوم) هي مؤشــرات هامة لخطر تطور HDFN، وبالتالي قد نحتاج مراقبةً مناعيّةً دمويّة متكررة، وتدخلاً سريعاً لإنقاذ الجنين.(Bennardello et al., 2015)

إنّ عيـار الأضـداد لـدى النّسـاء الحوامـل الأقّـل مـن 32، والأكثـر مـن 1000 قـد تكـون ذات مصـداقية عاليـة فـي التنبـؤ بحـدوث HDFN، بينمـا عيـار الأضـداد الـذي يتـراوح بـين 64 و512 لا تتمتـع بقيمـة منبئـة دقيقـة لحـدوث الخـزب. كمـا أن عيـار الأضـداد اللانظاميـة عرضـة للأخطـاء البشـرية، لهـذا يجـب أن يـتمّ العيـار بـنفس المخبـر وباسـتخدام تقنيـات دقيقـة، وإن غيـاب ارتفـاع الأضـداد لا ينفـي الإصابة، ولهذا نلجأ لمراقبة الجنين سريرياً (Kumar, S. R., F., 2005)

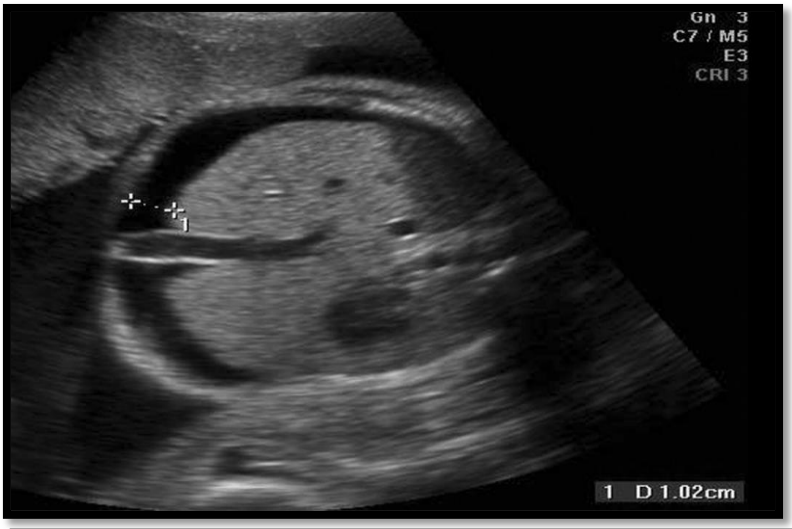
2-6-4 المراقبة الصدوية:

إنّ للمراقبة بالتّصوير الصّدوي دوراً هامّاً في تدبير ومراقبة الحمول المحسسة بشكل خاص، كما أنّها تفيد في تحديد العمر الحملي بدقة، الأمر الذي يعدّ بغاية الأهميّة في تفسير القيم المخبرية مثل تحديد قيمة البيلروبين في سائل السّلى AOD450.

إن ظهور تغيراتٍ واضحةً في العديد من المتثابتات مثل زيادة سماكة المشيمة لأكثر من 6 سم، اختلاف أبعاد الوريد السّري، أبعاد الكبد والطحال، موه السّلى، قد يوّجه لوجود فقر الدم الجنيني، بينما تشمل الموجودات المتأخرة حدوث الانصباب الجنبي، ووذمة فروة الرأس التي يتم تقديرها بقياس المسافة بين جلد الجبهة والعظم الجبهي.

الشكل 12

يعد الموه الجنيني المرحلة الأخيرة من الدّاء الانحلالي حيث يبلغ الخضاب الجنيني أقل من ثلث القيمة الطبيعية.



الشكل(12): تظهر الموجات فوق الصوتية قبل الولادة مقطعًا عرضيًا عبر الجزء العلوي من بطن الجنين على مستوى المعدة والكبد، تقيس المسافة الموضحة حافة استسقاء 10 ملم.

2-6-5 قياس السعة الانقباضية بوساطة دوبلر الشريان المخي المتوسطMCA-PSV

(Doppler Middle Cerebral Arterial Peak Systolic Velocity)

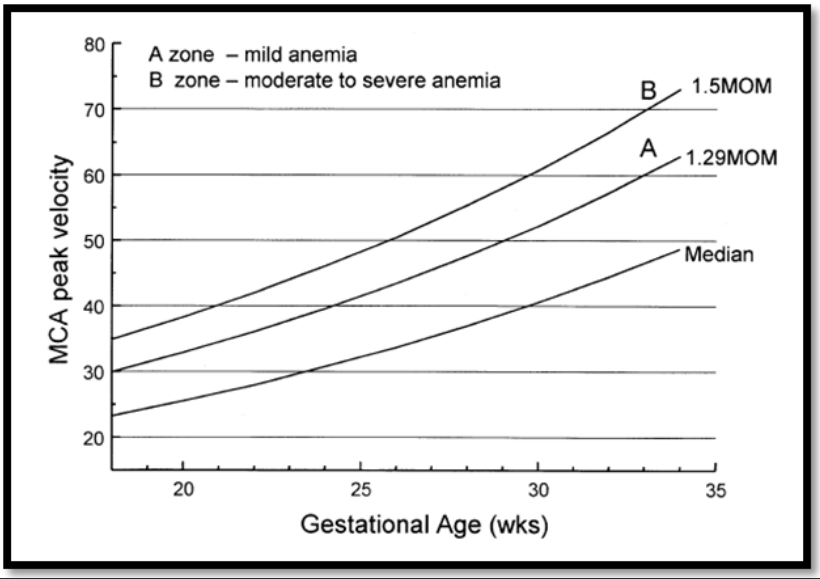
يعد MCA-PSV حالياً بديلاً عن الطرائق التّقليدية التي كانت متبعة في مراقبة فقر الدم الجنيني،(Mari, G., 2005) (Bullock, 2005) وذلك وفق توصيات Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) حيث تتم مراقبة الحمل بدءاً من الأسبوع الحملي 18 بفاصل 1-2 أسبوع، بينما تتم مراقبة الحمول ذات الخطورة العالية لتطور HDFN أسبوعياً، و يبقى تقييم الحالات بعد الأسبوع 34 من الحمل، بالاعتماد على الأمواج الصدوية كل 4-10 أيام حيث يصبح MCA-PSV محدود الموثوقية، وتبلغ نسبة الإيجابية الكاذبة 12% ,.Moise, K. J) 2008)

حالياً لا بد من المراقبة بـ MCV-PSV عند تجاوز عيار الضّد 16 /1، وقد أوصت الكلية الأمريكية للأخصائيين بالتوليد وأمراض النساء ACOG أنّ الجنين لا يكون معرّضاً لخطورةٍ كبيرةٍ في حالة الحمل الممنّع مسبقاً إذا بقيت العيارات أقل من 1:16.(Moise, K. J., 2008)

يتم قياس MCA PSV في الشّريان المخي الأوسط MCA الأقرب إلى جلد الأم، مع وجود رأس الجنين في الوضع العرضي، حيث يساعد الدّوبلر الملون في تحديد الموقع الصّحيح، و يتم وضع المجس فوق الوعاء الدموي تمامًا عند بدء تفرعه من Carotid Siphon سيفون السّباتي، ويتمّ تطبيق الحدّ الأدنى من زاوية الرنين (<15 درجة)(Brennand, J., 2009) .

حيث وجد أن هناك ترابطاً وثيقاً بين تركيز الخضاب الجنيني، وقياس السعة الانقباضية للشريان المخي المتوسط خاصةً في حالات فقر الدّم الجنيني الشديد، بحيث يصبح التّوافق بين تركيز الخضاب الجنيني، و MCA-PSV أكثر دقّة كلمّا زادت شدة فقر الدّم، حيث يتم تصنيف درجات فقر الدم الجنيني وفقًا لمضاعفات وسيط عمر الحمل(MoM). إذ يتم حساب مضاعفات الوسيط multiples of median (MoM) عن طريق قسمة القيمة المقاسة (سم/ثا) على القيمة المتوقعة للعمر الحملي وتعدّ قيمة MoM 1.5 < MCA PSV (ضعفاً من المتوسط

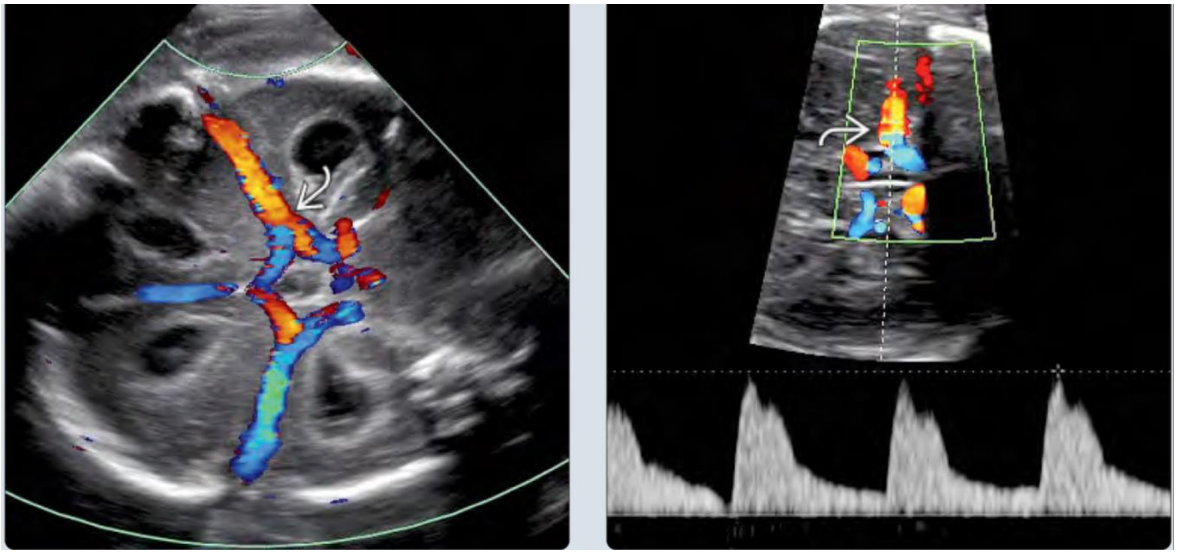
تبعاً لعمر الحمل) بعد الأسبوع 18 للحمل، حداً فاصلاً لكشف فقر الدم الجنيني الشديد (Mari, Giancarlo et al., 2000).**الشكل 13**



الشكل (13): قياس السعة الانقباضية بوساطة دوبلر الشريان المخي المتوسط (MCA–PSV) وفق العمر الحملي (الأسابيع)(Moise, K. J., Jr. et al., 2012)

حيث تتظاهر الاستجابة الفيزيولوجية للجنين في حال فقر الدم بزيادة في حجم الضّربة القلبية، وبالتّالي زيادة في نتاج القلب، ونتيجة لذلك يطوّر الجنين دورةً مفرطة الدّيناميكية، ليتمّ إعادة توزيع تدّفق الدّم إلى الأعضاء النّهائية الحيويّة، بما في ذلك الدّماغ والقلب والغدة الكظريّة، يتبع ذلك تغيّرات في مقاومة الأوعية الدمويّة، وانخفاض لزوجة الدّم، الّتي تؤدّي إلى زيادة تدفّق الدّم وبالتّالي سرعة الجريان الدّمويّ، وينعكس هذا في الشّريان المخيّ الأوسط عن طريق زيادة ذروة سرعة الانقباض.(Brennand, J., 2009)

ذكرت Mari et al في أولّ دراسة حشدية متعددة المراكز أنّ حساسيّة هذا الإجراء في حالات فقر الدّم الشّديد أو المعتدل يقارب 100%، بايجابيّة كاذبة تعادل 12%،(Mari, G. et al., 2007) كما أثبتت العديد من الدّراسات أهميّة هذا الإجراء في تحديد زمن إجراء IUT Intrauterine Transfusion (Nwogu, 2018)



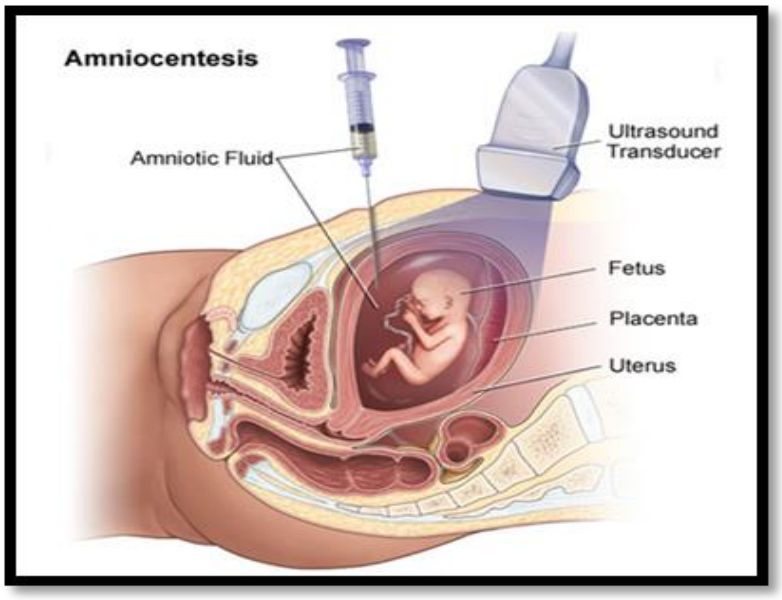
الشكل (14) تصوير بإيكو دوبلر المقطعي الملون للدماغ الجَنيني يُظهر مُسبع ويلس، وذلك لقياس سُرعة الجريان في الشريان المُخي المتوسطMCA ، ويكون القياس الأدق بوضع البروب قرب منشأ الشريان المخي المتوسط من السباتي الباطن، حيث يتم تقييم ذروة سُرعة جريان في الشريان المخي المتوسط MCA Peak Systolic Velocityمع كل نبضة قلبية، وتُعتَبَر القيمة إيجابية لفقر الدم حين تكون أكبر بمقدار1.5 من الوسطي نسبة للعمر الحملي(Brennand, Janet, 2009)

2-6-6 بزل السّلى Amniocentesis:

يتمّ بزل السّلى بوقت مثالي بين 15-18 أسبوع حملي، حيث يجرى الفحص بالتصوير بفائق الصوت لتحديد موقع جيب السّائل الأمنيوسي، بحيث يكون بعيداً بما فيه الكفاية عن الجنين والمشيمة للحصول على العينة بشكل آمن. يحمل بزل السّلى الموجه بالتصوير بفائق الصوت نسبة خطورة منخفضة للجنين أو الأم، وهو يمثل الطريقة الوحيدة الملائمة للحصول على عينة من السّائل الأمنيوسي.(Alfirevic et al., 2017)

ويعتبر النزفُ الجنينيُّ الوالديُّ الناجمُ عن هذا الإجراء ذا أهميةٍ خاصةٍ، حيث يمكن أن يسيء إلى شدة التّمنيع لدى الام المحسسة سابقاً، اذ تبلغ نسبة النزف الجنيني الوالدي 8.4 -11 % لكلّ حالة –بزل.

كما تبلغ خطورة فقد الجنين 1% بينما تقلّ نسبة الوفيات الجنينية الناتجة عن بزل السّلى في حالات انحلال الدم عن 1:900في المراكز المختصة.(Mujezinovic, 2007) **الشكل 15**



الشكل(15): يبين طريقة اخذ العينة في مرحلة قبل الولادة من سائل السّلى

يعد تحليل سائل السّلى الطريقة الأكثر استخداماً في اثبات وجود انحلال الدم الجنيني، وتحديد شدته وذلك عبر

2-6-7 القياس الطّيفي الضّوئي للسّائل الأمنيوسي (مشعر Liley) :

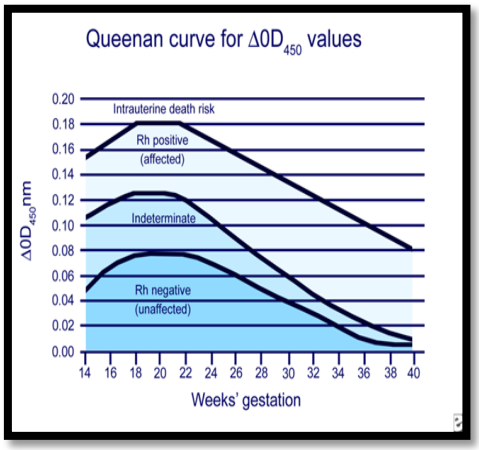
وصفت هذه الطريقة لأول مرة بواسطة Liley عام 1961 لدى الأمهات المحسسات لكشف وتقييم شدة الانحلال الدَموي لدى الجنين بدءاً من الأسبوع 27 من الحمل(Liley, 1961)، وقد استخدمت على مدى نصف القرن الماضي لكن تم استبدال هذه الطريقة الآن إلى حد كبير بتقنيات مراقبة الجنين غير الباضعة.

حيث تم فيه بزل السّلى المتسلسل بفاصل 10-14 يوماً، و قياس مستويات البيلروبين غير المقترن، الذي يعد مؤشراً لقياس انحلال الدم الجنيني بواسطة قياس انحراف الكثافة البصرية عند طول موجة 450 نانومتر OD450 delta ، ولتفسير النتائج تم اسقاط النتائج على منحنى ليلي (Liley Curve) الذي يقارن مستوى البيلروبين مع عمر الحمل، وقد استطاع Liley بالاعتماد على هذه الطريقة تقسيم مخطط المقارنة إلى مناطق تتنبأ بالحالات المرضية الخفيفة، المتوسطة، والشديدة التي تستوجب انهاء الحمل إذا كان عمر الجنين أكثر من 32 أسبوع، او إجراء نقل الدم داخل الرّحم إذا كان عمره أقل من 32 أسبوع حملي.

حيث تشير القراءات في المنطقة 1، المنطقة الأدنى، إلى وجود داء انحلالي خفيف أو معدوم مع وجود خطر بنسبة 10 % للحاجة إلى نقل الدم بعد الولادة؛ بينما تشير القراءات في المنطقة 2 إلى إصابة معتدلة، وتشير القراءات في المنطقة 3، المنطقة العليا، إلى إصابة الجنين بالموه الجنيني **الشكل 16**

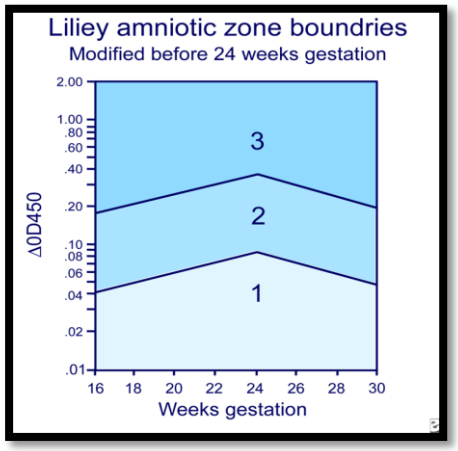
مخطط Queenan:

بسبب عدم قدرة مخطط Liley على تحديد فقر الدم الجنيني بدقة قبل الأسبوع 27، تم تعديل مخطط Liley لاحقًا بواسطة Queenan ليشمل بيانات من 14 إلى 40 أسبوعًا من الحمل اذ يحتوي على 4 مناطق، مع أدنى منطقة تمثل الأجنّة غير المصابة وأعلى منطقة مرتبطة بزيادة خطر الموت داخل الرحم.(Scott, F. et al., 1998)**الشكل 17**



الشكل (17): مخطط Queenan

(Moise, K. J., 2008)



الشكل (16): مخطط ليلي(Moise, K. J., 2008)

جعل هذا من مخطط Queenan المقسم إلى أربع مناطق عوضاً عن ثلاث، البديل المناسب للتنبؤ بشدة الحالة بدءاً من الأسبوع 14حتى نهاية الحمل. **الشكل17**

2-6-8 اعتيان دم الجنين (الحبل السري عبر الجلد) (PUBS)

هي الطّريقة الأكثر دقة لتشخيص حالات الانحلال الدّموي عند الجنين، حيث يسمح سحب عينةٍ دمويةٍ من الحبل السري عبر الجلد بمعايرة مستويات الخضاب، والهيماتوكريت، غازات الدم، PH، والبيلليروبين في دم الجنين. يستطب هذا الإجراء في الحمول المحسسة إسوياً، لتحديد زمرة دم الجنين ولتأكيد فقر الدم الجنيني الشّديد المشتبه به بناءً على قيم الايكو دوبلر للشريان الدماغي الأوسط >MOM1.5، أو بعد المراقبة بالموجات فوق الصّوتية الموّجهة لتطوّر الموه الجنيني، أو بعد الحصول على نتيجة بزل السّلى حيث يكون التّغيير في قياسات الكثافة البصرية عند 450 نانومتر في منطقة Liliey 3، أو في "منطقة الموت داخل الرحم" في مخطط Queenan .

تحتاج هذه الطّريقة التّشخيصية إلى خبرة أكثر من تلك اللازمة لبزل السّلى ، وتكمن خطورته في حدوث النّزف الجنيني الذي ينتج عن تمزق الأوعية السّرية بنسبة تبلغ 2%. لكن خطورة حدوث النّزف الجنيني الوالدي قد تصل إلى 40%. **الشكل 18**

2-6-9 اعتيان الزّغابات المشيمائية Chorionic Villus Sampling :

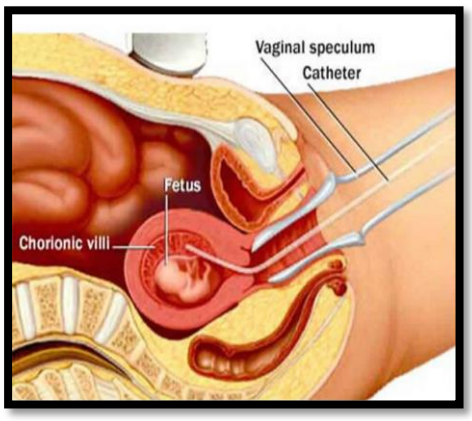
يتم إجراء CVS بالشكل الأمثل بين 10 و13 أسبوعاً حملياً،(De Jong, 2010) ويهدف إلى جمع أنسجة المشيمة، الذي يمكن أن يتحقق عن طريق إدخال قسطرة موجهة عبر عنق الرحم، أوعبر جدار البطن إلى المشيمة، وذلك تحت توجيه التصوير بفائق الصوت(ultrasound). **الشكل 19**

يمكن إجراء التّحاليل الصّبغية الجنينية مباشرةً خلال 24 ساعة، لكن يفضّل أن يتم زرع الخلايا المستخلصة من العينة وإجراء التّحليل ثانية بعد 2-3 أسابيع، وذلك بسبب حالات التزيّقMosaicism في عينات الزّغابة المشيمية، لكن تبقى نسبة خطورة فقدان الحمل فيها 1-2%.(Mujezinovic, 2007) .

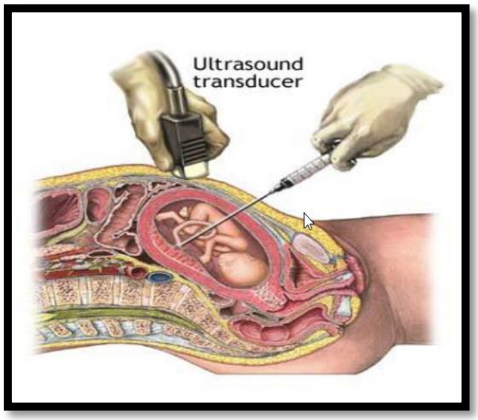
بسبب كل ما ذكر سابقاً، كان البحثُ عن طرائق بديلة غير باضعة، أكثر أماناً للحصول على DNA الجنين وإجراء التنميط المورثي RHD ضرورة ملّحَّة وهدفاً مهماً.

جدول(2): الاختلافات بين طرائق التشخيص الباضعة.(Bustamante-A, 2010)

الطريقة المتبعة	الوقت الأمثل لاجرائها	نسبة خطورة فقد الجنين	الاعتيان
CVS اعتيان الزّغابات المشيميائية	10-12 أسبوع	1%-2%	الزّغابات الكوريونية
AF بزل السّلى	16 أسبوع	0.5%-1%	السّائل الأمنيوسي
FBS اعتيان الدم الجنيني	18-20 أسبوع	1%-2%	دم الحبل السري



الشكل (18): اعتيان دم الجنين الحبل السري عبر الجلد



الشكل (19): يبين طريقة اخذ اعتيان الزّغابات المشيميائية عبر المهبل

2-6-10 تحديد زمرة RHD الجنين:

لقد ساهم التّطور الحاصل في مجال التّنميط المورثي RHD قبل الولادة على إيجاد وسائل أقلّ بضعاً لتحديد RHD الجنيني، إذ كان التّقدم الوحيد الأكثر أهميَّة في السّنوات الأخيرة في التّدبير ما قبل الولادة للنساء المحسسات هو إدخال التّقنيات الجزيئيّة لتنميط الزّمر الدّمويّة من الحمض النوويّ الجنيني، فقد تمّ بداية تحديد النّمط المورثي الجنيني باستخدام DNA المعزولة من خلايا السّائل السّلوي،(Fisk et al., 1994) بينما يتم حالياً إجراء التنميط المورثي بطرائق أقل بضعاً بالاعتماد على ccffDNA أو DNA خلايا الجنين في الدم الوالدي، بواسطة تقنية PCR للكشف عن الجينات *RHD,RHCE*.

وقد كان Faas et al أوّل من ذكر أهمية التنميط المورثي RHD في الحمول المحسسة حيث وجد أنّ التنميط المورثي RHD الجنيني باستخدام ccffDNA المنتقل عبر بلازما الأمهات أكثر فعالية من حيث التكلفة، وسهولة تطبيقه في الممارسة السريرية.(Faas et al., 1998)

إنّ التنبؤ المبكر للنمط المورثي RHD الجنيني، يسمح بالتّدبير الصّحيح والموجه للنساء سلبية RHD المحسسة، حيث تكون هذه الاختبارات ذات قيمة في الحالات ذات سوابق بالإصابة ب HDFN خاصة عندما يكون الزّوج متغاير الألائل بالنسبة للمستضد RHD (أو أن يكون مجهولاً). وهذا يسمح بالمراقبة المبكرة والمكثفة للأجنّة المعرّضة لخطر الموت في الرحم، مع التّدخل المبكر عند الضرورة. وعلى العكس من ذلك، عندما يكون الجنين سلبيًا لـ RHD، يمكن تجنب المزيد من التقنيات الباضعة.

لقد وجد Finning أن دقة التنميط المورثي RHD الجنيني في الدم المحيطي الوالدي تبلغ 100%. مما أدى إلى إدخال هذا الاختبار إلى الممارسة السريرية منذ ايار 2001، في المختبر المرجعي الدولي لزمرة الدم (International Blood Group Reference Laboratory (IBGRL) في بريستول بالمملكة المتحدة. (Finning, K. et al., 2004)

كذلك أثبتت العديد من الدراسات التي أجريت لتحديد النمط المورثي RHD من ccffDNA في الدم المحيطي للام، أن تحليل PCR الكمي بالوقت الحقيقي باستخدام المشرعات والمسابر التي تضخِّم كلاً من الإكسونات 4و 5 و10 من RHD، هو اختبار موثوق 100%. (Hromadnikova et al., 2005; Moezzi et al., 2016)

تتمّثل الاستراتيجية المثالية لتحديد النمط الوراثي RHD قبل الولادة في تصميم زوج من مشرعات PCR الأوليّة التي من شأنها تضخيم منطقة معينة من جين *RHD* بدون تهجين متصالب، مع جين *RHCE* أو بأي جين أخرى، وبالتالي فإن منتج PCR سيتمّ توليده من RHD الإيجابي وليس RHD السّلبي، ولإثبات أن عدم وجود منتج خاص بـ RHD من DNA الخاص بـ RHD السّلبي لا يرجع إلى خطأ مختبري أو تجريبي، يجب إجراء التّضخيم مع تفاعل نوعي لـ RHD، واستخدام تسلسل خاص بجين *RHCE*. إذ تكمن الصّعوبة الأساسية في

تصميم مشرعات PCR أوليّة نوعيّة لـ RHCE وRHD لأن المورثتين تتميزان بدرجةٍ عاليةٍ من التماثل.(gregory, 2013)

2-7 الوقاية من RHD-HDFN

2-7-1 الغلوبولين المناعي RHD Immunoglobin:

هو محلول عقيم غالباً من نوع IgG، معد للحقن العضلي أو الوريدي، يحضر Rho-GAM من المصل البشري المجزأ الذي يتم الحصول عليه من المتبرعين المتطوعين سلبيي RhD مفرطي التحسيس، Hypersensetivity II حيث يتم تعريضهم لكريات حمراء ايجابية RhD لتحرض على انتاج anti-D، ويتم استخدام ترسيب الإيثانول البارد لفصل الغلوبولين المناعي عن البلازما المعزولة، وتُفحص لاحقاً بحثاً عن المستضد السطحي لالتهاب الكبد C،B وأضداد فيروس عوز المناعة البشري المكتسب HIV و parvovirus B19.

2-7-2 التوصيات المتعلقة ب جرعة anti -D وتوقيت اعطائها الحامل سلبية RHD:

يظهر الجدول(3) التَوصيات الصادرة عن–الجمعية الأمريكية لبنوك الدم والكلية الأمريكية للمولدين وأطباء النساء The American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) and the American Association of Blood Banks (AABB عام 1998، والتي تهدف إلى:

- خفض نسبة حدوث حدوث التمنيع الخيفي وبالتالي انخفاض في HDFN
- ترشيد استخدام anti-D (Ig) وتقديم الجرعات السريرية المناسبة منه

تتحدد فعالية RhIG في الوقاية من حدوث التّمنيع isoimunization بتقديمه بالجرعةِ المناسبة، وقبل حدوث التمنيع. إذا لم يتم إعطاء الوقاية الرّوتينيّة الموجهة من anti-D IG، فان نسبة حدوث التّمنيع ب anti-D تكون حوالي 13.2٪ لكل حمل إيجابي RhD. بينما إذا تم إعطاء الوقاية الموجهة بعد الولادة فقط، فان معدل التّمنيع ينخفض إلى حوالي 1.8 ٪، لكن ينخفض معدل التّمنيع في النساء اللواتي يتلقين العلاج الوقائي قبل الولادة وبعدها، إلى حوالي 0.14٪(Moise, K. J., 2008)

تختلف الجرعة الوقائية الموجهة من anti-D باختلاف البلدان، حيث تم اعتماد جرعة مقدارها 1500 وحدة دولية في الولايات المتحدة الأمريكية لتغطية احتمال حدوث نزيف أكبر. بينما في المملكة المتحدة وفرنسا، يتم استخدام جرعة أصغر من 500 وحدة دولية بشكل روتيني. (McEwan, 2018) إن جرعة 125 وحدة دولية من anti-D قادرة على تعديل 1 مل من خلايا الدم الحمراء الجنينية. قد يحدث نزف الجنين (FMH) بمقدار 30 مل في 0.6٪ فقط من جميع الولادات.

جدول(3): توصيات ACOG في تقديم الوقاية ب anti–D

(المستوى أ): Grade A: high level of evidence.	يجب تقديم anti-D IgG الوقائي النساء سلبية Rh D غير المحسسات خلال الأسبوع 28 من الحمل RAADP (الوقاية الرّوتينيّة)، وكذلك يجب أن تتلقى جميع النساء سلبيات Rh D غير المحسسة خلال 72 ساعة بعد ولادتها طفلاً إيجابي ال RHD •(الوقاية الموجهة).
المستوى B Grade B: moderate level of evidence.	يكرر اختبار anti-D لجميع النساء السلبيات RHD غير المحسسة في 24–28 أسبوعا من الحمل، إلا إذا كان الأب البيولوجي معروفًا بأنه RHD سلبي. يوصى بإعطاء anti-D مع جميع الإجراءات التشخيصية الباضعة مثل أخذ عينات من الزّغابات المشيمية أو بزل السّلى في النساء السلبيات لـ RHD عندما تكون الأجنّة موجبة لـ RHD
المستوى C low or very low level of evidence.	يوصى بإعطاء anti-D لجميع حالات الحمل خارج الرّحم الذين أنهوا حملهم، إما طبياً أو جراحياً، أو من يعانين من نزيف ما قبل الولادة بعد 20 أسبوعاً من الحمل. او الذين تعرضوا لصدمة في البطن. والذين يعانون من موت الجنين في الثّلث الثاني أو الثالث. كما يستحسن إعطاء anti-D للنساء السلبيات .RHD خلال تفريغ الرّحم من الرحى العدارية

الفصل الثالث

DNA الجنيني الجائل في الدوران الوالدي

3-1 مقدمة:

على الرّغم من أنَ الغالبية العظمى من الـ DNA البشري يوجد ضمن نوى الخلايا، فقد اكتشف كل من Mandel and Metais عام 1948 وجود كمياتٍ ضئيلة من الـ cfDNA خارج الخلوي ضمن الدّوران في مصل مرضى السّرطان(Mandel, 1948)، بينما اقترح Bendich et al أن cfDNA المتحرر من النسيج المصاب بالسّرطان، قد يكون له دور في حدوث النّقائل الورمية cancer metastasis، وقد لاحظ Tan et al في عام 1966 وجود ترابط وثيق بين تركيز cfDNA وتطور بعض أمراض المناعة الذّاتية،(Tan et al., 1966) لكن لم يوظف cfDNA في تشخيص الورم حتى عام 1977 وذلك عندما سجل Leon et al ارتفاع تركيز cfDNA في مصول مرضى السرطان،(Leon et al., 1977) في حين سُجل عزلُ كمياتٍ زهيدة منcfDNA من مصل الأفراد الأصحاء (وسطياً 13 ±3 نانوغرام /مل). كما أظهرت العديد من الدّراسات أن تركيز DNA الحر البلاسمي يزداد في الأمراض التنشؤية وكذلك الاختلاطات الحملية، والرّضوض، وبعض أدواء المناعية الذّاتية، حيث يترافق التّحليل الكميّ لـDNA مع التغيرات الكيفيّة في DNA البلاسما في العديد من الظّروف المرضيّة والفيزيولوجيّة. (Chan, K. C. et al., 2005)

ونظراً لتواجد Leon وزملائه في مركز أبحاث السّرطان، وإدراكه مقدار التّشابه بين نمو الوحدة الجنينية – المشيميائية عند المرأة الحامل و تطوّر الورم، الذي عمل على كشف وجود الـDNA الجنيني في دوران الأم في عام 1997 (Lo, Y. M. et al., 1997) وكان Dennis Lo أوّل من استخدم تقنية تفاعل البوليميراز التسلسلي الكمي qPCR quantitative PCR، لتقصي تتالي DNA الخاص بالصّبغي الجنسيY للأجنّة الذّكور، مستخدماً مشرعات SRY (تسلسل وحيد للصبغي Y)، علىccffDNA المستخلص من بلازما نساء حوامل بأجنّة ذكور، حيث أظهرت هذه التجارب وجود كمياتٍ كبيرةٍ من ccffDNA للجنين الذّكري في بلازما أو مصل الأم وقد تم تقديرها بأعداد نسخ SRY حيث كانت نسبة DNA الجنين إلى DNA الوالدي في البلازما تعادل 775-970 ضعف كمية DNA المستمدة من خلايا الجنين المعزولة.(Lo, Y. D. et al., 1998)

كان هذا أول تظاهرة ل ccffDNA في بلاسما الأم، وإدراك ان DNA البلاسمي هو مزيج فسيفسائي من ccfDNA الوالدي والجنيني.(Lo, Y. M. et al., 1999)

استناداً إلى تلك النتائج، فقد اتّجهت العديدُ من تقنيات الكشف عن ccffDNA عن طريق PCR الكميّ، للتطبيق السّريري لهذا الواسم الحيوي خاصة فيما يخص التشخيص ما قبل الولادة prenatal diagnosis لبعض الاضطرابات المتعلقة بالحمل، أو تقصي الأمراض الجنينية ذات المنشأ الوراثي، وقد نال هذا النهج الأخير اهتمامًا كبيرًا، نظرًا لأنّه يتمتع بميزات معينة على عزل خلايا الجنين الأولية، مثل السرعة والموثوقية والتكلفة المنخفضة وطرائق العمل المخبرية الأقل مشقة.(Blanco et al., 2018; Hahn et al., 2005)

حاليّاً، يعد ccffDNA هو الأداة المثالية للتشخيص ما قبل الولادة غير الباضع .Prenatal NIPD Non-Invasive Diagnosis إذ يتم تمثيل جينوم الجنين بكامله في الدّوران الدموي للأم، كما يتميز بكونه أكثر سهولة من عزل DNA خلايا الجنين، وأكثر ثباتاً من cfRNA. (Sillence, 2016)

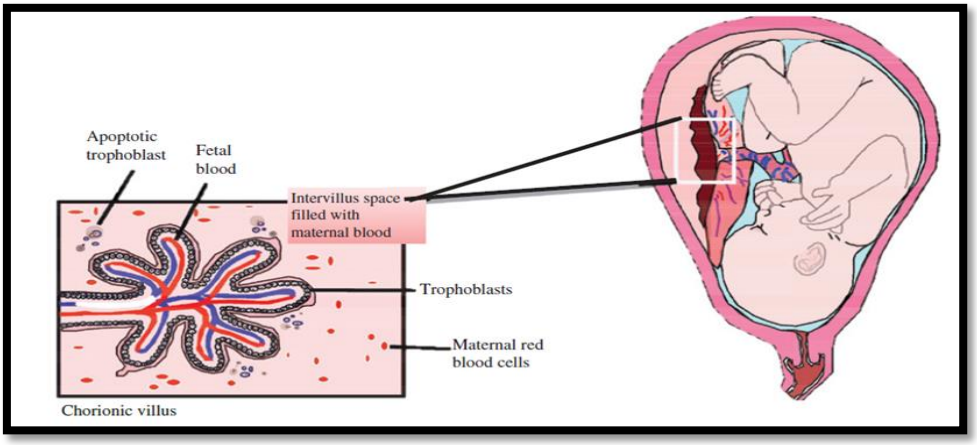
3-2 مصدر ccffDNA في بلاسما الأم

يعدَ معرفة مصدر ccffDNA أمراً هاماً ليس فقط من النّاحية النَّظرية، وإنّما أيضاً من النَّاحية العملية وذلك بسبب الأهميّة التّشخيصية له، إذ كان يعتقد في البداية أن ccffDNA ينشأ من الخلايا المكوّنة للدم الجنينية Fetal Hematopoietic Cells خاصة بعد عزل أنواع مختلفة من الخلايا في دم الأمّ،(Bianchi, 1999) ومع ذلك كان من غير المحتمل أن يكون هذا هو المصدر الوحيد بسبب العدد المنخفض نسبيًا للخلايا المعزولة من دم الام، إلى أنْ لاحظ Zhong وزملاؤه ارتفاعاً ملحوظاً في مستويات ccffDNA دون أي زيادة إضافيّة في عدد خلايا الدم الحمراء الجنينية.(Zhong et al., 2002) وقد تم دحض فكرة كَوْن الخلايا المكونة للدّم الجنينية مصدراً لـ ccffDNA في دم الأم لاحقاً بواسطة Angert وزملائه (Angert et al., 2003) الذي افترض في الأصل أن الخلايا الجنينية في طور الاستماتة تطلق الحمض النووي DNA، مما يزيد من تركيز ccffDNA.

تـدل حركيـة DNA الجنيني في الـدّوران الوالـدي على أن المشـــيمـة هي المصـــــدر الرئيس لـ ccffDNA.(Bianchi, 2004) حيث كشـفت أنماط المثيلة التفاضـلية بين خلايا دم الأم وأنسـجة المشـيمة عن الأصل المشيمي لــ ccffDNA، إذ يتم مثيلة محفّز promoter الجين mapsin في خلايا دم الأم، والذي يتميز بنقص الميثيل hypomethylated في أنســجة المشــيمة (Chim et al., 2005) حيث تم الكشــف من خلال التنميط المورثي لتعدد الأشكال أحادي النوكليوتيدات single-nucleotide polymorphism في تسلسل maspin قليل المثيلة المعزول من بلازما الأم، وقد تبين لاحقاً أن هذا التّسلسل مشتق من الجنين.(Swarup, 2007)

جاءت المزيد من الدّراسات لتؤكّد المنشأ المشيميّ لـ ccffDNA، فقد أظهرت أن مستويات ccffDNA كانت هي نفسها في حالات الحمول الطّبيعية و في الحمول غير المضغيّة، مما يدعم الفرضيةَ القائلةَ بأنَّ الأرومة الغاذيّة هي المصدر الرّئيسي.(Alberry, 2007; Guibert, 2003) ما يشير أيضاً إلى أصل ccffDNA المشيمي هو تزامن ارتفاع مستويات ccffDNA مع إنشاء الدّورة الدّموية الجنينية المشيمية

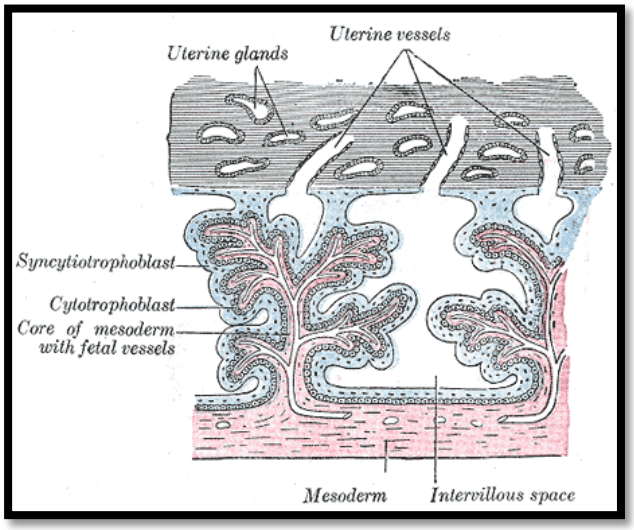
الشكل(20): مصدر Cell-free DNA في الدم المحيطي للام الحامل (Delaney, 2018)



كما تعد الدراسات السَّريرية المجراة على الاضطرابات الحملية أيضاً من أقوى الأدلة على أن مصدر ccffDNA هو المشيمة، فقد وجدت زيادة نسبية ccffDNA في حالات المشيمة الباضعة مترافقة مع حالات الإجهاض العلاجي، حيث يكون طرد المشيمة غير مكتمل، ويبقى ccffDNA قابلا للكشف. بينما في الظروف

العادية، يتم التخلص من ccffDNA بسرعة نسبياً بعد الولادة.(Wataganara, Chen, et al., 2005)

(Wataganara, Metzenbauer, et al., 2005)



الشكل (21): رسم تخطيطي يوضح الزّغابات المشيمائية الأولية

Henry Vandyke Carter (1918) *Anatomy of the Human Body* (See "Book" section below) Bartleby.com:Gray's Anatomy, Plate 37

ينشـــأ ccffDNA على المســـتوى الخلوي، من الخلايا الأرومة الغاذية الخلوية cytotrophoblast التي تطرح باســتمرار في الدّوران الوالدي طيلة فترة الحمل،(Neufeld-Kaiser, 2015) ويشـكّل ما يقارب 10–20% من مجمل cell-free DNA في الدم المحيطي للأمّ الحامل في الثّلث الحملي الثّاني من الحمل(Song et al., 2015). **<u>الشكل 21</u>**

3-3 التوّزع الحجمي للحمض النووي للأم والجنين :

إنّ cfDNA الجائل في الدَّم المحيطي للأمّ، هو عبارة عن شدف مقطّعة يبلغ طولها تقريبا (180bp–150bp) حيث يتميز cfDNA الوالدي بطول الشدف 166 bp، وتظهر الشدف الجنينية بطول 143 bp (الجنين cfDNA)(Lo, Y. M. et al., 2010) يعكس هذا التوزع الحجمي غير العشوائي في تجزئة cfDNA تنظيم فوق الجينية epigenetic regulation. (Ivanov, 2015)

يرتبط تركيز ccffDNA بعدة متغيرات أهمها:

3-3-1 علاقة ccffDNA مع العمر الحملي:

تحدث زيادة تركيز cfDNA بمعدل 0.1٪ تقريبًا في الأسبوع بين 10 و 21 أسبوعًا من الحمل وبسرعة أكبر بعد 21 أسبوعًا، بنسبة تقارب 1٪ أسبوعياً .(Wang, E. et al., 2013) و تحدث الزِّيادة الحادة في ccffDNA في بلاسما الأمهات خلال الأسابيع الثمانية الاخيره من الحمل والتي تعزى للانهيار التّدريجي للحائل الوالدي-الجنيني/ المشيمة (Bianchi, 2004)

يظهر التّقدير الكمي الأوليّ باستخدام تفاعل البوليميراز السلسلي في الوقت الحقيقي Real Time PCR أن 3.4-6.2٪ من cfDNA في دوران الأم هو من أصل جنيني، وذلك في وقتٍ مبكرٍ من الحمل (11-17 أسبوعًا) وفي أواخر الحمل (30-40أسبوعًا من الحمل)، على التوالي ومع ذلك، تشير الدَّراسات الحديثة باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل الرقمي digital PCR إلى أن هذه القيمة ربما تكون أقل من الواقع بكثير فقد وجد متوسط ccffDNA 9.7٪ و 9٪ و 20.4٪ في الثّلث الحملي الأول (12-14 أسبوعًا) و في الثّلث الثاني (17-22 أسبوعًا) ، والثّلث الحملي الثالث (30-38 أسبوعًا) على الترتيب.(Lun et al., 2008)

فقط 1 - 3٪ من حالات الحمل لديها cfDNA أقل من 4٪.(Sparks, 2012)

في الحقيقة ان ccffDNA يمثل الجزء الأقل من cfDNA، حيث أن غالبية cfDNA أمومية في الأصل، الأمر الذي يمثّل تحديًا لحساسية المقايسات وتحليل البيانات حيث يمكن أن يتسبب تركيز cfDNA المنخفض في حدوث نتائج سلبية خاطئة.

3-3-2 علاقة ccffDNA مع مؤشر كتلة الجسم BMI:

يوجد علاقة طردية بين مؤشر كتلة الجسم Body Mass Index (BMI) ومستويات إجمالي cfDNA، حيث يرتفع تركيزه لدى النّساء اللواتي لديهن BMI مرتفع، والذي ينتج غالباً عن زيادة نخر الخلايا الشّحمية وموت الخلايا المبرمج الوعائي الذي يحدث في الأشخاص البدينين (Scott, F. P. et al., 2018) (Wang, E. et al., 2013)

تم دعم هذا المفهوم من خلال النّتائج التّجريبية in vitro حيث أظهرت خلايا الأوعية الدّموية اللّحمية تعبيرًا بروتينيًا متزايدًا عن caspase-9 وcaspase-3 في حالات البدانة، مما يشير إلى أن إعادة التّشكيل النشط للأنسجة الدّهنية في النساء الحوامل البدينات، قد يؤدي إلى زيادة إفراز cfDNA في الدورة الدموية وبالتالي انخفاض تركيز ccffDNA. (Sifakis, 2015)

3-3-3 اختلال الصيغة الصبغية للجنين: وهو ذو تأثير متفاوت علىccffDNA، حيث يرتبط التثلث الصبغي 21 بزيادة ccffDNA, لكنه يرتبط في حالات التثلث الصبغي 18 و13 بمستويات أقل من ccffDNA، ويُعتقد أن السبب يرجع إلى انخفاض حجم المشيمة الذي لوحظ في تلك الحالات. (Canick, 2013).

3-3-4 الحمول المتعددة: في حالات الحمل المتعددة حيث تكون هناك زيادة في كتلة المشيمة، على سبيل المثال التوائم ثنائية المشيمة، يميل جزء الجنين إلى أن يكون أعلى منه في حالات الحمل المفرد.

3-3-5 حالات مرضية لدى الأم الحامل: أظهرت العديد من الدراسات أن هناك زيادة في الحمض النووي للجنين لدى النساء المصابات بالارتعاج المترافق بظهور أعراض (Zhong et al., 2001) و السّيدات المصابات بمقدمات الارتعاج (Zhou et al., 2015)

في حين لا يؤثر على ccffDNA وجود الدّاء السكري لدى الام الحامل، أو حالة فرط نشاط الغدة الدّرقية، أو كون الام حاملًا لـ HbsAg.(Zhou et al., 2015)

3-3-6 المشيمة المنزاحة: placental previa

يزداد تركيز ccffDNA في حالات الحمل بالمشيمة المنزاحة، فقد أشارت النتائج إلى أنه عند 15-28 أسبوعاً من الحمل، كان تركيز فرط ميثيل RASSF14A أعلى بشكل ملحوظ في المجموعة المرضية (n = 14) مقارنة بالحالة الطبيعية.

3-3-7: تحديد النمو داخل الرّحم Intra Uterine Growth Restriction IUGR:

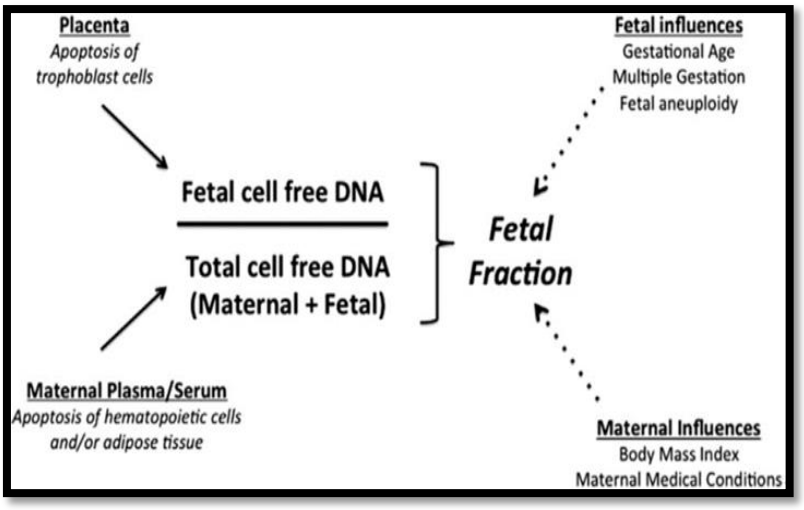
هو اضطراب حملي معقد متعدد الأسباب يتميز بفشل الجنين في تحقيق إمكاناته الطبيعية للنمو، ويرتبط بأمراض ووفيّات حول الولادة، وكذلك أمراض القلب والأوعية الدموية في حياة البالغين، وعلى الرغم من تعدد أسباب تطور IUGR، فإن الخلل المشيمي يعد أهمها.(Scott, F. P. et al., 2018)

يعد عدد الدّراسات التي تناولت IUGR فيما يتعلق بمستويات ccffDNA أقلّ من تلك التي تناولت ما قبل الارتعاج. ففي دراسة مبكرة في عام 2003 أجراها Sekizawa وآخرون UGR ووجدت أن مستويات الحمض النووي للجنين في حالات IUGR كانت مماثلة لتلك الموجودة في الحالات الشاهدة، بينما أظهرت دراسة لاحقة عام 2006 من قبل Smid et al مستويات متزايدة من ccffDNA في الأجنّة مع تقييد نمو الجنين (FGR).

تم تأكيد هذه النتائج من خلال أحدث دراسات Alberry et al و Al Nakib et al، الذين استخدموا حجم عينات أعلى بكثير مقارنة بتلك التي استخدمها Sekizawa وآخرون في عام 2003 تبيّن أن مستويات ccffDNA تكون أعلى بكثير في حالات IUGR بسبب تقييد نمو الجنين عنها في حالات الحمل العادية، والتي ترجع جزئيًا إلى قصور المشيمة.

3-3-8 داء التقياء الحملي Hyperemesis Gravidarum

يبدو أن ccffDNA يلعب دورًا مهماً في النساء المصابات بداء التقياء الحملي Hyperemesis Gravidarum كمتنبئ بالأعراض السريرية ، حيث تم الكشف عن تركيز ccffDNA أعلى بشكل ملحوظ في 16 امرأة تعاني من المرض (21.6 -311.2 مكافئات جينوم / مل) مقارنة بـ 23 امرأة ذات حمل طبيعي (6.6 -59.6 مكافئات جينوم / مل) (Sekizawa, A et al., 2001)



الشكل(22) : العوامل المؤثرة على كل من cffDNA–cfDNA (Sayres, 2011)

3-4 المتغيرات التي تؤثر على عزل cffDNA:

يعدّ تمييز أو عزل الcffDNA ضمن خلفية طاغية من الccfDNA المشتق من الأم تحديّاً تقنياً كبيراً، بسبب:

- التّركيز المنخفض نسبياً للDNA الحر في الدَّم.
- تفاوت الكمية الكلية لل DNA الحر ما بين الأشخاص.
- ان نسبة cfDNA الوالدية تفوق نسبة cfDNA المشيمي (المعروف أيضًا باسم "الجزء الجنيني" FF). حيث يبلغ متوسط نسبةDNA الوالدي إلى الجنيني حوالي 9:1 في الأسبوع الحملي العاشر.(Pös et al., 2018)
- وراثة الجنين لنصف جينومه من الأم.(Wright, 2008)

وقد تم تطوير العديد من الطرائق لتجاوز تلك العقبات. وذلك بفصل الccfDNA عن باقي مكونات الدم. حيث يتم فصل البلازما أو (المصل) عن المكونات الخلوية بالتثقيل centrifuge (فصل البلاسما عن الجزء الخلوي من الدم بحيث يكون الطافي خالي تماماً من الخلايا لمنع حدوث التلوث بـDNA الجينومي) يتراوح مردود استخلاص cffDNA وفقاً للطريقة المتبعة، والتي تعتبر عاملاً حاسماً في التنميط الوراثي للجنين من دم الأم.

كما يتأثر مستوى ccffDNA في العينة الدّموية بشروط ما قبل إجراء التحليل التي تتضمن النقل والتخزين والتثفيل، حيث يعزى النقص الملاحظ بتعداد الكريات البيضاء في الدّم ضمن الأنبوب الدموي إلى الاستماتة الخلوية، أو حدوث التنخر الخلوي والذي يؤدي إلى تحرر DNA الجينومي، وبالتالي زيادة ملحوظة في تركيز ccfDNA خاصة عند حفظ العينة لعدة ساعات قبل إجراء التّثفيل. كما أن تحرر جزء ccfDNA المرتبط أساساً على سطح الخلية، هو سبب آخر لزيادة تركيز ccfDNA الذي يحدث نتيجة التأخر في التعامل مع العينة، كما أنّ هناك فرضية أخرى تقول بتحرر فاعل لccfDNA من الخلايا الدموية ضمن الأنبوب الدموي، وكما ذكرنا سابقا قد يكون للعديد من المتغيرات تاثير على تركيز ccffDNA في بلازما الأم كالعمر الحملي وعدد الحمول السابقة او وزن الأم.(Song et al., 2015)

3-5 طرائق عزل ccffDNA:

حاليّاً يعتبر التّفاعل التّسلسلي للبلمرة PCR الطّريقة الأكثر شيوعاً للاستخدام في الكشف والتعرف على تسلسل ccffDNA الجنيني محدد. وقد تم اختبار العديد من اشكال ال PCR الكمي بالزمن الحقيقي RT-PCR الأكثر استخداماً لانه يجمع ما بين الحساسيّة العالية، ونظام الكشف المغلق الذي يخفّض نسبة حدوث التلوث إلى أدنى حد، ويمكّن من الوصول إلى دقّة قياسٍ أعلى عن طريق تطبيق الdigital PCR (dPCR) تقنية PCR الرقمي وهناك تقنية حساسة أخرى تم تطبيقها مؤخراً في الكشف عن ال ccffDNA الجنيني وهي تقنية المطيافية الكتلية mass spectrometry، والتي يتمّ فيها قياس دقيق لكتلة كل شدفة DNA بهدف تحديد التسلسل المُورثي والكشف عن ألائل نوعية للجنين تختلف عن تسلسلات الأم ولو بنكليوتيد واحد فقط.(Vlková et al., 2010)، next-generation sequencing (NGS) والذي يتيح تحديد عدد جزيئات الDNA القالب الأصليّة بدقة،(Breveglieri, 2019)

وكما هو الحال في جميع الاختبارات، يمكن تحسين دقة وموثوقية الكشف بشكل ملحوظ عن طريق زيادة النّسبة ما بين الإشارة / الخلفية signal to noise، وهناك طريقتان تهدفان بالخصوص إلى زيادة نسبة الـ DNA ضمن العينة هما:

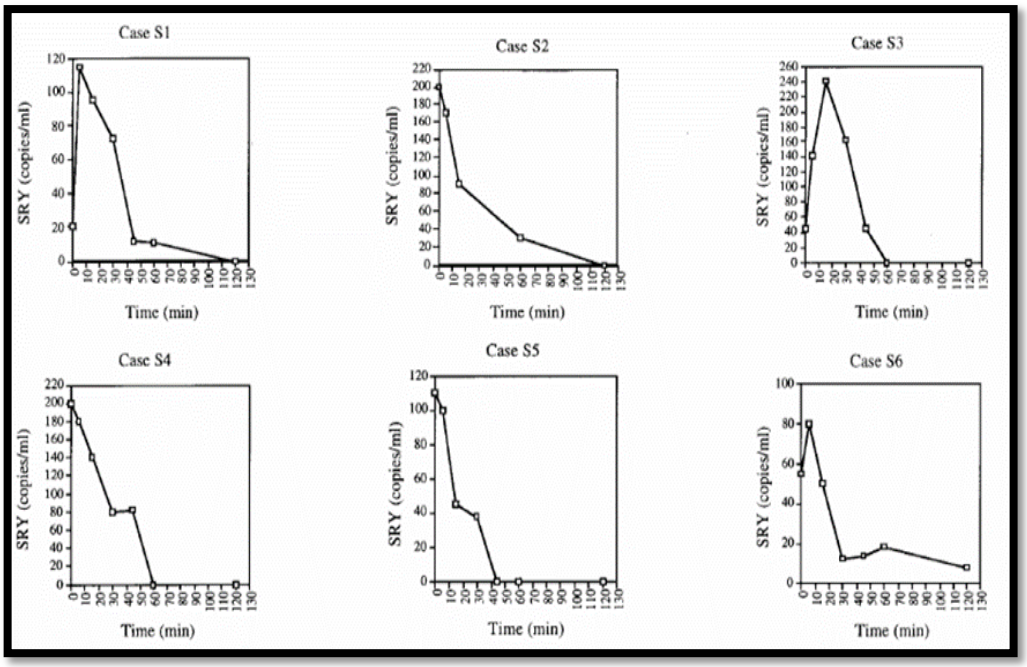
1- الاغتناء الاصطفائي لDNA الجنين وذلك بالاعتماد على فرق متوسط طول شدف DNA الجنين والأم، والذي يمكن أن يستغل لزيادة الكمية النسبية للccffDNA الجنيني بشكل عام تكون شدف ال DNA المشتقة من الجنين أصغر من تلك المشتقة من الأم حيث يكون طول معظمها أصغر من 313 زوج نكليوتيدي لذا وباستخدام طرائق تجزئة معيارية للطول من اجل اصطفاء شدف DNA اصغر من 300 زوج نكليوتيدي حصرا يمكن اغناء ال ccffDNA الجنيني بحيث يشكل حوالي 70% من الـ ccfDNA الكلي وذلك قبل الكشف وتحديد الهويّة إما باستخدام الـ PCR أو المطيافيّة الكتليّة. (Chan, K. C. et al., 2004)

2- التّخفيف من كمية DNA الأم عن طريق إضافة الفورمالدهيد للعينة الدموية، وهي مادة كيميائيّة يعتقد انها تدعم استقرار الخلايا السليمة، وهو ما يثبّط المزيد من إطلاق DNA الأم إلى العينة ويزيد من نسبة ال DNA الجنيني.(Dhallan et al., 2004)

3-6 تصفية ccffDNA من الدّوران الوالدي:

يعدّ ccffDNA قصير الأجل مقارنة مع خلايا الجنين السّليمة في دم الأمّ، فقد أجرى Yu et al دراسة عالية الدقة باستخدام تقنية MPS وأظهر أن تصفية ccffDNA تتم بمرحلتين، بحرائكية مختلفة (Yu, 2013) حيث يساوي العمر النَّصفي T1/2 في الطور السريع الأولي = 16.3دقيقة (4-30 دقيقة) (Lo, Y. M. et al., 1999) في حين يبلغ العمر النصفي في المرحلة البطيئة اللاحقة حوالي 13 ساعة. فقد حدث الاختفاء النهائي لـ ccffDNA في حالات الحمل الطبيعية بعد يوم إلى يومين من الولادة(Yu, 2013).حيث تتمَّ عملية التَصفية Clearance من الدَّوران الوالدي بصورة أساسيَّة بواسطة الكليتين، حيث تم عزل ccffDNA من بول نساء حوامل بأجنّة ذكور. **<u>الشكل 23</u>**

إنَّ نصف العمر القصير المرتبط بالكشف المستمر عن ccffDNA طوال فترة الحمل، يجعل من هذا السّبيل طريقة مناسبة للتَّشخيص ما قبل الولادة، فهو خاص بالحمل الحالي، ولا يمثّل أي من الحمول السّابقة. وبذلك فانها توفر قيماً معيارية للدراسات المقارنة التي تنطوي على الحالات المرضية المرتبطة بالحمل مثل المخاض المبكر، وحالات ما قبل الارتعاج.



الشكل (23): المتابعة المتسلسة للتسلسل النكليوتيدي لمورثة SRY المشتق من الجنين في بلازما النّساء بعد الولادة القيصرية

يتم تعيين الوقت بعد الولادة (دقيقة) على المحور X ، ويتم رسم مستوى SRY البلازمي (عدد النسخ / مل) على المحور Y. يشير الوقت" 0" إلى عينة ما قبل الولادة.) (Lo, Y. M. et al., 1999)

3-7 التّطبيقات السّريريّة ccffDNA في مجال التّشخيص ما قبل الولادة:

أحدث وجود ccffDNA ثورةً في مجال التَّشخيص ما قبل الولادة غير الباضع NIPD Non Invasive Prenatal Diagnosis، بدلاً من الطرائق التَّقليدية التي قد تحمل خطر فقد الجنين، السّبب الذي يمكن أن يمنع بعض الأزواج من إجرائه .(Vlková et al., 2010)

يهدف التّشخيص غير الجراحي قبل الولادة NIPT Non-Invasive Prenatal Testing إلى تأكيد وجود أو عدم وجود منطقة مورثية معينة لدى الجنين، وتعد تشخيصية في مجال تحديد الجنس وتحديد RHD الجنيني،بينما يعد اختبارا مسحيا بالنسبة لاختلال الصّيغة الصّبغية ومن هنا جاء المصطلح NIPD (Mackie et al., 2017)

وبمجرد عزل شدف الcfDNA ، يتم استغلال فروق طفيفة ما بين تسلسلات ال DNA الجنيني وDNA الأم من اجل القيام بتشخيص مورثي معين، وقد ركزت معظم الدراسات إلى الآن على الكشف عن تسلسلات ال

DNA الموروثة من الأب، وغير الموجودة قطعاً في النمط الوراثي للام مثل التسلسلات الموجودة على الصبغي الجنسي Y لدى الأجنّة الذكور حيث يعد هذا الهدف جذاباً لانه يشكل كمية معتبرة من الـــDNA غير الموجود لدى النساء، ويمكن أيضاً الكشف عن ألائل أبوية موجودة على صبغيات جسميّة، في حال كان من المعروف أنَّ هذه الألائل غير موجودة في جينوم الأم، غير أنَّ ذلك يتطلب معرفة تفصيلية لتسلسلات النمط الوراثي الأبوي ذي العلاقة، فضلاً عن طرائق كشف قادرة على تمييز تسلسلات DNA قد لا تختلف عن بعضها البعض إلا بنكليوتيد واحد فقط، ومن المهم أنّ نذكر أن جميع هذه الطرائق تعتمد على أن يرث الجنين تسلسلاً فريداً من الأب والذي يمكن أن يفيد في إجراء تشخيص محدد.

يوجد العديد من التَّطبيقات السَّريرية المختلفة لتحليل ccffDNA والتي تعتمد على الاختلافات بين جينومي الأم والجنين منها وهي ضمن 3 اقسام أساسية:

(1) حالات الحمل المعرضة لخطر الإصابة بالأمراض المرتبطة بالجنس خاصة عند وجود تاريخ عائلي معروف لمرض وراثي، من خلال تحديد جنس الجنين باستخدام مشرعات لتضخيم مورثات على الصبغي الجنسي y.(Isakhani, 2016)

(2) الممارسة السَّريرية للتَّشخيص قبل الولادة لبعض الزّيوغ الصبغية الجنينية، متلازمة داون T21 على وجه الخصوص.(Gray, 2018)

(3) معالجة وتدبير الحالات الحملية المعرضة لخطر حدوث مضاعفاتٍ محددةٍ مثل الأمهات سلبيات RhD لتحديد الأجنّة المعرضة لخطر الإصابة بـــ HDFN عن طريق التنبؤ بالنمط المورثي الجنيني RHD في بلازما الأم. (Clausen, F. B., 2018)

3-7-1 تحديد الجنس:

يعدّ تحديد جنس الجنين أول استخدام سريري لـ ccffDNA حيث يعتمد على الكشف عن تسلسلات نكليوتيدية خاصة مثل *SRY* أو *DYS14* الموجودة على الصّبغي Y في عينات ccffDNA المعزول من بلازما

الأم(Everett, 2015). وقد أصبحت هذه التّقنية مدرجة بالفعل في نظام الرّعاية الصّحية في العديد من البلدان الأوروبية، بما في ذلك المملكة المتحدة، بهدف تدبير حالات الحمل المعرضة لخطر الإصابة بأحد الاضطرابات الوراثية المرتبطة بالصّبغي X x- linked inheritance مثل حثل دوشن العضلي Duchenne Muscular Dystrophy، أو النّاعور Heamophilia(Chitty, 2012)، حيث يمكن لتحديد الجنس بصورة غير باضعة، أن يقلّل من عدد الإجراءات التشخيصيّة الباضعة في مثل هذه الحالات بنسبة تصل إلى 50 ٪ عندما تقدّم للأجنّة الذّكور فقط، كذلك في حالات الحمل المعرضة للإصابة بالاضطرابات الغديّة endocrine disorder مثل داء فرط تنسّج الغدة الكظريّة الخلقي CAH (congenital adrenal hyperplasia)، إذ يبدأ العلاج بالكورتيكوستيروئيدات قبل 8 أسابيع من الحمل لتخفّف من حدوث التّرجّل verilization في الأجنّة الأنثوية المصابة، لكن من الممكن حالياً أن يتأخرَ إعطاء السّتيروئيدات حتّى يتم تحديدُ جنس الجنين من خلال اختبار ccffDNA المبكر حيث يتمّ تقديمه فقط في الحمل بجنين أنثى.(Tardy-Guidollet et al., 2014)

كذلك يفيد تحديد جنس الجنين باستخدام ccffDNA من الدّم المحيطي للأمّ في تشخيص التباس الأعضاء التّناسليّة Ambiguity، عندما يكون تطوّر الأعضاء الجنسيّة الخارجيّة مبهماً، فقد تشير بعض هذه التّشوهات إلى شذوذ صبغي يتطلب وسائل التّشخيص التّقليديّة قبل الولادة مثل إجراء التنميط النّووي karyotyping، ولكن هناك مجموعة من الاضطرابات الأخرى، مثل المَبال الفوقاني Epispadias، أو إكشاف المثانة المذرقيّ Bladder Cloacal Exstrophy، التي تترافق مع تشوهات الأعضاء التّناسلية، في هذه الحالات، يوّفر تحديد جنس الجنين من دم الأم معلومات تؤثر في الإنذار، مما يمكِّن من التّخطيط للتّدبير الجراحي بعد الولادة.(Yatsenko et al., 2017)

وقد كان للدَّراســـة الرَّائدة pilot التي أجراها Honda et al الدَّور الأكبر في تمهيد الطَّريق لإمكانية تطبيقccffDNA في تشخيص الأمراض المرتبطة بالجنس الذكري باستخدام PCR التقليدية، فقد كانت حساسية الكشـف عن مرمزات خاصــة بالصــبغي Y بدءاً من الأسـبوع السـابع الحملي 100٪، (Honda et al., 2002) بينما استخدم Sekizawa et al, PCR الكمي و حققَ نفس الحساسية من الأسبوع (Honda H et al., 2011)

الخامس من الحمل عندما تم تقييم جنس الجنين في 302 حالة حمل بين الأســـبوعين 7 و16، وقد حدد الجنس بشكل صحيح في 97.2% من أجنّة الذّكور و100٪ من الأجنّة الأنثويّة.(Sekizawa, A et al., 2007)

اعتمدت معظم الدراسات التي عملت على تحديد الجنس باستخدام الccffDNA في الدم المحيطي للأم بواسطة تقنية PCR، على الكشف عن مورثات تقع على الصبغي Y لدى الأجنّة الذكور، مثل منطقة SRY sex determining region Y p11.3 المسؤولة عن تطور الصفات الجنسية الذكرية، إضافةً إلى أنّه تمّ اختبارُ العديد من تسلسلاتٍ أخرى نوعيةٍ واقعةٍ على الصبغي Y، و موجودة بنسخ مكررة في كل جينوم ذكري، و خصوصاً المواقع *DYS14* (Oleiwi, A., 2010)، zinc finger protein Y encoded (ZFY)، *AMELY* amelogenin- like gene on Y، DAZ (Stanghellini, 2006)، بينما يوجد نسخة واحدة من SRY التي اعتمد عليها Lo et al ، وقد أظهرت كفاءتها جميعها في الكشف عن ccffDNA في الدم المحيطي للأم.

ان استخدام ccffDNA لتحديد الجنس هو أكثر دقة من التصوير بفائق الصوت التي تستخدم غالباً لتحديد جنس الجنين بعد الأسبوع الحملي الثّالث عشر، كما أنّه يحمل خطورة أقلّ من بزل السّائل السّلوي. (Colmant, 2013)

إنَّ الحصول على نتائج سلبية كاذبة أمر وارد، حيث لا يتم الكشف عن الأجنّة الأنثى بشكل مباشر بل يتم الاستدلال عنها من النّتيجة السّلبية الكاذبة للكشف عن الصبغي Y، وهو ما ينتج أيضاً بسبب المستويات المنخفضة من الـ ccffDNA الجنيني الغير قابلة للكشف خاصّة في أسابيع الحمل الأولى، وقد حاولت العديد من الدراسات التغلب على هذه الصعوبة وذلك بقياس فرط المَثْيَلة لمنطقة المعزاز promoter من الجين *RASSF1* في DNA الجنيني، او باستخدام مناطق متنوعة من ال DNA المتكرر (المكررات الترادفية القصيرة Short Tandem Repeats STR) في الكشف عن تسلسلات موروثة عن الاب، وذلك بمقارنة عدد التَّكررات الموجودة ccffDNA بالتَّسلسلات الموافقة لدى الأم والأب.(Doescher, 2015)

كما تعود بعض الحالات الإيجابية الكاذبة لوجود توأم ذكر متلاش، قد تشكل هذه الظاهرة حوالي 0.3–0.7% من مجمل الحالات الإيجابية الكاذبة، وقد اقترح إجراء المسح بالتصوير بفائق الصوت بصورة متوافقة مع إجراء ccffDNA لنفي وجود التوأم الاخر أو حدوث الإجهاض التلقائي وذلك للتقليل من الإيجابيات الكاذبة.(Thurik et al., 2015)

3–7–2 تحديد زمرة دمRHD الجنين قبل الولادة باستخدام ccffDNA في سياق متابعة الدّاء الانحلالي لدى الجنين والوليد **HDFN**

يعدّ التّطبيق السريري الثاني الأكثر شيوعاً لاختبار ccffDNA ويستهدف تحديد زمرة دم الجنين RHD في الأمهات سلبيات الـ RHD، حيث يعد هذا ممكناً لأن الأم سلبية لـ RHD لا تحمل أي نسخ من جين RHD، وبالتالي فإن RHD المحدد في دم الأم ينشأ من الجنين الذي ورث هذا الأليل من الأب.

لقد أصبح التنميط المورثي RHD الجنيني في النساء الحوامل سلبيات RHD المحسسات ممكنًا باستخدام تفاعل البوليميراز السلسلي (PCR) في منتصف التّسعينات حيث تمّت أولى المحاولات لتنميط Rh باستخدام السّائل السلوي واعتيان الزّغابات المشيمائية، وذلك وفق توصيات المختبر المرجعي الدّولي لزمر الدم IBGRL International Blood Group Reference Laboratory لكن ارتفاع نسبة الخطورة أثناء الحصول على العينة الجنينية حيث تصل نسبة حدوث النّزف عبر المشيمة transplancental إلى 40 %، بينما تبلغ نسبة فقدان الجنين 1–2% ، جعل من الضروري الحصول على مصدر أفضل للحمض النووي الجنيني،(Van den Veyver, 1996) إلى ان قام Lo et al باستخدام PCR لتحديد RHD الجنيني من الدم الوالدي لأم سلبية RHD من دون أي محاولة سابقة لفصل الخلايا الجنينية. وباستخدام نسخة معدلة أطول قليلا من مشرعات خاصة بالإكسون 10 الأصلي في التفاعل نصف البنّاء، استطاع تحديد الزّمرة الدّمويّة الإيجابية RHD في حالات الحمل، لكن وجد ان معدل السلبية الكاذبة كان غير مقبول، والذي يعزى إلى التركيز المنخفض لـ ccffDNA في بلازما بعض الأمهات ومع مرور الوقت، تحسن هذا عن طريق إجراءات صارمة لمكافحة التلوث، واستخدام تحليل PCR الفلوري بالوقت الحقيقي. (Finning, K. et al., 2009; Finning, KM et al., 2002)

تقدم العديد من الدول الأوروبية حاليًا الوقاية الرّوتينيّة ما قبل الولادة RAAPD في الأسبوع الحملي الـ28 لجميع الأمهات سلبيات الRHD ، الأمر الذي كان له تأثير إيجابي في التقليل من حدوث حالات تمنيع جديدة، ومع ذلك، فإن هذه السياسة تقود إلى تقديم جرعة غير ضرورية من anti-D Ig لحوالي 38٪ من النّساء السّلبيات بـ RHD اللاتي يحملن جنينًا سلبي الـ RHD (De Haas, Masja et al., 2016). هذا ما جعل التنميط المورثي RHD للأجنّة اختباراً روتينياً تُقدّم بناءً على نتائجه الوقاية الرّوتينيّة بين 26–28 أسبوعاً للنساء السلبيات لـ RHD اللاتي يحملن أجنّة إيجابية ال RHD فقط، كما في 2011 في هولندا والدنمارك وفرنسا والسويد.(Clausen, F. et al., 2012; Clausen, Frederik Banch, 2020)

كذلك يفيد تحديد النمط المورثي RHD للجنين في تحديد الأجنّة ذات الخطورة العالية للإصابة ب HDFN، ففي حالة الجنين ايجابي RHD لدى الأم سلبية ال RHD المحسسة، والأب متغاير الألائل بالنسبة للمستضد D، لان الجنين قد يكون إيجابي RHD بنسبة 50%، وبالتالي هو معرض لخطر انحلال الدم داخل الرحم .

يجب تطبيق برنامج المتابعة لكشف فقر الدم، والتّدخل باكراً بإجراء التّدبير المناسب، بهدف التّقليل من نسب المراضة والوفيات إما بنقل الدم داخل الرحم، أو حتى إنضاج الرئتين لتتم بعدها الولادة المحرضة، لكن معرفة أن الجنين ايجابي RHD لدى الام غير المحسسة مسبقاً تشير إلى أن الطفل في خطر لحدوث التّمنيع الجنيني الوالدي وهذا يقتضي متابعة الحمل، وإعطاء الوقاية الرّوتينيّة في الأسبوع 28 من الحمل، وكذلك بعد أي إجراء باضع أثناء الحمل مع الوقاية الموجهة خلال 72 ساعة من الولادة، وبهذا تقتصر الوقاية الموجهة على الحوامل السّلبيّات RHD غير المحسسات بجنين ايجابيRHD،كما يفيد في تجنب العلاج الوقائي غير الضروري قبل الولادة في 99.7%–97.3% من النَّساء اللّواتي يحملن جنيناً سلبياً من فئة RHD .(Haimila et al., 2017) ممّا يقلّل من الاستخدام المفرط غير المبرّر للغلوبولين anti-D IgG ، كونه مستحضر دموي فهو يحمل خطورة الإصابة بالفيروساتHIV-HCV، او البريون (داء كروتزفيلد جاكوب) وقد سجلت عدة حالات في الفترة الواقعة بين 1977 – 1990 من تلوث الغلوبين المناعي anti-D في بعض البلدان مثل المانيا وايرلندا بفيروس التهاب الكبد HCV . (Avent, N. D., 2008)

قد يكون ادخال الاختبار الروتيني قبل 28 أسبوعا من الحمل مفيدا حيث يتم اعطاءRAAPD من 12أسبوعاً بعد أي حدث قد يؤدي لحدوث التمنيع (Drury, 2016) دقيقًا للغاية إذا تم إجراؤه في وقت مبكر من الحمل مع حساسية تحديد إيجابية RHD في أسابيع مختلفة من الحمل بنسبة 96.9٪ (أقل من 11 أسبوعًا)، 99.8٪ (11–13 أسبوعًا)، 99.7٪ (14–17 أسبوعًا)، 99.8٪ (18–23 أسبوعًا)، و100٪ (23 أسبوعًا<).مما يتيح إمكانية اجرائه في وقت مبكر من الحمل .

كما يتحايل NIPT على الحاجة إلى تقييم النمط الظاهري للأب، والذي قد لا يكون معروفًا أو متاحًا. فإذا كان الجنين ايجابي RHD، فإن متابعة كثيفة لمراقبة تطور فقر الدم أو موه الجنين هو أمر ضروري، بينما إذا كان من المتوقع أن يكون الجنين سلبيًا لـ RHD، فلا يوجد خطر الإصابة بالمرض الانحلالي عند الوليد (HDN) وتبقى الرعاية القياسية السابقة للولادة مناسبة(Scheffer, 2011). وقد أدى هذا المنهج إلى تجنب الإجراءات الباضعة في تدبير حالات الحمل عالية الخطورة لحدوث التمنيع، بالإضافة إلى تجنب المخاطر المرتبطة بالإجهاض.

الباب الثاني

الدّراسة العمليّة

الفصل الأول: أساس البحث

1-أهمية وخلفية البحث

يعد الدّاء الانحلالي للأجنّة والولدان HDFN الناتج عن التمنيع الخيفي بنظام RHD من أهم أســـباب المراضة والوفيات حول الولادة في الشرق الأوسط.

تتجلى أهميّة هذه الدراسة بجعل التنميط المورثي ل RHD الجنيني لدى الأمهات سلبيات RhD، بطريقة غير باضعة Non-Invasive Prenatal Diagnosis (NIPD) جزءاً هاماً من متابعة اولئك الأمهات، مما يحسَن تدبير الحمول المحسسة، ويجعل تطبيق anti-D IgG في الوقاية الرّوتينيّة أكثر فاعلية وجدوى عندما يعطى للأم سلبية الـــRHD غير المحسسة الحامل بطفل إيجابي RHD، كما أنّه يتيح للطاقم الطبي مراقبة أفضل لحادثة التّمنيع الجنيني، ومنع اختلاطاته الخطيرة مثل: HDFN، والاملاصات stillbirth.

2-الهدف من البحث

- استخلاص ccffDNA من الدم المحيطي للام الحامل.
- تحديد النمط المورثي RHD الجنيني بواسطة CcffDNA
- مقارنة نتائج تنميط RHD الجنيني باستخدام ccffDNA مع النمط الظاهري RHD وذلك بعد الولادة.
- تحديد دقة وحساسية ونوعية تقنية الكشف عن التنميط المورثي الجنيني RHDعن طريق ccffDNA بالمقارنة مع النمط الظاهري بعد الولادة.
- ربط نتائج التنميط المورثي مع الحالة المناعية للام ونتائج MCA-PSV

الفصل الثاني: مواد البحث وطرائقه

1- تصميم الدراسة

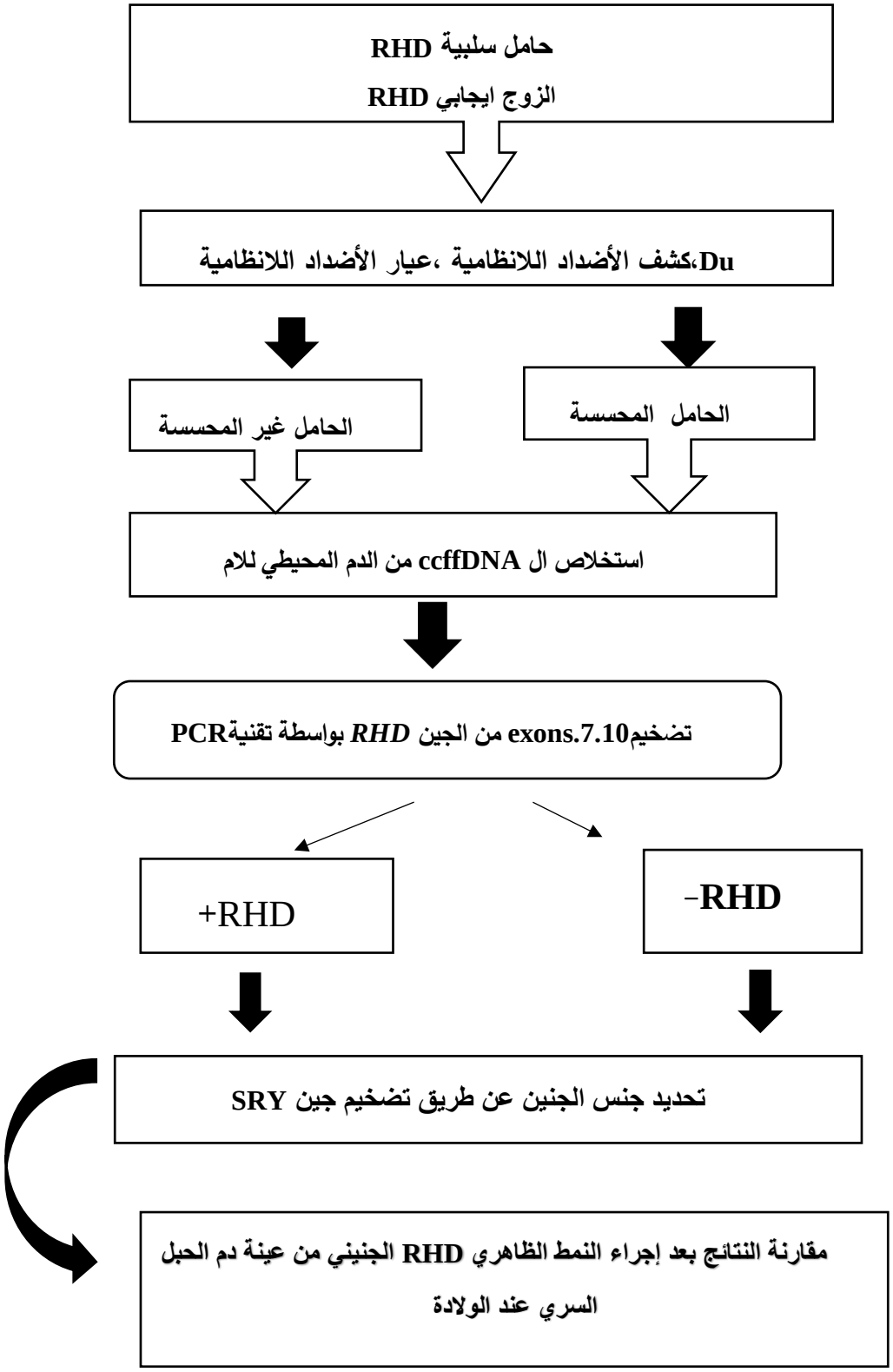
هذا البحث هو دراسة حشدية استباقية prospective cohort، حيث شملت النَّساء الحوامل سلبيات الـ RHD اللواتي راجعْن عيادة متابعة الحوامل في مستشفى التوليد وأمراض النساء الجامعي، بدمشق. لتحديد النمط المورثي الجنيني للزمرة الدموية RHD لدى أمهات حوامل سلبيات RHD متزوجات من رجال ايجابيي الـ RHD، وذلك بطريقة غير باضعة، بالاعتماد على المادة الوراثية الخاصة بالجنين ccffDNA المستخلصة من الدم المحيطي للأم عبر استخدام تقنية تفاعل البوليميراز السلسلي التقليدي conventional PCR.

2- مكان وزمان الدراسة:

أجريت هذه الدراسة على مرحلتين فقد تم جمع العينات، وإجراء التحاليل الدموية المتعلقة بالزمرة الدموية واختبارات كشف الأضداد اللانظامية للنّساء الحوامل في مستشفى التّوليد الجامعي بدمشق.

بينما تم العمل المخبري المتعلق باستخلاص المادة الوراثية وإجراء تفاعل البوليميراز التسلسلي pcr في مخبر زرع الخلايا الجذعية الدموية Hematopoietic Stem Cell Transplantation Lab (H.S.C.T) LAB في مستشفى الأطفال _جامعة دمشق وذلك في الفترة الممتدة بين 2018/10-2019/10

تصميم الدراسة



3-عينة الدراسة:

شملت الدراسة مجموعة من النساء الحوامل سلبيات الـــRHD (أزواج ايجابيي RHD) (العدد الإجمالي 60 سيدة) المراجعات لعيادة الحوامل في مستشفى التوليد الجامعي في الفترة بين 2018/10-2019/10، واللاتي يتراوح عمر الحمل لديهن من (7 -38) أســـبوع حملي؛ حيث تم تحديد عمر الحمل بالاعتماد على موعد آخر دورة طمثية LMP بالإضافة إلى الموجودات الصّدوية.

تم إجراء جميعِ الاختباراتِ المخبرية بشكل معشى blind، أي أنَّ التنميط الموروثي لـــ RHD الجنيني وكذلك تحديد الجنس، قد تمّ إجراؤهما دون معرفة جنس الجنين وزمرته RHD، والتي تم تأكيدها بالطرائق المصـــليّة بعد الولادة.

3-1 معايير الاشتمال في الدراسة: Inclusion Criteria

- سيدة حامل سلبية RHD، العمر الحملي يزيد عن 5 أسابيع حملية ولا يتجاوز 38اسبوعا
- الزمرة الدموية للزوج: ايجابي RHD
- حمول مفردة

3-2 معايير الاستبعاد من الدراسة:Exclusion Criteria

- تم استبعاد الحمول التوأمية
- الحوامل التي تعاني من حالة ما قبل الارتعاج
- الحوامل اللاتي يعانين من أمراض مناعية ذاتية

4- حجم العينة:

لقد تمّ حساب حجم العينة باستخدام معادلة ستيفن ثامبسون Steven K. Thompso

$n = Nxp(1-P) / \{N-1x(D^2/Z^2) + P(1-P)\}$ حيث تعبر N عن حجم المجتمع ،Z هي الدرجة المعيارية المقابلة لمستوى الدلالة 0.95 وتساوي 1.96 ، بينما تمثل d نسبة الخطأ وتساوي 0.05، بينما p نسبة توفر الخاصية والمحايدة = 0.50.

تم تحديد حجم العينة من الحوامل سلبيات ال RhD ممن يراجعن عيادة الحوامل في مستشفى التوليد الجامعي بدمشق بالاعتماد على دراسة أجريت عام 2008 والتي بيَّنت أن نسبة النمط RhD السلبي في سورية 10%،(Ali.T, 2008) لكن وبسبب غياب إحصائيات واضحة وحديثة عن النمط الظاهري سلبي RhD للسيدات المتزوجات من أزواج إيجابيي RhD، أو عن حالات التمنيع الخيفي بأضداد RHD في سورية، وبسبب تكلفة مواد البحث المرتفعة، فقد تم تحديد عدد 60 عينة .

5-طرائق جمع البيانات:

أُستخدمَ في جمعِ البياناتِ استبيانٌ شمل معلوماتٍ شخصيةً عن الاسمِ، العمرِ، عدد الحمول وترتيب الحمل الحالي، عدد الاسقاطات وسوابق تناول الوقاية الرّوتينيّة والموجهة، بالإضافة الى سوابق حدوث موه جنيني او تطور فقر دم جنيني في الحمول السابقة، وسير الحمل الحالي. وتمَّ جمعُ هذه المعلوماتِ بعدَ أخذِ الموافقةِ الخطية من المرضى على المشاركةِ في البحثِ. وتمَّ إرفاقُ البحثِ بصورةٍ عن الموافقةِ المستنيرةِ **(الملحق 1)** وصورةٍ عن الاستبيانِ ضمنَ الملاحقِ **(الملحق 2)**.

6- خطة العمل:

- ☒ تمّ جمع العينات من الأمهات الحوامل سلبيات RhD خلال مراجعتهن لعيادة الحوامل في مستشفى التّوليد الجامعي في أنبوب جاف لا يحوي مانع التّخثر لإجراء اختبار تحري الأضداد اللّانظامية، وأنبوب آخر يحوي مادة مانعة للتخثر EDTA، لإجراء الزمرة الدموية ABO، وRhD بالإضافة لإجراء Du.

- ☒ كما تم سحب عينة دموية في أنبوب آخر يحوي مادة مانعة للتخثر EDTA لاستخلاص DNA الجنيني الحر ccffDNA من الدم المحيطي الوالدي.
- ☒ تمت متابعة الحالات جميعها شهرياً بواسطة التصوير بفائق الصوت وذلك بيد أطباء التّوليد في شعبة العيادات (عيادة متابعة الحوامل)، حيث وجدت بعض العلامات التي توجه لتطور فقر الدم الجنيني والموه الجنيني تفاوتت بين موه السّلى، ضخامة الكبد أو الطحال الجنيني، وذمة فروة الرأس وانصباب الاجواف مثل الجنب والتامور، زيادة سماكة المشيمة (>6 سم).
- ☒ إجراء MCA-PSV بين الأسبوعين 18−35 للحمول التي تجاوزت بها الأضداد anti-D الحد الحرج 32. وقد تمّت المتابعة لهنّ مرّتين بفاصل أسبوعين لتقدير MCA-PSV، حتّى نهاية الحمل الحالي.
- ☒ استخلاص الـ ccffDNA من العينة الدموية باستخدام QIAamp DNA blood mini kit
- ☒ إجراء التنميط الورثي بواسطة تقنية PCR بتضخيم exon7 , exon 10 من جين *RHD* من DNA المستخلص من البلاسما الوالدية ،كما سيتم تضخيم منطقة *SRY* لتحديد الجنس للتأكد من وجود DNA الجنيني في العينة سلبية RHD.
- ☒ إجراءالزمرة الدموية ABO,RhD للمواليد من عينة دم الحبل السري .
- ☒ مقارنة نتائج التنميط الجيني RHD الجنيني مع التنميط الظاهري ل RhD من عينة دم المولود الحديث لحظة الولادة.

7- طرائق إجراء الاختبارات المخبرية :

7-1 طريقة العمل للكشف عن الاضداد

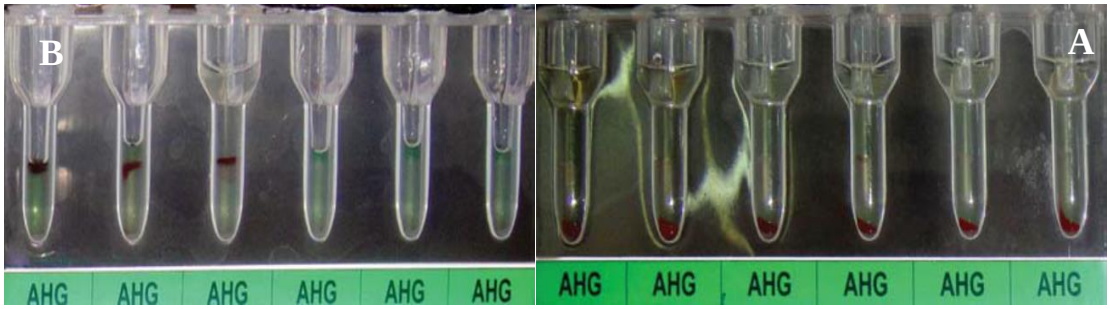
1. يسجل اسم المريضة ورقمها على الآبار المخصصة في بطاقة الهلام الحاوية على مضاد الغلوبولين البشري anti-IgG عديد النسيلة وأضداد anti C3 وحيد النسيلة ضمن الآبار.
2. نضع 50 ميكروليتر من كواشف الكريات الحمر (I,II,III) الجاهزة للاستخدام إلى الآبار المناسبة.
3. نضيف 25 ميكروليتر من مصل /بلازما المريض إلى جميع الآبار.

4. نحضن 15 دقيقة في حرارة 37 في الحاضنة المخصصة للبطاقات.

5. نثفل البطاقات مدة 10 دقائق في المثفلة الخاصة بالبطاقات.

7-2 طريقة تحديد عيار الأضداد اللانظامية Anti-D

- ✓ يسجل على 10 أنابيب جافة الأرقام من 1 الى 10(يجب أن يكون التمديد من 1\2 وحتى 1\1024).
- ✓ نضع في كل أنبوب 50 ميكرولتر من السيروم الملحي.
- ✓ نضع 50 ميكرولتر من مصل المريضة في الأنبوب الأول ونمزج جيدا ثم يؤخذ 50 ميكرولتر من الأنبوب الأول ويوضع في الأنبوب الثاني وبنفس الطريقة يتم أخذ 50 ميكرولتر من الأنبوب الثاني ليتم وضعه في الأنبوب الثالث وهكذا دواليك حتى نصل إلى آخر أنبوب وهو الأنبوب رقم 10.
- ✓ نأخذ بطاقتي تصالب ويسجل اسم المريضة على كل بطاقة ورقم الآبار كالتالي: البئر الأول 1\2 ، البئر الثاني 1\4 ، البئر الثالث 1\8 ، البئر الرابع 1\16 ، البئر الخامس 1\32 ،البئر السادس 1\64 ، البئر السابع 1\128 ، البئر الثامن 1\256، البئر التاسع 1\512 ، البئر العاشر 1\1024
- ✓ نضع 50 ميكرولتر من كل أنبوب في آبار البطاقة وفق تسلسل الترتيب نفسه ابتداءا من الأنبوب الأول للبئر الأول وهكذا حتى البئر 1\1024.
- ✓ نحضن بالدرجة 37 مئوية لمدة 15 دقيقة في حاضنة بطاقات الهلام.
- ✓ نثفل ضمن المثفلة الخاصة ببطاقات الهلام وتقرأ النتيجة ، يسجل تركيز آخر بئر ظهر فيه التراص.



الشكل (24): اختبار IAT – A نتيجة سلبية لاختبار IAT – B نتيجة إيجابية لاختبار IAT

7-3 عينة البلاسما

أُعدت البلاسما في هذه الدراسة كما يلي:

1. تم جمع 4-5 ml من الدم الوريدي بطريقة عقيمة مباشرة في أنبوب مخلَى من الهواء يحوي مانع تخثر هو EDTA. كما تم إعادة سحب عينات دموية جديدة وبشكل حذر عند الحصول على عينة منحلة.

2. تم تثفيل عينات الدم بسرعة 1600 X g لمدة 10 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في مثفلة (Eppendorf Germany،Mini Spin Plus Micro-Centrifuges)، وتمت إزالة البلازما بعناية من الأنابيب ونقلها إلى أنابيب ابندورف، ثم خضعت عينات البلازما لمرحلة التثفيل الثانية في 16.000 G لمدة 10 دقيقة (Germany،Eppendorf Mini Spin Plus Micro-Centrifuges)
3. ثم نقلت عينات البلازما المعاد تثفيلها إلى أنابيب ابندورف عقيمة DNase free 2 Ml.
4. تم تخزين العينات والاحتفاظ بالبلاسما بعد التثفيل بدرجة حرارة −20 °C حتى استخراج الحمض النووي ccffDNA.

7−4 استخلاصُ (DNA Extraction) كلٍ من gDNA، ccffDNA

7−4−1 استخلاص DNA الحر الجنيني من البلاسماccffDNA

تم اســتخلاص DNA الجنيني الجوال من عينات البلاســما المذكورة في الفقرة الســابقة، باســتخدام عتيدة QIAamp Dsp Virus Spin Kit جاهزة من شــركة (Germany،QIAGEN) ويظهر الجدول (4) محتويات العتيدة، حيث تم العمل وفقاً لتعليمات Protocol الشــركة لعزل DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol Cat. No: 51304)

جدول (4): محتوى العتيدة QIAamp DSP Virus Spin

QIAamp MinElute Columns	50
Lysis Buffer* وقاء الحل(AL)	ml 33
Wash Buffer 1* (concentrate)	ml 19
Wash Buffer AW2 (concentrate)	ml 13
Carrier RNA (red caps)	310 µg (1 ug /µl)
Protease Solvent†	4.4ml
Elution Buffer† (purple caps)	4X2 ml
Wash Tubes WT (2 ml)	50
Elution Tubes (1.5 ml) ET	50
LT Lysis tubes	50
Qiagen protease	1 vial

7-4-1-1 طريقة العمل:

1- يضاف 75 ul proteinase K لكل 500 ul بلازما في أنبوب ابندورف 2ml LT(DNase free)

2- يمزج جيداً بواسطة المازجة لمدة 15 ثا.

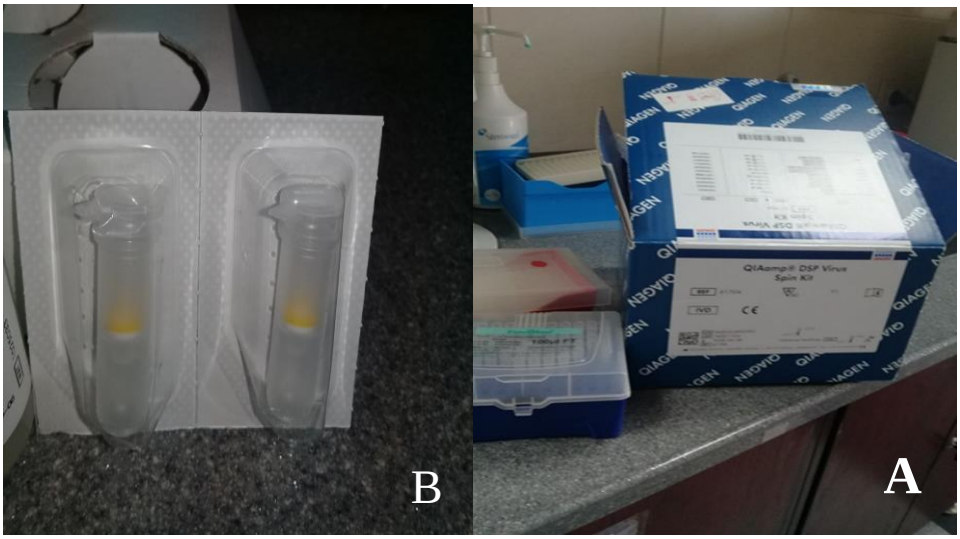
3- يضاف اليه 500 µL AL مضافاً له carrier RNA (5.6µg لكل عينة)، يغلق غطاء الأنبوب بحذر ثم يرج الأنبوب جيداً، ويوضع في الحاضنة الرجاجة بدرجة 56±1 °c لمدة 15 دقيقة.الموضح بالشكل (28)

4- يضاف 600ul ايناثول مطلق96-100% ويرّج الأنبوب vortexing جيداً لمدة15 ثا، ويترك مدة 10±1 دقائق بحرارة الغرفة 15-25 ومن ثم ينقل المزيج إلى عمود الفصل.

4-تم التثفيل بسرعة 12000لمدة دقيقة واحدة ورمي السّائل العابر.

***كررت هذه الخطوة إلى حين تمرير الحجم الكلي للعينة1(500ul).

5-. نقل عامود الفصل إلى أنبوب (receiver tupe) جديد وأضيف اليه 600 ul من محلول الغسيل Aw1، ومن ثم ثفل بسرعة 6000 xg لمدة دقيقة واحدة.



الشكل (25): A-العتيدة المستخدمة في استخلاص ccffDNA

B-أعمدة الاستخلاصQIAamp MinElute

6–ينقل عامود السيلكا مرة أخرى لأنبوب (receiver tube) جديد ، ويضاف اليه 750-µl من Aw2 ثم ثقل الأنبوب بسرعة 18000 Xg لمدة دقيقة بعد رمي السّائل الموجود في الأنبوب.

7– يضاف 750 µL من الايتانول المطلق (96–100%) ويثفل مرة أخرى بسرعة 18000xg لمدة 3دقائق للتخلص من آثار الكحول.

8-ينقل عمود الفصل إلى أنبوب (2mL DNase free) ثم يوضع في الحاضنة بدرجة 56C° ±1 لمدة 5 دقائق ويترك الغطاء مفتوحاً.

9–يضاف إلى العمود 20-60 µl من موقي الحل AVE (Elution Buffer)، يحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.

10–ثم يثفل الأنبوب بسرعة 18000xg لمدة دقيقة واحدة.

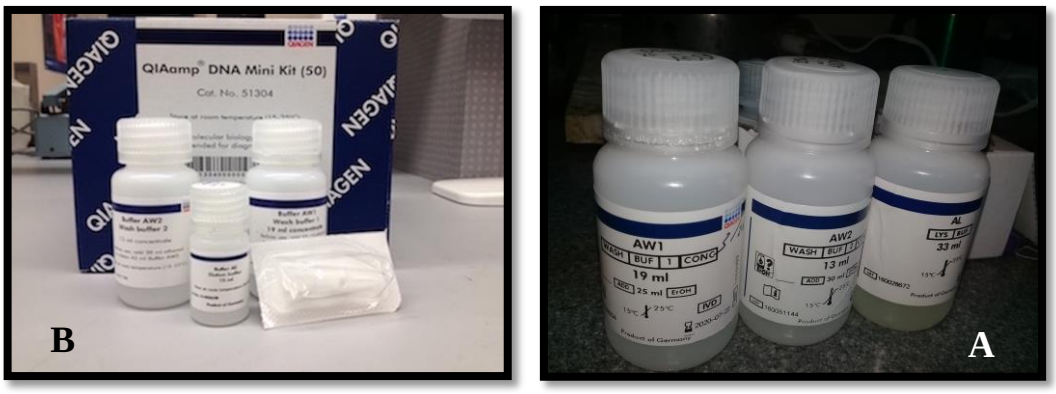
11–يكتب اسم العينة وتاريخ العزل ويحفظ الأنبوب بالمجمدة بدرجة c° 20–.

7–4–2 استخلاص DNA من الدم الكامل:

تم إجراء هذه المرحلة في مخبر زرع الخلايا الجذعية بمستشفى الأطفال الجامعي بدمشق، حيث تم استخلاص DNA الجينومي من عينات دم ذكرية، وأخرى أنثوية لسيدات غير حوامل، باستخدام عتيدة QIAamp DNA blood mini kits من شركة(QIAGEN, Germany) ، وفقاً لتعليمات الشركة Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol Cat. No: 51304) يبين الجدول (5) محتويات العتيدة المستخدمة.

جدول(5): محتويات العتيدة (QIAamp DNA blood mini No: 51304)

العدد	المادة	المحتوى
50	أعمدة الفصل	QIAampSpin Columns
50	انابيب جمع	Collection tubes (2 ml)
12	وقاء الحل (AL)	lysis buffer
19 ml	وقاء الغسيل Aw1	Buffer AW1* (concentrate)
13	وقاء الغسيل Aw2	Buffer AW2† (concentrate)
22	وقاء الشطف AE	Buffer elution
1.25		Proteinase K QIAGEN® Protease



الشكل(26): (B–A) يوضح محتويات العتيدة المستخدمة في عزل gDNA

7-4-2-1 مراحل عزل gDNA

1. تترك العينات في درجة حرارة الغرفة (15–25 درجة مئوية) بعد مزجها جيدا.
2. التأكد من أن مخزن الغسيل المؤقت 1 (AW1)، ومخزن الغسيل 2 (AW2)، والبروتياز QP قد أعدت وفقا لتعليمات الشركة المصنعة.الشكل 28
3. ترك الوقاء AE او الماء المقطر بدرجة حرارة الغرفة ليستعمل في مرحلة الشطف elution

4. ضبط المحم الجاف على 56 °C للاستخدام في الخطوة 9.

5. يجب ان تجرى كل مراحل التثفيل بدرجة حرارة الغرفة

6. يضاف 200µl من الدم الكامل إلى 200 µL من محلول AL في أنبوب 1.5 ml Eppendorf (DNase free)

7. يمزج محلول AL مع الدم بشكل جيد لمدة 15 ثانية

8. يضاف اليه 20 µL من انزيم proteinase K يغلق غطاء الأنبوب بحذر، ويمزج جيدا.

9. ثم يوضع في المحم الجاف بدرجة 56 C° لمدة10 دقائق.

10. يثفل الأنبوب تثفيلاً سريعاً لإزالة القطرات من الجدار الداخلي للغطاء

11. يضاف 200ul ايناثول مطلق (96-100%) للعينة، ويرَّج الأنبوب جيداً لمدة 15 ثانية ويثفل تثفيلاً قصيراً وسريعاً.

12. ينقل المزيج إلى عمود الفصل، ويثفل لمدة 1 دقيقة بسرعة 6000Xg، ثم يتم التخلص من السّائل المتدفق.

13. ينقل عمود الفصل إلى أنبوب (receiver tupe) جديد ويضاف اليه AW1 500 ul، ومن ثمَّ يثفل بسرعة 6000xg لمدة دقيقة واحدة.

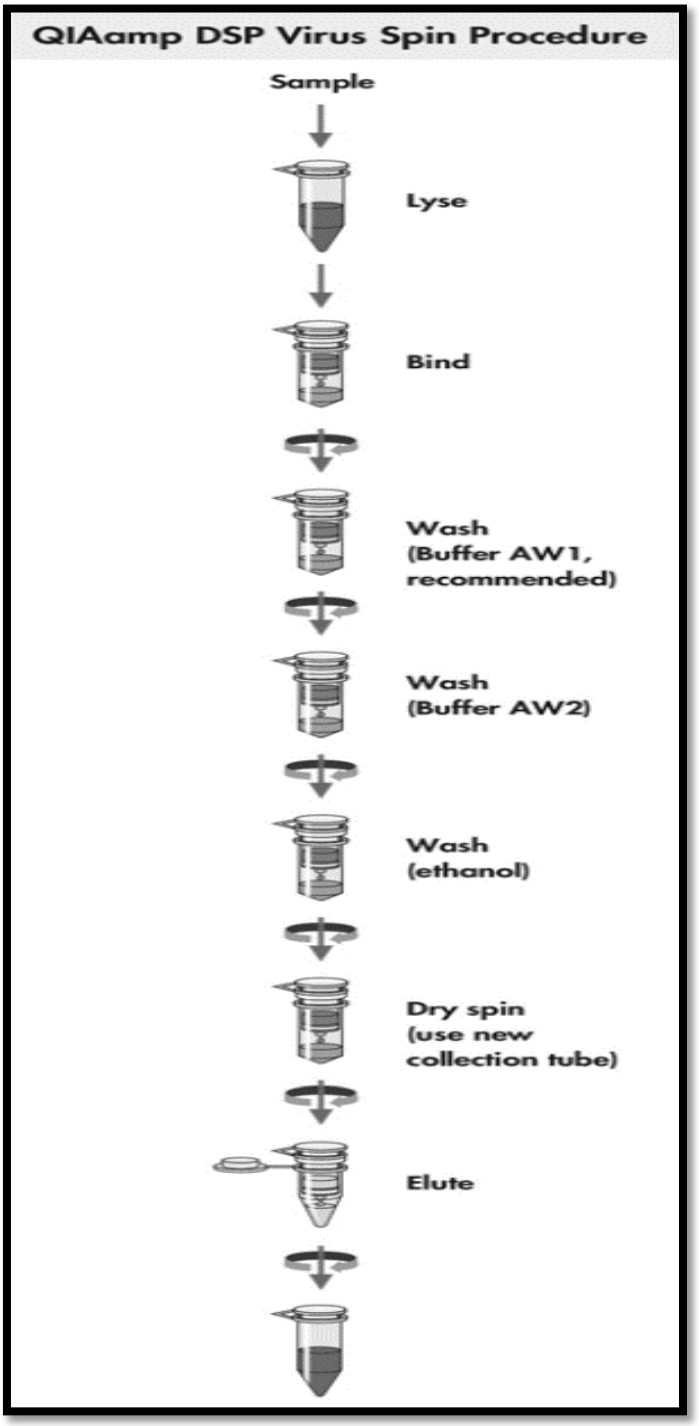
14. ينقل عمود السيلكا مرة أخرى لانبوب (receiver tube) جديد ويضاف اليه Aw2 500 µl، ويثفل الأنبوب بسرعة 14000 rpm (8000 X g) لمدة دقيقة بعدها يرمى السّائل الموجود في الأنبوب.

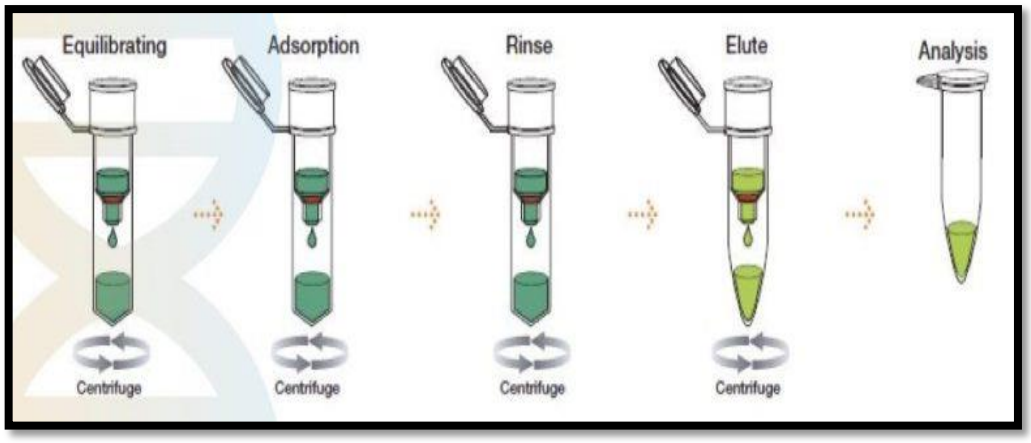
15. ينقل عمود الفصل إلى أنبوب 2mL (DNase free) جديد ويضاف µl100 من موقي الحل (elution buffer) اوالماء المقطر ويحضن لمدة 1دقيقة بدرجة حرارة الغرفة، ومن ثم ثفل الأنبوب بسرعة 6000 xg لمدة دقيقة واحدة.

16. تم قياس تركيز DNA الجينومي المستخلص من العينات الدموية باستخدام جهاز NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (الشكل 32)

17. بعدها كتب اسم العينة وتاريخ العزل وحفظ الأنبوب بالمجمدة بدرجة حرارة C° 20-.

الشكل (27): مراحل استخلاص cfDNA بواسطة العتيدة QIAamp DSP Virus Spin



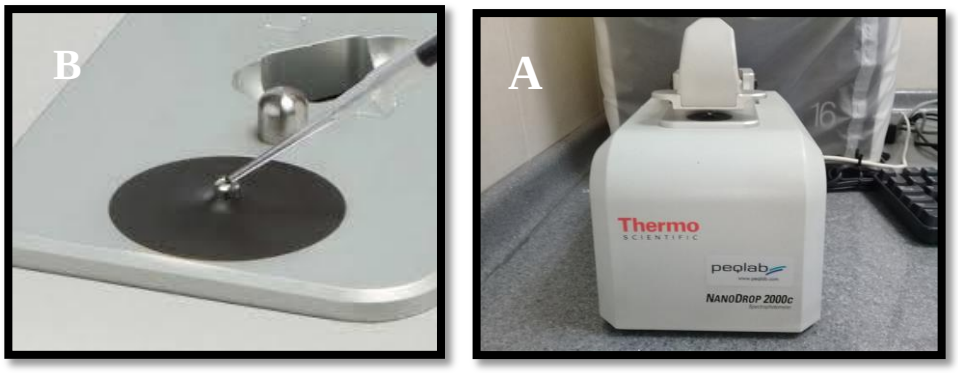


الشكل (28): شكل توضيحي يبين مراحل الاستخلاص اليدوي لـgDNA

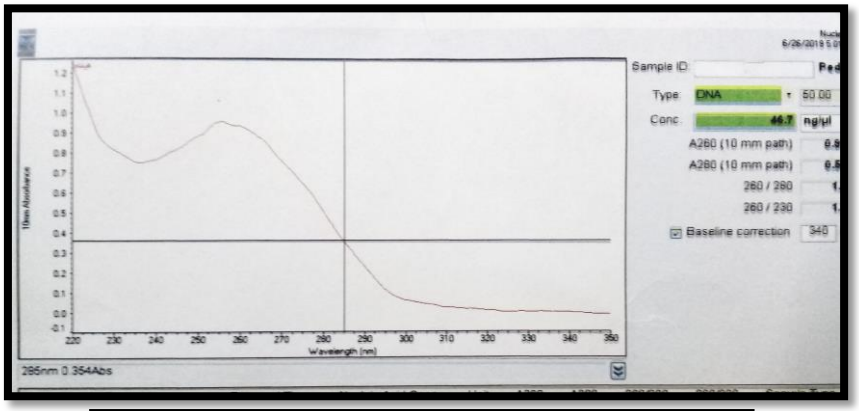
5-7 تحضير هلام الاغاروز 2% الخاص بترحيل نواتج عملية PCR:

- ✓ يحل 2 غ من هلام الاغاروز (Agarose، LE، Grade – USA Promega (Analytical في 100 مل من الوقاء 1X TBE (Promega – USA) لتحضير الهلام ذو التركيز 2%. الشكل 32
- ✓ يسخن المزيج حتى الذوبان التام لمسحوق الاغاروز في فرن الأمواج المكروية (جهاز الميكروويف)
- ✓ يضاف الايثيديوم بروماید (Promega – USA) للحصول على تركيز نهائي 0.5 ug/ml
- ✓ يترك المزيج ليبرد حتى تصل حرارته إلى درجة مئوية 60°.
- ✓ ويصب في حوض الترحيل المزود بالامشاط المناسبة.
- ✓ يترك المزيج ليتبلمر بدرجة حرارة الغرفة 10-20 دقيقة.

الشكل (29): A-هلام الاغاروز B-مادة الايثيديوم بروماید



الشكل (30): جهاز قياس تركيز DNA A–جهاز Nanodrope B – طريقة اضافة العينة لقياس تركيز DNA



الشكل (31): قياس تركيز gDNA

6-7 إجراء تفاعل البوليميراز السلسلي PCR لتضخيم الجين *RHD*

أجريت تفاعلات PCR في انابيب خاصة بجهاز pcr بحجم نهائي 25 ميكروليتر تم استخدام master mix ready to use (Go Taq Green Master Mix-Promega – USA) الذي حفظ مجمداً بدرجة حرارة – 20م © وتم الانتباه إلى إبقاء الانظيم في وعاء خاص مبرد يحافظ على درجة حرارة قدرها –20 م© لمدة من الزمن على طاولة العمل. حيث يظهر الجدول (6) المشرعات المستخدمة في تضخيم كل من الجين *RHD*، *RHCE*.

جدول(6): المشرعات المستخدمة فى تنميط الجين *RHD*، *RHCE*، (Bennett, 1993)

الجين المرمز	طول الشدفة	الرمز	التسلسل النكليوتيدي
Exon 7 ***RHD ,RHCcEe***	**bp135**	**A1**	**. 5' -TGT GTT GTA ACC GA GT-3'**
		A2	**5' -ACA TGC CAT TGC CG -3'**
Exon 10 **الجين*RHD***	**bp186**	**A3**	**5-TAA GCA AAA GCA TCCAA 3'**
		A4	**5-ATG GTG AGA TTC TCCT-3**

تعد المشرعات السابقة متتمة لتتابع نكليوتيدي متماثل في كل من الجين *RHD*، *RHCcEe*، بينما يعد A4 نوعياً للجين *RHD*، وقد تم التأكد من نوعية هذه المشرعات باستخدام برنامج primer- blast. **الملحق 3-4**

الملحق 4

أجريت تفاعلات PCR في أنابيب خاصة بجهاز PCR بحجم نهائي 25 ميكروليتر، وذلك تم استخدام(master mix ready to use (Go Taq Green Master Mix-Promega – USA الذي حفظ مجمداً بدرجة حرارة° C−20، وتم الانتباه إلى إبقاء الانظيم في وعاء خاص مبرد يحافظ على درجة حرارة قدرها °C−20 لمدة من الزمن على طاولة العمل. يضاف 12.5 ul من master mix X1، إلى كل من 0.2 من المشرعين (pmole/ul10) بينما يضاف ul10 من DNA المعزول ويتمم الحجم ل 25 ul بالماء المقطر.

وتم وضع أنابيب PCR في جهاز المدور الحراري (Applied Biosystems، Foster City، CA، USA) وأجري التفاعل وفقا للشروط التالية: التمسخ Denaturation عند درجة حرارة C 1 min°95 لمدة 10دقيقة، ثم 50 دورة، تتضمن التّحطم برفع درجة الحرارة إلى C°95 لمدة 15ثانية، ثم الارتباط Annealing عند الدّرجة 49 لمدة دقيقة واحدة، وثم مرحلة الإطالة Extension عند الدرجة C°72 مدة دقيقة واحدة. وحفظت العينات بعدها بحرارة+4 °C درجة مئوية.**<u>الشكل 34</u>**

7-7 إجراء تفاعل البوليميراز السلسلي PCR لتضخيم تسلسل SRY

تم استخدام جين SRY كدليل إضافي على وجود ccffDNA في عينة البلاسما وبخاصة في العينات سلبية RHD، حيث تم تحديد جنس الجنين باستخدام مشرعات نوعية(INNO train-Kornberg, Germany) ، وذلك لتضخيم جزء من الجين SRY لدى إجراء تفاعل البوليميراز السلسلي PCR.

أجريت تفاعلات PCR في أنابيب خاصّة بجهاز PCR بحجم نهائي 25 ميكروليتر ، وذلك تم استخدام master mix ready to use (Go Taq Green Master Mix-Promega – USA) الذي حفظ مجمداً بدرجة حرارة C°20-، وتم الانتباه إلى إبقاء الانظيم في وعاء خاص مبرد يحافظ على درجة حرارة قدرها C° 20- لمدة من الزمن على طاولة العمل.

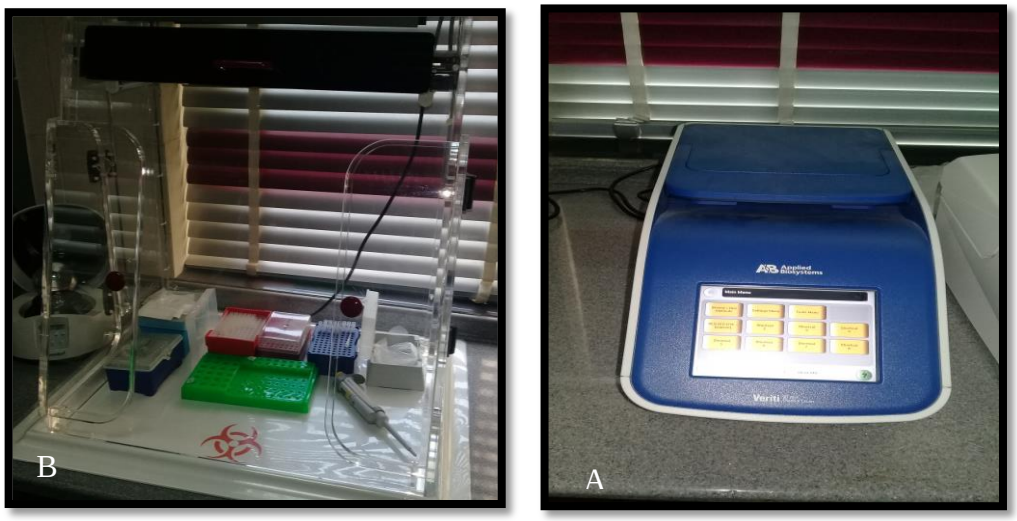
جدول (7): تسلسل المشرعات المستخدمة لتضخيم شدفة من جين *SRY* (Nelson, 2001)

الجين المرمز	طول الشدفة	التسلسل النكليوتيدي 3---5>	الرمز
SRY	137	3′-TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC-5′	SRY-F
		3-CC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T-5	SRY-R

اضيف 12.5 ul من 1X master mix، إلى كل من 0.3 من المشرعين (pmole/ul10) بينما تم إضافة 10 ul من DNA المعزول ومن ثمَّ تمم الحجم ل 25 ul بالماء المقطر .

تم وضـــع أنابيب PCR في جهاز المدوّر الحراري (Applied Biosystems، Foster City، CA، USA) وأجري التّفاعل وفقاً للشّـــروط التالية: التمســـخ عند درجة حرارة C°95 لمدة 15دقيقة، ثم 35 دورة، تتضـــمن

التحطم برفع درجة الحرارة إلى C°94 لمدة دقيقة واحدة، ثم الارتباط عند الدرجة C°57.1 لمدة دقيقة واحدة، وثم الإطالة عند الدرجة C°72 مدة دقيقة واحدة. وحفظت العينات بعدها بحرارة 4 درجة مئوية.



الشكل(32): A جهاز المدوارالحراري B خيمة لاضافةDNA

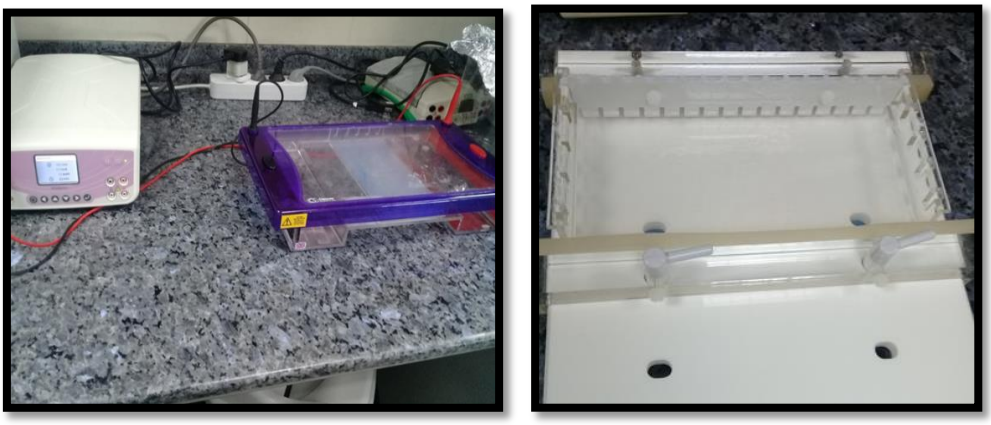
الشكل(33) وزن الهلام باستخدام ميزان حساس الشكل (34) إضافة مادة الايتيدوم بروماید إلى الهلام المسخن

7-8 الرحلان الكهربائي لنتاجات ال PCR

7-8-1 نتائج الرحلان الكهربائي لناتج تضخيم جين *SRY,RHCE,RHD*

تم فصل نواتج عملية التضخيم على جهاز الرَّحلان الكهربائي الأفقي من شركة Clever Scientific الشكل 38 باستخدام هلام الآغاروز 2 ٪ في محلول TBE 1X لمده 75 دقيقة، حيث تم تحميل 10l µ من

DNA في الآبار المخصصة ضمن الهلامة مع تحميل واسم أطوال معيارية (bp100 Ladder) (ذو التركيز 0.13 µg/µL Promega. USA)، ورحلَت بفولطية 150 V لمدة75 دقيقة.



الشكل (35) :A–حوض الترحيل B – جهاز ترحيل على الهلام مع وحدة التغذية Cleaver Scientific Limited

7–8 –2 تفسير نتائج الرحلان الكهربائي:

تحدد إيجابية تضخيم الجين SRY عند ظهور عصابات DNA المحدد 137 bp بعد تصويرها بالأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز توثيق الهلامة (Hero Lab Trans illuminator UVT-28M, Germany). بينما تُحدد إيجابية تضخيم الجين *RHD* عند ظهور عصابات DNA المحدد 186 bp -135 bp بعد تصويرها بالأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز توثيق الهلامة المذكور سابقاً. يوضح الجدول (8) تفسير النتائج المخبرية بعد إجراء الترحيل الكهربائي على الهلام.

الجدول (8) يوضح تفسير النتائج المخبرية

نتيجة التنميط المورثي	طول العصابة		
	bp137	bp 186	bp135
RHD– ذكر	+	–	+
RHD+ ذكر	+	+	+
RHD- انثى	-	-	+
RHD+ انثى	–	+	+

8- ضبط الجودة

لتجنب الإيجابية الكاذبة، فقد تم استخدام مرافق منفصلة في عزل وتضخيم وتحليل نواتج التضخيم. كما تم استخدام رؤوس الممصات المفلترة مع التبديل المتكرر للقفازات المستخدمة أثناء إجراء الترحيل، وتعريض كافة الأدوات المستخدمة للتعقيم ب الاشعة فوق البنفسجية UV.

بالإضافة إلى ذلك، تم جمع عينات دموية من 10إناث سلبية RHD، غير حوامل و3حوامل إيجابية RHD، بالإضافة إلى 2 ذكور اصحاء. واستخدم DNA المعزول منها كضوابط إيجابية وأخرى سلبية في جميع التجارب مع العينات السريرية، حيث اشتملت كل تجربة على شاهد إيجابي واخر سلبي بالإضافة إلى شاهد سلبي يحوي ماءً مقطراً بدلاً من DNA، كما تم إجراء الاختبار مرتين لكل عينة من الحالات والضوابط على حد سواء.

9- التحليل الاحصائي Statistical analysis

- بعد جمع البيانات تم ترميزها وإدخالها إلى الحاسب باستخدام برنامج Excel2016، IBM-SPSS Version 25) وقد استعرضت الاحصائيات الوصفية على شكل النسبة المئوية.
- كما أجريت الاختبارات الإحصائية الموافقة حيث استخدم إختبار كاي مربعChi square test وإختبار Fisher exact test في دراسة المتغيرات الكيفية، وقد اعتبر المتغير المدروس له قيمة احصائية ذات مغزى من أجل قيمة مستوى الدلالة أقل أو تساوي 0,05 (P≤0,05) عند مستوى الثقة 95%.
- تم استخدام T-TEST للمقارنة بين المتوسطات
- ومن أجل دراسة الحساسية والنوعية وكلاً من القيمة التنبؤية السّلبية والإيجابية لهذا الاختبار فقد تم ذلك بواسطة crosstabs، وذلك بعد بالمقارنة مع زمرة دم الجنيني RhD وكذلك جنس المولود بعدالولادة.

وفق القوانين التالية:

الحساسية = الإيجابيات الحقيقية / (الإيجابيات الحقيقية + السلبية الكاذبة) × 100

النوعية = السلبيات الحقيقية / (السلبيات الحقيقية + الإيجابية الكاذبة) × 100

القيمة التنبؤية الإيجابية = الإيجابيات الحقيقية / (الإيجابيات الحقيقية + الإيجابيات الكاذبة) × 100

القيمة التنبؤية السلبية = السلبيات الحقيقية / (السلبيات الحقيقية + السلبيات الكاذبة)× 100

الباب الثالث

النتائج

سوف يتم عرض النتائج كالتالي :

- دراسة وصفية للسيدات المشتملات في البحث، تشمل حالة التمنيع
- دراسة العلاقة بين حدوث وتطور شدة التمنيع مع متغيرات) توافق ABO بين الأم والطفل (وترتيب الحمول والوقاية ب .Anti-D
- مقارنة نتائج التنميط المورثي الجنيني لكل من المورثتين RHD –RHCEمع التنميط الظاهري لزمرةRHD لحديثي الولادة
- ربط النتائج بحالة الجنين خلال الحمل من خلال الحالة المناعية للأم ونتائج MCA_PSV

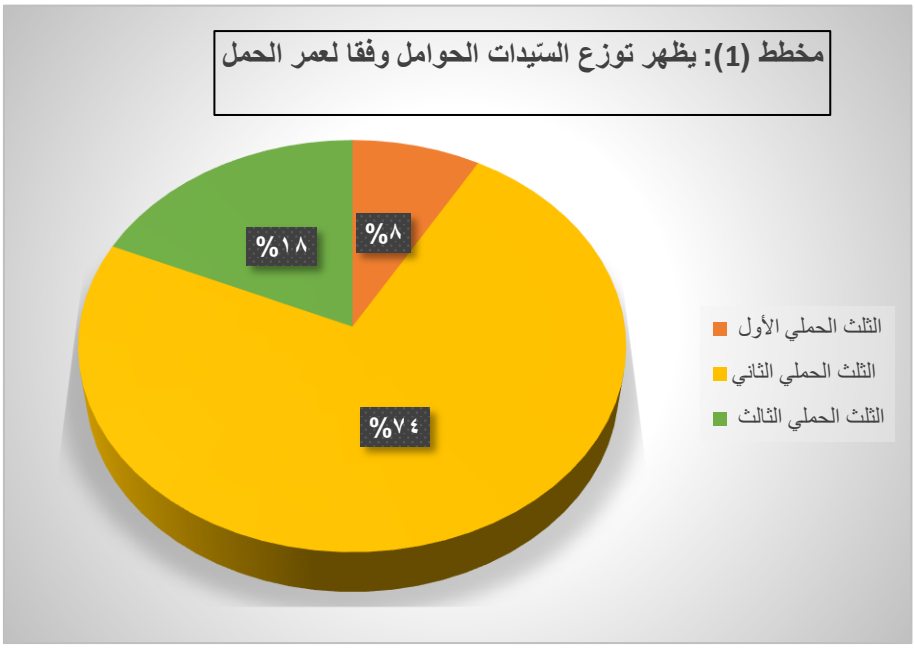
أولاً: الدَّراسة الوصفية للحوامل المشتملات في الدراسة

1.توزع السيدات بالنسبة للعمر الحملي:

أجريت الدراسة على 60 عينة دموية من أمهات حوامل سلبيات RhD، بلغ متوسط العمر الحملي لدى السّيدات المشاركات 23.4± 6.3. حيث بلغ عدد السيدات في الثّلث الحملي الأول أي بين الأسبوعين (7–13) 8.3%، بينما كانت غالبية النساء في الثّلث الثاني (14–28) بنسبة 73.3%، ونسبة 18.3 % في الثّلث الحملي الأخير أي بين الأسبوعين(29–40) كما يظهر كل من الجدول 9 و المخطط 1.

جدول (9): توزع الحوامل وفقا للعمر الحملي

العمر الحملي /الأسبوع	عدد الحوامل	النسبة المئوية
13–7	**5**	%8.3
28–14	44	%73.3
40–29	11	%18.3



2. توزع السّيدات وفقاً لترتيب الحمل:

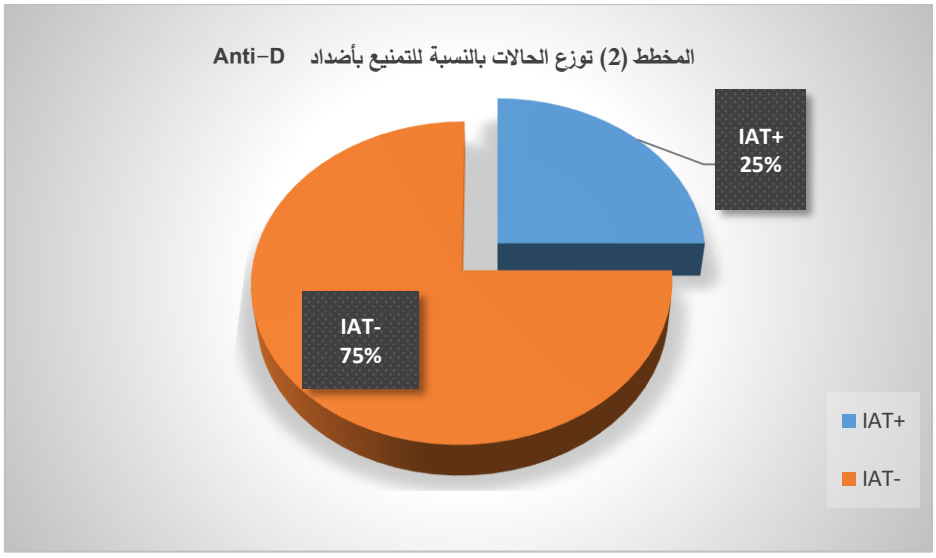
وقد تراوحت عدد الحمول بين السّيدات المشمولات في الدراسة من 1–9 حمول، وكان 9/60 (15%) من السّيدات خروسات، بينما 20% كن في حملهن الثاني، 15% كن في حملهن الثالث، وكذلك 11.7% في الحمل الخامس، بينما كانت نسبة الحوامل في الحمل ذو الترتيب 7–9 هو 3.2%.

جدول(10): يوضح توزع الحوامل حسب عدد الحمول

عدد الحمول	التكرار	النسبة المئوية%
1	9	15
2	12	20
3	9	15
4	12	20
5	7	11.7
6	4	6.7
7	2	3.3
8	2	3.3
9	3	5
Total	60	100

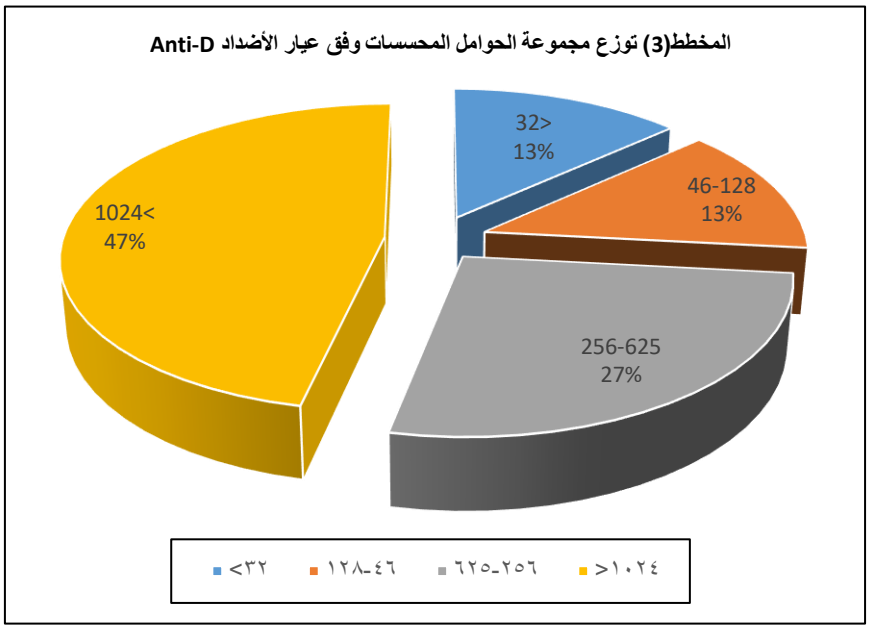
3.توزع السّيدات بالنسبة لحالة التمنيع بـAnti-D

يظهر المخطط (2) توزع الحالات بالنسبة للتمنيع بأضداد anti-D وذلك بعد إجراء اختبار IAT indirect antiglobulin test فكان عدد الحوامل إيجابيات الأضداد anti –D 15/60 أي ما يعادل (25 %)، بينما كان عدد الحوامل غير المحسسات 45/60 أي ما يعادل 75%.



4.توزع مجموعة الحوامل المحسسات وفق عيار الأضداد Anti-D

وقد توزعت الحالات المحسسة وفقاً لعيار الضد كما يظهر في المخطط رقم (3)، وتراوح عيار الأضداد بين 16–32.654، حيث كان 2/15 أي ما يعادل (13.3%) أقل من العيار الحدي <32، بينما كانت الأضداد في 7/15 (46.4%) سيدة محسسة تفوق عيار1/1024.



ثانياً: دراسة العلاقة بين حدوث وتطور شدة التمنيع مع متغيرات (توافق ABO بين الأم والطفل) وترتيب الحمول والوقاية ب Anti-D.

1.دراسة علاقة ارتباط بين حدوث التّمنيع و الوقاية ب Anti-D IG

ذكرت 4/15 (26.6%) سيدة من الحوامل المحسسات انهن لم يحصلن على anti –D مطلقاً في ولاداتهن السابقة بعد ولادة أطفال ايجابيي RHD، بينما 7/15 (40%) سيدة لم يحصلنَ على التّمنيع اللازم بعد حدوث الاسقاطات لديهن. كما يبين الجدول (11) مقارنة مع الحوامل غير المحسسات (اختبار IAT سلبي) فقد وجد ان 16/45 سيدة (35.6%) لم يحصلن على أية وقاية سابقة بينهن 9 سيدات خروسات،45 بينما كانت الولادة السابقة لثلاثة منهن لاطفال سلبيي RHD.

وقد تم إجراء اختبار Chi Square لمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق فكانت:P-value=0.007<0.05 مما يدل على وجود ارتباط هام بين تطور حالة التّمنيع والوقاية ب ANTI-D IgG فظهور الأضداد يكون أكبر عند غياب الوقاية الموجهة بشكل أساسي بعد حدوث الاسقاطات.

جدول (11) ارتباط حدوث التّمنيع مع الوقاية ب ANTI–D

الحالة المناعية للأم	لم تتلقَ أي وقاية	تلقت الوقاية الموجهة بعد كل ولادة واسقاط	لم تتلقَ الوقاية بعد الاسقاطات	العدد	قيمة P
IAT سلبي	16	29	0	45	*0.007
	%35.6	%62.2	%0		
IAT ايجابي	4	4	7	15	
	%26.7	%26.7	%46.6		

كما يبين الجدول (12) أن 11/15 (73.3%) من الحوامل المحسسات لم يحصلن على وقاية أثناء الحمول السابقة أو بعد حدوث الإسقاطات، بينما لم تحصل 4/33 (12.1%) من النساء عديدات الولادة غير المحسسات على أية جرعة وقائية خلال حملهن السابقة ولم يحصل لديهن تمنيع على الرغم من ذلك.

جدول (12) توزع السيدات عديدات الولادة بالنسبة للوقاية ب ANTI-D

الحالة المناعية للأم	الحوامل اللاتي لم يتلقين الوقاية	الحوامل اللاتي تلقين الوقاية الموجهة	العدد
IAT-	4	29	33
	%12.1	%87.9	
+IAT	11	4	15
	%73.3	%26.6	

2.دراسة ارتباط ظهور أضداد Anti-D بتوافق ABO بين الأم والطفل:

تم تحديد زمرة ABO للولدان كما يوضح الجدول (13) وقد كانت الزمرة O وهي الأكثر شيوعاً 56 /26 (46.4%)، تليها الزمرة A 21/56 (37.5%)، ثم الزمرة B 9/56 (16%)

جدول (13) نتائج زمرة دم ABO المواليد (56 عينة)

زمرة الطفل	A	B	O	المجموع
العدد	21	9	26	56
النسبة المئوية	%37.5	%16	%46.4	%100

كما يظهر الجدول (14) نسبة عدم توافق زمرة ABO بين الام والوليد تعادل 42.9%، كما بلغت نسبة ظهور توافق زمرة ABO بين الام والوليد عند الأمهات المحسسات 80 % أعلى منها عند الأمهات غير المحسسات(48.7%) ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم إجراء اختبار Fishers exact test فكانت:-P

value=0.035<0.05 وبالتالي يوجد ارتباط احصائي هام بين التّوافق في نظام ABO بين الام ووليدها مع حدوث وتطور حالة التّمنيع

جدول(14): يبين العلاقة بين حالة التّمنيع وتوافق نظام ABO

اختبار IAT		سلبي IAT	ايجابيIAT	
الزمرة الدموية ABO بين الام والمولود	عدم وجود توافق ABO	21 %51.2	3 20%	24 %42.9
	وجود توافق ABO	20 %48.7	12 80%	32 %57.1
المجموع		41	15	56 %100
قيمة P	*0.035			

Likelihood Ratio	4.660	1	.031		
Fisher's Exact Test				.065	.035
Linear-by-Linear Association	4.293	1	.038		

3.توزع الحوامل المحسسات تبعاً لسوابق حدوث الموه الجنيني:

ذكرت 13/15 سيدة محسسة قصة سابقة لحدوث الموه الجنيني خلال الحمول السابقة تطورت لدى البعض باكراً بدءاً من الأسبوع 16، بينما 15/ 2 سيدة محسسة (13.3%) لم يكن في سوابقهن قصة موه جنيني أو حدوث داء انحلالي خلال الحمول السابقة يوضح ذلك الجدول 15

جدول(15): توزع العينة حسب سوابق موه جنيني اوفقردم انحلالي عند الوليد

الحالة المناعية للأم	IAT+	IAT−	
لا سوابق موه جنيني	2	0	2
	%13.3	%0	
سوابق حدوث موه جنيني	13	45	58
	%86.6	%100	
	15	45	60

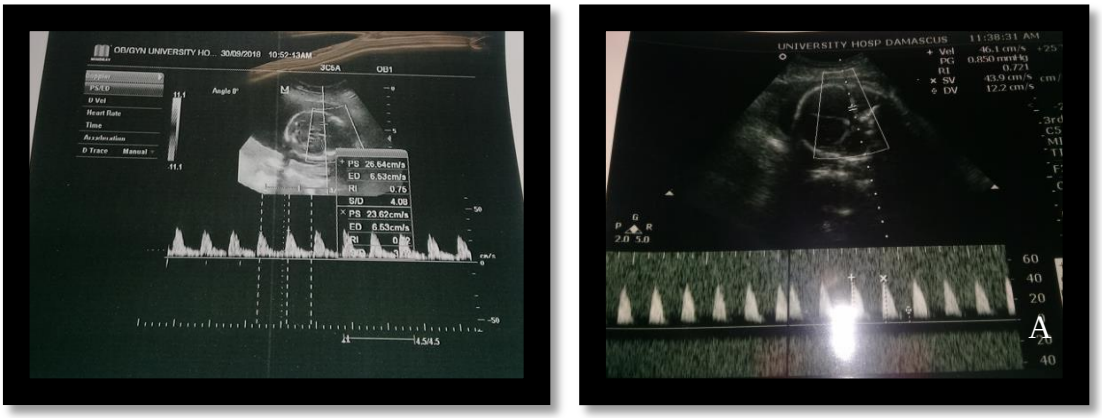
4.توزع الحالات وفقاً للمراقبة الصدوية :

يظهر الجدول (16) وجود تغيرات صدوية اثناء المتابعة للمراقبة الصدوية للحوامل المحسسة تدل على حدوث وتطور علامات فقر الدم الجنيني حيث يظهر الحبن –وذمة فروة الرأس في 15/13 (86.6%) بينما تطور لدى حالة واحدة 45/1 (2.22%) فقط من الحوامل غير المحسسات علامات فقر الدّم الجنيني أثناء المتابعة الصّدويّة ، والذي قد يعزى الى عدة أسباب أهمها الأسباب الانتانية وفي مقدمتها الاصابة ب Parvovirus B19 :

5.توزع الحوامل المحسسة وفقاً للمراقبة ب MCA-PSV

الحالة المناعية للأم	IAT +	IAT-
غياب الموجودات طيلة فترة المتابعة	**2**	**44**
	%13.3	**%97.7**
وجود او تطور الموجودات الصدوية أثناء المتابعة (حبن –وذمة فروة الرأس)	**13**	**1**
	%86.6	**%2.22**
العدد الإجمالي	**15**	**45**

يبين الجدول (17) نتيجة قياس MCA-PSV للسّيدات المحسسات موضّحاً العمر الحملي وعيار الضّد Anti-D الذي أجري في كل مرة، وتم حساب MOM ومقارنته بالقيم المرجعية، كما يبين الشكل (37) نتائج دوبلر للشريان المخي المتوسط لسيدتين محسستين في الأسبوع الحملي 20.25



الشكل (36): نتائج دوبلر الشريان المخي المتوسط لسيدتين

أ–حامل في الأسبوع 20 ب–حامل في الأسبوع الحملي 25

6. ربط حالة التّمنيع لدى النساء مع ترتيب الحمل

يظهر الجدول (18) أنّ عدد النّساء الممنعات الخروسات يبلغ الصّفر، مقارنة مع 9/45 (20%)هم عدد الخروسات غير الممنعات، ولمعرفة الأهمية الإحصائية لهذا الفرق تم حساب Pvalue=0.001<0.05 وهذا يؤكد وجود ارتباط بين ترتيب الحمل وظهور الأضداد، يعود ذلك لتكرار التعرض للمستضدٍ RHD لدى السّيدات الممنعات كلما تكررت الحمول، مما يحفز إنتاج الأجسام المضادة. حيث لوحظ أنَّ الانحلال الدموي الجنيني قد يظهر بصورة أكثر شدة، وفي عمر حملي أبكر وذلك في حالات الحمل اللاحقة بأجنّة إيجابية RHD.

الجدول (17) يبيّن نتائج قياس MCA–PSV للسّيدات المحسّسات

وسيط السعة الانقباضية للشريان المخي المتوسط تبعا للعمر الحملي	Multiples of Median	MCA-PSV	عيار الأضداد IAT	عمر الحمل	الرقم التسلسلي للمريضة
	MOM	CM/S			
25.47	1.37	35	1024	20	1
23.21	0.94	22	256/1	18	2
25.47	1.37	35	512/1	20	
30.66	1.14	35	256/1	24	3
33.65	1.18	40	512/1	26	
38.67	1.4	45	1024/1	25	4
23.21	0.99	23	16264/1	18	5
25.47	1.09	28	32528/1	20	
30.66	1.14	35	32528/1	24	
27.95	0.93	26	512	22	6
40.51	0.86	35	512	25	
40.51	1.35	55	1024	30	
27.95	0.89	25	1/512	22	7
33.65	1.33	45	1024/1	26	
40.51	0.93	38	512/1	30	8
42.43	1.01	43	512/1	31	

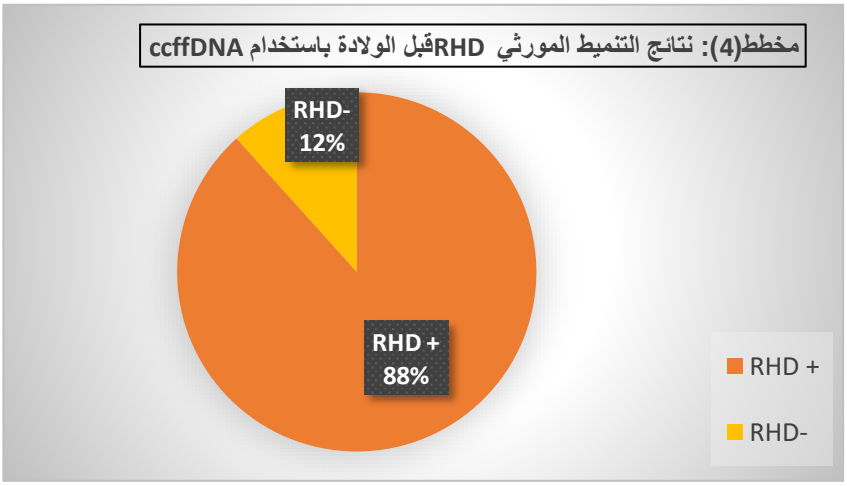
الجدول(18): يوضح عدد الحمول وتوزعها حسب حالة التمنيع

ترتيب الحمل	IAT-	IAT +	العدد الكلي
1	9	0	9
2	11	1	12
3	8	1	9
4	7	5	12
5	5	2	7
6	2	2	4
7	1	1	2
8	0	2	2
9	2	1	3
المجموع	45	15	60

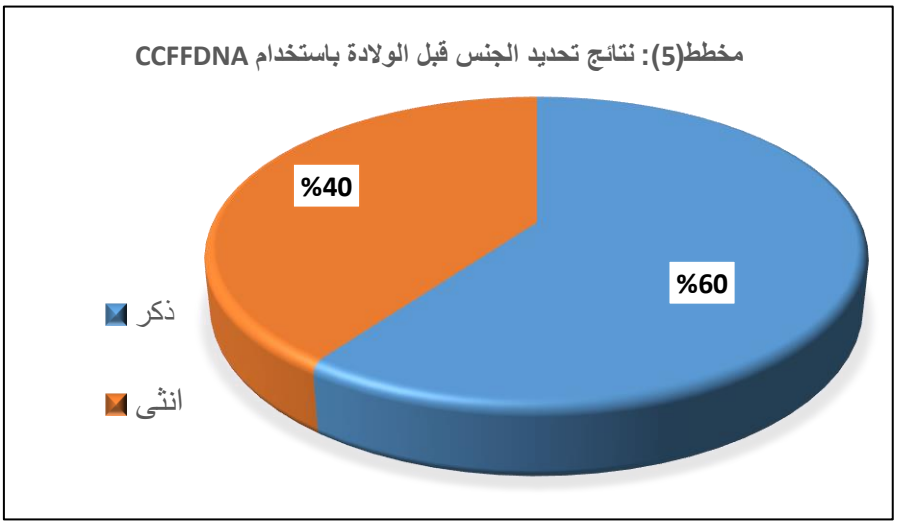
ثالثاً: مقارنة نتائج التنميط المورثي الجنيني لكل من المورثتين RHD –RHCE مع التنميط الظاهري لزمرة RHD لحديثي الولادة

1. نتائج العمل المخبري المتعلق بتحديد الزمرة الدموية RHD وتحديد الجنس قبل الولادة باستخدام ccffDNA:

يوضح الجدول (19) نتيجة التنميط المورثي .RHD قبل الولادة من عينة ccffDNA والتي كانت إيجابية في 53/60 (88.3%)، بينما كانت في 7/60 (11.7%) من الحالات سلبية RHD.



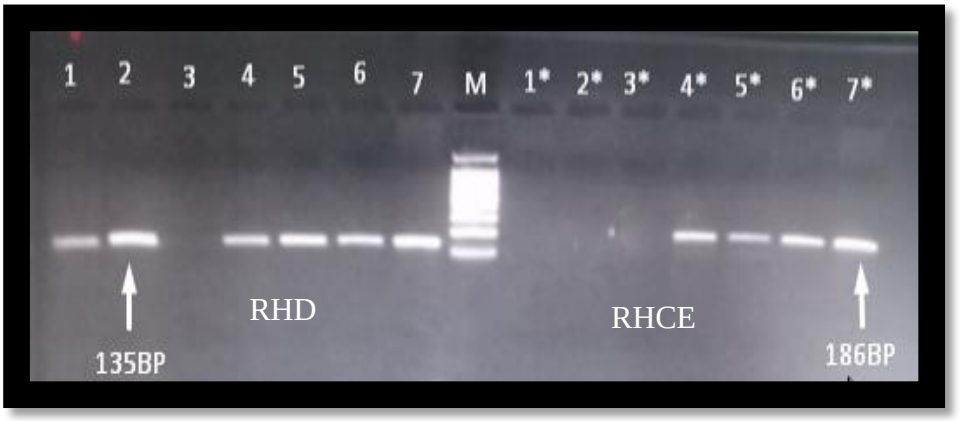
كذلك تم تحديد جنس الأجنّة لدى الأمهات الحوامل سلبيات RhD باستخدام ccffDNA، فكانت النتائج 36/60 (60%) ذكوراً، و24/60 (40%) إناثاً. **المخطط 5**



جدول(19) : نتائج تحديد الجنس والتنميط المورثي RHD قبل الولادة باستخدام ccffDNA

الجنس	التنميط المورثي RHD		العدد
	RHD-	RHD+	
ذكر	6	30	36
انثى	1	23	24
المجموع	7	53	60
	%11.7	%88.3	%100

2 .نتائج الرحلان الكهربائي لناتج تضخيم جين *SRY,RHD,RHCE*



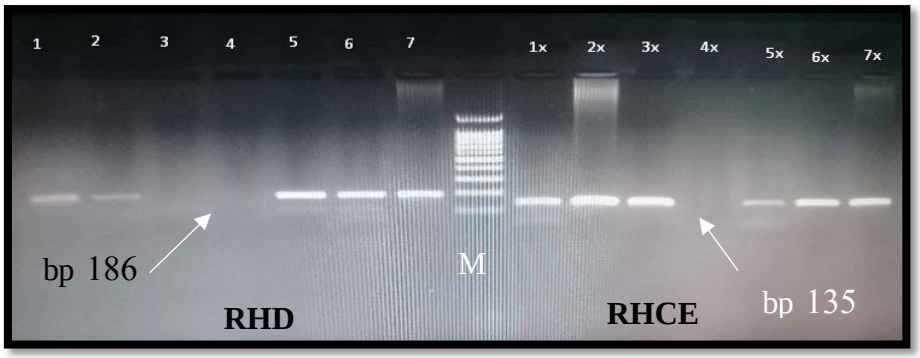
الشكل (37) نتائج تضخيم كل من المورثة *RHD*، *RHCE* بعد اظهارهما بواسطة UV

M: 100 base pair ladder

Lanes 1, 2 يشير الى الأجنة سلبية RHD ،

Lanes 4, 6, 5 الأجنة إيجابية RHD .

Lanes 3 ماء مقطر Lane 7، شاهد ايجابي

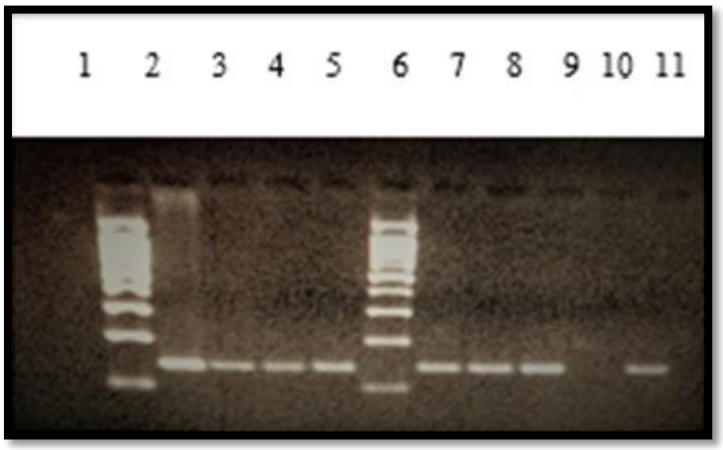


الشكل(38): نتائج تضخيم كل من الجين *RHD*، *RHCE* بعد إظهارهما بواسطة UV

M: 100 base pair ladder

Lanes 1, 2 ,6, 5 يشير الى الأجنّة ايجابية RHD،

Lane 4: ماء مقطر. Lane 7، شاهد ايجابي. Lane 3 شاهد سلبي



الشكل(39) الرحلان على هلام الاغاروز 2%، 10 v/cm

لنواتج تضخيم PCR-SRY على عينات ccffDNA الدم المحيطي للام (حيث يبلغ طول الشدفة bp137)

ladder (100 bp) 1و6

Lane 11-8-9-7- نتيجة تضخيم ايجابية لSRY

Lane 2 شاهد إيجابي، Lane 10 ماء مقطر

3. تحديد *النمط الظاهري RhD* بعد الولادة

تم إجراء النمط الظاهري RhD على عينة من دم الحبل السري للمواليد، وقد ظهرت النتائج كما يلي 51/60 (85%) من المواليد كانوا + RhD، بينما كان 5/60 (8.3%) سلبي RhD، ولم نستطع التَّواصل مع أربع حوامل بعد الولادة.**<u>الجدول 20</u>**

جدول(20): يوضح تحديد النمط الظاهري ل RHD بعد الولادة

RHD النمط الظاهري		
RHD +ve	**51**	**%85**
RHD -ve	**5**	**%8.3**
لم نستطع التواصل معهن	**4**	**%6.7**
المجموع	**60**	**%100**

يبّين الجدول (21) أنّ جنس المواليد كان متوّزعاً كالتالي: 32 ذكراً و24 أنثى، بينما بقيت 4 حالات مجهولة، لعدم القدرة على التواصل مع الأمهات.

جدول(21): نتائج تحديد الجنس بعد الولادة

نتائج تحديد الجنس بعد الولادة		
ذكر	32	%53.3
أنثى	24	%40
مجهول	4	%6.7
المجموع	60	%100

4- دراسة حساسية ونوعية التنميط الوراثي RHD مقارنة بالتنميط الظاهري RHD لدى الحوامل غير المحسسات :

كما يظهر الجدول (22)، أنّ حساسية التنميط الوراثي RHD مقارنة بالتنميط الظاهري RHD بعد الولادة لدى الحوامل المحسسات كان يعادل 100% ونوعية 100% وكذلك تمّ حساب القيمة التّنبئية السّلبية والايجابية لهذا الاختبار PPV،NPV وقد وجد أنها تعادل 100%.

جدول (22): يبين الحساسية والنوعية لاختبار تحديد RHD بواسطةccffDNA

التّوافق في تحديد الجنس وزمرة RHD	النمط المورثي RHD-		النمط المورثي RHD +		العدد	العمر الحملي /أسبوع
	إناث	ذكور	إناث	ذكور		
%100	0	0	0	2	2	13-7
%100	1	1	13	15	30	14-28
%100	0	2	5	2	9	29-40
	1 %0	3 %100	18 %47	19 %53		
(%100)	4	(%9.7)	37 (%90.2)		41	الإجمالي
%100						الحساسية
%100						النوعية
%100						PPV
%100						NPV

5- دراسة حساسية ونوعية التنميط الوراثي RHD مقارنة بالتنميط الظاهريRHD لدى الحوامل المحسسات

بينما يظهر الجدول (23) نتائج التنميط المورثي ما قبل الولادة لكل من النمط المورثي الجنيني للزمرة RHD، وتحديد الجنس بعد تضـــخيم الجين *SRY* في عينة ccffDNA وذلك تبعاً للعمر الحملي حيث كانت النتائج تتوافق مع 3/15 (20%) من الحالات كانت في الثّلث الحملي الأول، حالة واحدة كانت في الأسـبوع الحملي السـابع بينما كانت أخرى في الأسـبوع الحملي 10th، وكانت ثلاثة سـيدات منهن في الأسـبوع الحملي 13.

جدول (23) يبين ارتباط نتائج تحديد جنس الجنين والنمط المورثي RHD الجنيني وفق العمر الحملي لدى السيدات المحسسات

التّوافق في تحديد الجنس وزمرة RHD	النمط المورثي -RHD		النمط المورثي + RHD		العدد	العمر الحملي /أسبوع
	إناث	ذكور	إناث	ذكور		
%100	0	1	1	1	3	7-13
%100	0	0	4	7	11	14-28
%100	0	0	0	1	1	29-40
	0 %0	1 %100	%47 5	%53 9		
(100%)	1 (9%)		14 (91%)		15	الإجمالي

رابعا: دراسة العلاقة بين نتائج التنميط المورثي RHD الجنيني مع محصول الحمل

1.دراسة محصول الحمل مع التنميط المورثي RHD للجنين لدى الحوامل المحسسات

يظهر الجدول(24) أن نسبة 15 / 13 (86.6 %) سيدة حامل بجنين أظهر تنميطه المورثي أنه ايجابي RHD ، كانت نهاية 13 / 14 حدوث الاملاص، وقد ظهرت معظم حالات موت محصول الحمل بين الأسبوعين20 – 30 من الحمل بسبب تطور حالة الموه الجنيني.

بينما تطور اليرقان في حالة النمط الوراثي ايجابي الـ RHD للمواليد في 14 / 1 (3.9 %)، إذ تطورت الأضداد لديها في الثّلث الحملي الأخير (الأسبوع 32)، بينما 15 / 1 (6.66 %) من السّيدات المحسسات كان تنميط الطفل المورثي سلبي RHD ، وتمّت ولادته دون أية اختلاطات تذكر.

جدول(24): ارتباط التنميط المورثي RHD مع محصول الحمل الحالي لدى الحوامل المحسسات

التنميط المورثي الجنيني	موت محصول الحمل	طبيعي	يرقان وليدي	العدد	العدد الكلي
RHD -	0	1	0	1	
	0	%6.7	0	%6.7	
RHD+	13	0	1	14	
	%86.6	0	%6.7	%93.3	

2. دراسة محصول الحمل مع نتائج التنميط المورثي RHD للجنين لدى الحوامل غير المحسسات

يظهر الجدول (25) أنَّ41 / 4 (9.7 %) من السيدات سلبيات IAT تم تنميط أجنّتهنّ كسلبيي RHD، و 41 / 35(72.5 %) كان تنميط أجنتهنَّ المورثي إيجابي RHD، كن قد أتممن الحمل بصورة طبيعية وتمت الولادة دون اية مشاكل ، بينما كانت نسبة الوفاة حول الولادة 1 / 37 (2.7 %) من السيدات الحوامل باجنة RHD+ ، و 37 / 1 (2.7 %) أصيب بيرقان وليدي

جدول (25): ارتباط التنميط المورثي RHD مع محصول الحمل الحالي لدى الحوامل غير المحسسات

التنميط المورثي الجنيني	موت محصول الحمل	الطفل سليم	يرقاني	العدد
RHD -	0	4 %9.7	0	4 %9.7
RHD+	1 %2.4	35 %85.3	1 %2.4	37 %90.2

الباب الرابع

المناقشة

يعد الدّاء الانحلالي للجنين وحديثي الولادة HDFN من أشيع المشكلات التّوليدية التي يصادفها الأطباء السَّريريون، فهو سبب مهم لوفيات الجنين مع حدوث مراضة وليديّة محتملة وطويلة الأمد. ينتج HDFN عن التمنيع الخيفي بـ RHD بين الأم سلبية RhD وجنينها الإيجابي RhD، حيث تعبر الأجسام المضادة IgG anti-D المشيمة لتدمير خلايا RBCs الجنينية ممّا يؤدي لحدوث فقر الدم الجنيني، الذي يتطور للموه الجنيني المرتبط بنسبة وفيات حول الولادة عالية.

أولا: مناقشة نتائج الدراسة الحالية:

1- مناقشة نتائج الدراسة الحالية من حيث نسبة التمنيع ب RHD :

اشتملت الدراسة على (60) سيدة حامل سلبية RHD ، من المراجعات لمستشفى التَّوليد الجامعي بدمشق ، بلغ متوسط العمر الحملي لدى السّيدات المشاركات 23.4± 6.3.

بلغت نسبة التمنيع الخيفي anti -D 25 % وهي نسبة مرتفعة مقارنةً بالنّسب العالمية، وقد يعزى ذلك الى ان هذه الفئة المراجعة لعيادات المشافي هي من الفئات عالية الخطورة .

كما وجد ارتباط احصـــائي هام بين حدوث وتطور حالة التمنيع، وبين الوقاية ب Anti-D IgG (P=0.007<0.05) فقد أظهرت دراستنا أن (15 / 4) 26.6% سيدة محسسة لم تتناول أية جرعة وقائية موجهة بعد حملها السابقة، أو بعد الاسقاطات، أو بعد أي حدث محسس يزيد من نسبة FMH، بينما 15 / 6 (40 %) لم يتلقين الوقاية بعد حدوث الاسقاطات مما يدل على أنَّ ظهور الأضداد يكون أكبر عند غياب الوقاية الموّجهة بشكل أساسي بعد حدوث الاسقاطات.

بينما لم تذكر 45 / 16 (35.6 %) سيدة غير محسسة تناولهن وقاية روتينيّة موجهة سابقاً، كانت 9/16 منهن خروسات بينما 16 / 3 سيدة منهن كن في الحمل الثاني، وقد ولدن أطفالاً سلبيي RHD سابقاً (الأب متغاير الألائل RHD)، وبالتالي لم يحصـــلن على الجرعة الوقائية الموجهة، بينما قد يعزى عدم حدوث التمنيع لدى

4/16 إلى عدم التوافق في زمرة ABO مع مواليدهن، بالإضـافة إلى كمية FMH الحاصـل في حمولهن السـابقة تبعاً لترتيب الحمل وطريقة الولادة.

- بينما 15 / 4 سـيدة محسـسـة ذكرت انها تلقت الوقاية الموجهة بعد كل ولادة بطفل إيجابي وبعد كل اسـقاط، هذا يدل على عدم فعالية الوقاية نتيجة عدم كفاية الجرعة المقدمة من anti-D لتغطي حجم FMH، وبالتالي يجب قياس كمية النزف الحاصـل وتقييمه بشـكل علمي باختبارات مخبرية مثل كلاي اور.
- على الرّغم من أنّ عيار الأضداد لدى الأمّهات المحسسات يستعمل للتنبؤ بخطر تطوّر الدّاء الانحلالي لدى الجنين، حيث كانت عيارات الأضداد مرتفعة جداً في دراستنا اذ تجاوزت عيار 1:1024 لدى 15 / 7 من السّيدات المحسسات، لكن الارتفاع السّريع في مستويات anti-D كان مهمّاً أيضاً، ففي 15 / 13 (86.6 ٪) تطوّر عيار الضّدّ بشكلٍ مضاعفٍ خلال فترة المتابعة، وترافق ذلك مع تطوّر الموه الجنيني لديهنّ. بينما بقيت الأضـداد مسـتقرة خلال فترة الحمل في 15 / 2 (13.3 %) مع تطورها لدى احدى السيدتين في الثّلث الحملي الأخير (الأسبوع الحملي 32).
- كذلك وجد ارتباط احصـائي هام بين حدوث وتطور حالة التّمنيع، والتوافق في زمرة ABO بين الأم والجنين(P-valu=0.03<0.05) ، فقد كانت نسـبة عدم توافق زمرة ABO بين الام والوليد تعادل 56 /24 (42.9%)، كما بلغت نسـبة ظهور توافق زمرة ABO بين الام والوليد عند الأمهات المحسـسـات 80 %أعلى منها عند الأمهات غير المحسـسـات (48.7%) 20/41 وذلك لأنّ عدم التّوافق بين الأم وجنينها بنظام ABO قد يخفّف من نسبة حدوث التّمنيع الوالدي الجنيني بـــ RHD، اذ تنتج الوقاية من حدوث التّمنيع في الحمول غير متوافقة ال ABO عن تحطّم الكريات الجنينية الحاملة للمستضد ABO والمتسـربة للدّوران الوالدي، والتي تقبط بواسـطة الأضـداد الجائلة في الدّم من نوع IgM وبمسـاعدة المتممة، ليتم إزالتها من الدَّوران بواسطة الجهاز البلعمي وحيد النواة MPs خاصة في الكبد.

☒ وتعد نسبة فقد الجنين في دراستنا عالية، مما يدل على خطورة تطور حالة HDFN لدى السّيدات المحسسات. حيث كانت نسبة موت محصول الحمل لدى السّيدات المحسسات 86.6 %، بينما لم تتجاوز نسبة الموت لدى غير المحسسات 2.2 %، مما يؤّكد ازدياد خطورة فقد الجنين نتيجة لتطور فقر الدّم الجنيني والموه الجنيني، وخاصةً عند عدم إجراء أي تدابير علاجية مثل نقل الدم داخل الرحم.

2-مناقشة نتائج PSV-MCA

تم اعتماد قيمة MCA-PSV المقدرة ب (سم/ثا) والذي أُجري بيد طبيب الأشعة في قسم الأشعة في مستشفى التوليد الجامعي، و تمّ حساب كل من الوسيط Median و MOM، حيث وجدنا لدى 8 سيدات (كن قد تجاوزن الأسبوع 18 أسبوعاً حملياً)، بعد القيام بمتابعتهن ب MCA-PSV أنه على الرّغم من أن تطور الأضداد لديهن كان مترقيّاً ومترافقاً مع التّطورات الخزبيّة الصّدويّة، لكن لم تكن الموجودات الشعاعية متوافقة مع الحالة السّريريّة للأجنّة المصابة، فلم نجد أن قياس MCA-PSV لدى أيّ من الأجنّة قد تجاوزت MOM1.5، القيمة التي يزداد بعدها خطر حدوث فقر الدّم الجنيني، و قد يعود ذلك لنقص الخبرة بأداء هذا الإجراء التشخيصي الشعاعي، والذي يتطلب مهارة عملية وعلمية كبيرة.

3-مناقشة النتائج المتعلقة بتحديد النمط المورثي RHD لدى الجنين واختيار ccffDNA كسبيل لتحديد النمط المورثي الجنيني RHD :

أكّدت دراستنا قدرة التّنميط المورثي ل RHD الجنيني بواسطة ccffDNA والذي أجري ل 60 سيدة حامل سلبية RHD على التنبؤ بصورةٍ صحيحةٍ 100 % بما يتعلق بزمرة الجنين RHD في كلّ فترات الحمل بدءاً من7حتى 38 أسبوعاً حملياً، حيث تمّ تضخيم exon 7 من الجين *RHD, RHCE* بشكل قاطع في جميع المشاركين في الدراسة 60 (100 ٪) والتي أدرجت مشرعاته لاستبعاد إمكانية ظهور السّلبيات الكاذبة التي قد تحدث بسبب عدم وجود DNA كافٍ لحدوث التّضخيم، إذ يدلّ وجود تسلسلٍ طوله 135 bp من DNA المستخرج من بلازما الأمّ كمؤشر لوجود DNA كقالب في عملية التّضخيم اللّاحقة. بينما حدث تضخيم exon 10 النوعي ل RHD في 60 / 53 (88.3 %) ايجابيي RHD ، وكان 60 / 7 (11.6 %) من الأجنّة سلبية RHD. وأظهرت النّتائج

توافقاً تامًّاً مع النمط الظاهري RhD الذي تم اجراؤه على عينة من دم الحبل السري للمواليد. حيث وجد ان 56 / 5 (9 ٪) من الولدان هم سلبيو RHD ، بينما كان 56 / 51 وليد (91 ٪) إيجابيو RHD . كما تم حساب حساسية ونوعية هذا الاختبار فكانت تساوي 100% وكذلك كلاً من القيمة التنبئية الإيجابية والسّلبية التي كانت 100 % أيضاً.

3 –1 مناقشة النتائج المتعلقة بتحديد النمط المورثي RHD لدى الحوامل المحسسات:

يفيد تحديد النمط المورثي RHD للجنين في تدبير فقر الدّم الجنيني لدى الأم سلبية RhD المحسسة، ففي حال كون النمط المورثي الجنيني RHD إيجابياً كما وجد في 15 / 14 (93.3 %) فإن متابعة الأجنّة الذين هم في خطر لتطور HDFN، تتم بإجراء مراقبة دقيقة من خلال التّقييم التّسلسليّ لمستويات Anti-D، ومراقبة الجنين باستعمالالموجات فوق الصوتية و MCA-PSV Doppler وذلك بعد الأسبوع الحملي الثامن عشر، حتى يتّم التّدخل الأمثل، بنقل الدّم داخل الرحم، أو حتّى انضاج الرئتين لتتم بعدها الولادة المحرضة، مما يقلل من نسب المراضة والوفيات المرتبطة بتطور HDFN.(Rossiter et al., 1994)

بالمقابل إن نسبة 15 / 1 (6.6 %) من النّساء سلبيات RhD المحسسة ذوات التنميط الجنيني المورثي السلبيRHD، لن تكون بحاجة إلى أيّ تدبير إضافيّ، فهي ليست بحاجة إلى الوقاية الرّوتينيّة أثناء الحمل، وتراقب بصورة روتينيّة كون الجنين سلبي RHD، وبالتالي لن يكون هناك خطر لتطور HDFN، مما يخفّض من نسبة الإجراءات الباضعة مثل بزل السّلى او إجراء CVS، أو حتى المراقبة المكثّفة بعيار الأضداد، أو إجراء MCA-PSV.

3 – 2 مناقشة النتائج المتعلقة بتحديد النمط المورثي RHD لدى الحوامل غير المحسسات:

لن تكون نسبة 41 / 4 (9.7 %) من الحوامل غير المحسسات، واللّاتي أظهر التّنميط المورثي RHD أنَّ الأجنّة سلبية RHD، بحاجة للمتابعة الرّوتينيّة بعيار الأضداد أو MCA-PSV، ولن تكون بحاجة للوقاية الرّوتينيّة RAAPD وبالتالي تمّ الاستغناء عن جرعة anti – D IgG.

بينما تبقى نسبة 41 / 37 (90.2 %) من الحوامل غير المحسسات ذوات التنميط الجنيني الإيجابي RHD معرضات لخطر لتشكل الأضداد، وتعد أولئك السّيدات مرّشحات للحصول على الوقاية الرّوتينيّة RAAPD في الأسبوع 28 (أو قبل ذلك في حال القيام باي إجراء يزيد من نسبة حدوث FMH)، مما يخّفض نسبة خطورة التّمنيع التي قد تنتج عن النّزف الجنيني الوالدي خاصّة في الثّلث الحملي الأخير.

ثانياً: مناقشة نتائج الدراسة الحالية مع الأبحاث المقارنة:

1- بما يتعلق بنسبة التّمنيع في دراستنا:

بلغت نسبة التمنيع الخيفي بـ anti -D 25%، وهي نسبة مرتفعة مقارنةً مع النّسب العالمية والتي لاتتجاوز في بعضها 0.1 % (Izetbegovic, 2013)،(Pal et al., 2015) وعلى الرّغم من صعوبة مقارنة نتائج الدّراسات المختلفة بسبب تغايرية heterogeneity السّكان، وتنوّع بروتوكولات تقصّي الأضداد، والاختلاف في تعريف الأضداد المهمّة سريرياً، والاختلاف في التقنيّات المستخدمة لتحديد الأجسام المضادّة. فإنّ نسبة التّمنيع بRHD في دراسة عمانية بلغت 10 %(Izetbegovic, 2013)، كما تراوحت عيارات الأضداد بين 1:2 -1:256، وقد تطوّر فقر الدّم لدى جنين واحد فقط، كان قد احتاج لنقل دم بعد الولادة، بينما تطوَّر فقر الدّم الجنيني لدى 86.6 % من الأجنّة ليصل لمرحلة الموه الجنيني والذي أفضى إلى الموت.

بينما أظهرت دراسة تركية أجريت عام 2013، وكانت تهدف لتحري الأضداد اللّانظامية المسؤولة عن حدوث التّمنيع لدى النّساء الحوامل، ان anti-D هي الأضداد الأكثر شيوعاً بنسبة 6.46 %، وتراوحت عيار الأضداد بين 1 / 16 -1:4000، وقد تطوّر الموه الجنيني لدى 2 من الحالات المحسسة احتاج أحدهم للمعالجة الضّوئية بعد الولادة، بينما توفي الطفل الآخر بعد الولادة.(Altuntas et al., 2013)

إلّا أنّ هناك توافقاً مع الدّراسات التي أجريت في السّعودية، حيث بلغت نسبة التّمنيع ب D-anti 28.57 % (Al-Ibrahim, 2008)، وفي دراسة أخرى أظهرت أن نسبة التّمنيع بـ Rh تبلغ 23.6% وهي تقريبا 10

اضعاف النسب المذكورة عالمياً، حيث بلغت نسبة الوفيات حول الولادة 250 لكل 1000 ولادة حية بين الحوامل المحسسات.(Bondagji, 2011)

كما توافقت هذه الدّرَاسة مع العديد من الدراسات المحلية في سورية، والتي ذكرت نسبة تمنيع RHD عالية (23.8 %) حيث تطوّر الدّاءالانحلالي عند 42 / 7 (16.6 %) من الحوامل المحسسات، بينما كان تطور الدّاء الانحلالي في دراستنا بنسبة 23.2 % من مجمل السّيدات في الدّراسة. {**المرجع 161**}

بينما ذكرت دراسة محلية أخرى في عام 2014 أن معدل إيجابية الأضداد اللانظامية لدى الحوامل (7/300) بنسبة 2.33%، كانت 86% منهن محسسات ب anti-D. **{المرجع 162}**

2- بما يتعلق بتحديد النمط المورثي RHD لدى الحوامل سلبيات RhD :

توافقت دراستنا مع دراسة أجريت في المغرب لتحديد RHD الجنيني بتقنية PCR التقليدي لتضخيم ccffDNA من بلاسما 120 سيدة حامل من عمر 10 -40 أسبوع حملي، وقد تم استخدام مشرعات نوعية ل RHD بحيث تضخم كلا من exon 7، exon 10 وكانت PPV = 98.7 بينما NPV =96 (Achargui et al., 2011). بينما استخدمت في دراستنا مشرعات لكل من الإكسون 10، 7 من الجين *RHD*، بينما كان تضخيم الإكسون 7 من الجين *RHCE* بمثابة internal control لضبط عملية التَّضخيم.

اعتمدت دراسة أخرى على ccffDNA في تحديد النّمط المورثي RHD الجنيني بتقنية PCR التقليدية بتضخيم الإكسون 10، والانترون 4 والتي أجريت عام 2006 على 81 سيدة برازيلية من العمر الحملي 4 - 41 أسبوع، وكانت الحساسية 98.3 %، والنوعية 93.8%.(Machado, 2006)

ذكر Lo et al في دراسة لتحديد النمط المورثي RHD بتضخيم ccffDNA عن حساسية ونوعية % 100 و80 %، على التوالي(Lo, Y. M. et al., 1997) ، في حين أبلغ Akolekar et al عن حساسية 98.2 % ونوعية 100% في 591 امرأة.(Akolekar, 2011)

كما أفادت دراسة أجراها Cardo et al وكانت تستهدف كلا من الإكسون 7، والإكسون 5 من جين RHD، أن حساسية ونوعية تحديد RHD من بلاسما الأم كانت 93 % و100%، على التوالي.(Cardo et al., 2010)

وقد لوحظ في دراستنا غياب كلّ من الحالات الإيجابية الكاذبة/السّلبية الكاذبة، الأمر الذي قد يُعزى إلى أنَّ نسبةً كبيرةً من النّساء المشاركات (95 %) كنَّ في عمر حمليّ متقدم، حيث من المفترض أن يكون تركيز ccffDNA أعلى في الدورة الدّموية للأم (Cardo et al., 2010) وهذا ما ذكرته الدراسات السابقة حيث ان تركيز ccffDNA يزداد مع تقدم عمر الحمل، حتى يبلغ تركيزه الاعظمي خلال الأسابيع الثمانية الأخيرة من الحمل قبل الولادة) (Wang, E. et al., 2013) لذلك يمكن عزله في أواخر الحمل بسهولة أكبر بطريقة الاستخلاص المناسبة.

لقد اعتمدت العديد من الدّراسات السّابقة في الأدب الطبي في تحديد النمط المورثي RHD الجنيني على بزل السّلى ، وذلك بغية الحصول على الخلايا الجنينية وبالتالي المادة الوراثيّة الجنينيّة، وقد كانت حساسية ونوعية هذا الاختبار 92.9 % و100 % على التوالي.

كما أجريت دراسة عربية واحدة (مصرية) على 20 حامل محسسة كن قد خضعن لبزل السّلى (El Din et al., 2011) وكذلك في دراسة أخرى أجريت لتحديد حساسية ونوعية التنميط المورثي RHD بوساطة PCR على الخلايا الأمنيوسية وخزعة الزّغابات المشيمية، والتي استخدم فيها الباحثون المشرعات ذاتها المستخدمة في دراستنا لتضخيم exon 10، exon 7 ولكن بتركيز أعلى، وذلك بسبب تركيز DNA الجينومي، وكانت الحساسية والنوعية 100 %(Bennett, 1993) (Lighten et al., 1995)

مقارنة مع الدراسات المذكورة آنفاً فإننا نجد أنّه على الرَّغم من نسب الحساسية والنّوعية المرتفعة لهذا الاختبار فإنَّ دراستنا المعتمدة على عزل ccffDNA تتميز بأنها غير باضعة، ولا تحمل أي خطر على الجنين، أو على حالة التّمنيع الجنيني الوالدي. حيث تعدّ هذه التّقنية بديلاً عن الطرائق المتبعة التّقليدية الباضعة في الحصول على المادة الوراثية الجنينية والتي قد تؤدي إلى فقد الجنين في 1 –2 %، بينما تزيد حالة التمنيع الخيفي سوءاً بنسبة 40 %.(Lo, Y. M. et al., 1997)

3- مناقشة نتائج الدراسة الحالية بالنسبة إلى العمر الحملي

ما يُميّز الدّراسة الحالية هو القدرة على تحديد النمط المورثي RHD للجنين بتقنية PCR التقليدي بنجاح في الأسبوع السابع من الحمل عن طريق عزل ccffDNA من البلاسما، والذي يعزى إلى حسن اختيار العتيدة المناسبة لاستخلاص ccffDNA، فقد تمّ الحصول على أعلى إنتاجيّة من خلال العتيدة QIAamp Dsp Virus Kit، وذلك بناءً على توصيات العديد من الدّراسات والتي رشّحته ليكون الخيار المناسب لعزل كميات مناسبة من DNA البلاسمي(Legler, 2009) والتي وجدت انها أعلى من مجموعة QIAamp DNA Mini Kit المستخدمة بشكل متكرر(Siva, 2003) أو طرائق الاستخلاص الأخرى، التي ذكرت في العديد من الدراسات السابقة (Emanuel, 1993)، وتعد العتيدة المستخدمة في دراستنا قليلة التكلفة بالمقارنة مع العتيدة Circulating Neuclic Acids Kit ذات المردود العالي.(Londero, 2019)

بينما أظهرت الدراسات السابقة نتائج غير حاسمة وأقل حساسية ونوعية خاصة في الثّلث الحملي الأول والذي قد يكون بسبب انخفاض تركيز ccffDNA، الا ان بعض الدراسات الحديثة ذكرت انه بالإمكان للتقنيات الحديثة ان تستخلص ccffDNA باكرا أثناء الحمل في الأسبوع الرابع .

كما استطاع Rijnders وآخرون عام 2003 عزل الحمض النووي للجنين في الأسبوع الحملي الخامس، باستخدام Qiagen Ultrasens Virus Kit ولان تركيز DNA في البلاسما قليل خلال فترة الحمل المبكرة لذا فان إجراء أي تعديل في منهجية الاستخلاص، والتي تؤدي إلى زيادة كمية DNA المعزولة سيكون له دور كبير في نجاح التنميط المورثي قبل الولادة. (Rijnders, 2003)

4- مناقشة نتائج الدراسة الحالية من حيث اختيار المشرعات:

إنَّ اختيار المشرعات له دور أساسيّ في نجاح عملية التضخيم، بسبب التّعقيد الشّديد لنظام RH ، وقد أكّد chan وزملاؤه عام 2001 على أنّه من المهم اختبار أكثر من بادئة واحدة من الجين *RHD* ، وأثبت أن استخدام زوج وحيد من المشرعات من أجل التّنميط المورثي RHD قد يسبّب نتائج سلبية كاذبة او إيجابية كاذبة،

فمعظم المشرعات ستضخم شدفة من الجين *RHD* مترافقة مع شدفة موافقة من *RHCE* ، لذلك يجب تضخيم عدة اكسونات من الجين RHD بشكل مستقل، مع اختيار دقيق للمشرعات لتحديد ألائل RHD المتغايرة، وتجنب النتائج الإيجابية الكاذبة في التنميط المورثي RHD.(Chan, F. Y. et al., 2001)

تعد كلٌّ من الإكسونات 4 و 7 و 10 المناطق الأكثر تغايراً بين الجينتين *RHD*، *RHCE* بالإضافة إلى intron 4 (Aubin et al., 1997) وقد كان اختيار المشرعات في دراستنا يعتمد على تضخيم الشدفتين من الإكسون 10 و 7 للحصول على تركيبة مثالية لتحليل RHD خاصة فيما يتعلق بالاختلافات النوكليوتيدية في ′ Untranslated Region UTR 3 من الإكسون 10 من الجين *RHD* والتي لا تكون موجودة في الجين (Wang, X. D. et al., 2009)، (Daniels, G. et al., 2004) *RHCE*

بينما ذكرت دراسة أجراها sachi وزملاؤه على 28 سيدة حامل من 15 –17 أسبوع حملي، والذي استخدم أزواج المشرعات المستخدمة في دراستنا الحالية، حالتين لم يكن DNA المعزول كافياً لتفاعل PCR كما ذكر ثلاث حالات من الإيجابية الكاذبة والسلبيَّة الكاذبة والذي فسّره الباحثون بالتعدديات الشكلية polymorphism لجين *RHD*.(Siva, 2003)

5- النتائج المتعلقة بتحديد الجنس لدى الجنين بالاعتماد على ccffDNA:

خلافاً للعديد من الدراسات السابقة مثل(Clausen, F. et al., 2012) (Van der Schoot, 2006) حيث لم يتم تأكيد وجود الـ DNA الجنيني في الدّم المحيطي للأم، فقد تم تضخيم الجين *SRY* في دراستنا كعنصر ضبط إيجابي لتأكيد وجود DNA الجنيني خاصة لدى الأجنّة الذكرية ذوي التنميط المورثي RHD السلبي، حيث توافقت في هذه النقطة مع (Moezzi et al., 2016) (Oliveira, 2012) ، وقد وجد بعد إجراء PCR أن 32 من أصل 56 عينة تم حدوث التضخيم فيها لشدف يبلغ طولها 137 bp، أي ما يعادل نسبة (57.1 %) كانوا أجنّة ذكوراً، بينما لم يتّم التضخيم في 24 عينة فقط، وبالتالي كانت نسبة (42.9 %) أجنّة إناث، وقد توافقت هذه النتائج تماماً 100 % مع جنس المولود بعد الولادة.

تبيّن نتائج الدّراسة المورثيّة لتحديد الجنس المعتمدة على تقنية PCR، وذلك باستخدام ccffDNA الجنيني من بلاسما الأم الحامل أنّ هذه الطريقة مفيدة في تحديد جنس الجنين الذي تم التثبّت منه بعد الولادة، كما كانت حساسيّة ونوعيّة PCR للكشف عن حالات الحمل التي تحمل الذكور من بلاسما الأم في فترة الحمل التي تتراوح بين 10–32 أسبوع حملي، 100% لكل منهما.

كذلك تمّ تقييم القيمة التنبئيّة الموجبة والسالبة PPV، NPV فكانت مساوية لل 100%، حيث كان التّوافق بين النمط المورثي قبل الولادة بالاعتماد على ccffDNA وجنس المولود بعد الولادة تاماً.

هنالك العديد من الدراسات التي ذكرت أهمية استخدام الccffDNA من أجل تحديد جنس الجنين، وقد توافقت دراستنا مع دراسة التي أجريت لتحديد الجنس باستخدام تقنية PCR التقليدية حيث بلغت الموثوقية في التنبؤ بجنس الجنين (نسبة الحالات التي تم فيها التنبؤ بجنس الجنين بشكل صحيح) 100% في الثّلث الأول والثاني والثالث من الحمل على الترتيب(Oleiwi, A. A., 2010).

كما أنها توافقت مع العديد من الدّراسات التي أثبتت ان الحمض النووي الجنيني ccffDNA يمكن أن يعزل من بلازما الأم(Tungwiwat, 2003) أو المصل(Honda, 2002)، في وقت مبكر من الأسبوع السابع حتى الأسبوع العاشر من الحمل(Honda H et al., 2011) ، حيث تم عزله في دراستنا لدى سيدتين كانتا في الأسبوع السابع و العاشر من الحمل، مما يزيد من تعزيز ميزة هذا التشخيص قبل الولادة من حيث التوقيت أثناء الحمل كبديل للتقنيات الباضعة في بعض الحالات المختارة، حيث توزعت النتائج في دراستنا حسب الفئات العمرية الحملية كالتالي 5 حالات في الثّلث الحملي الأول كانت اثنتان منها في الأسبوع الحملي العاشر، وقد تم تحديد الجنس بدقة حيث كان هناك 1/5 (20%) أجنّة إناث، بينما كان 4/5 (80%) أجنّة ذكوراً.

إنّ تطبيق تحديد الجنس ccffDNA له فائدة كبيرة في الحمول المعرضة لتطور الاضطرابات المورثية المتعلقة بالصبغي X، وكذلك في الحمول المعرضة لخطر الإصابة بالامراض الاستقلابية المترافقة مع تطور أعضاء جنسية مبهمة، لأننا سنكون قادرين على تخفيض عدد الإجراءات الباضعة لما يقرب 50%، وبالتالي

تخفيض نسبة فقد الجنين التي تقارب نسبة 2% المترافقة مع الإجراءات الباضعة التقليديّة المستخدمة للحصول على المادة الوراثيّة الجنينيّة.

ثالثاً: الصّعوبات التي واجهتنا في البحث

- صعوبة التّواصل مع النّساء خاصة بعد الولادة.
- العامل النّفسي للسّيدات الحوامل خاصة المحسسات واللاتي يقعن تحت ضغوطات أسريّة للانجاب مرة أخرى، مع العلم أن 10/15 (66.6%) من الحوامل المحسسات ليس لديهن إلا طفل واحد.
- قياس التّراكيز الفعلية لل ccffDNA وذلك بسبب تشدفه وعدم قدرة nanodrope على قياس تركيزه.
- صعوبة تأمين المواد المخبريّة والكواشف اللازمة بسبب محدودية الميزانية
- الصّعوبة في ضبط طرائق العمل.

الباب الخامس: الاستنتاجات

- تعد هذه الدراسة هي الأولى من نوعها في سورية، في مجال التنميط المورثي لـRHD الجنيني باستخدام (ccffDNA) المعزول من الدم المحيطي للأم سلبية لـ RHD، وذلك بالاعتماد على طريقة عزل يدوية باستخدام العتيدة QIAgen Dsp Virus Kit، وباستخدام تقنية PCR التقليدية.
- أظهرت دراستنا أن التنميط المورثي الجنيني ل RHD الإيجابي في 51/ 56 (91%) كان متوافقاً مع التنميط الظاهري RhD بنسبة 100%
- كذلك كان الأمر بالنسبة للتنميط المورثي RHD السلبي في 56/5 والذي كان متوافقاً مع التنميط الظاهري RhD بنسبة 100%
- بلغت حساسية sensitivity ، ونوعية specificity هذا الاختبار 100%.
- وقد أثبتت هذه الدراسة قدرة هذا الاختبار على تحديد زمرة RHD الجنيني وذلك بدءاً من عمر 7 أسابيع حملية.
- تم تحديد جنس الجنين باستخدام ccffDNA عبر تضخيم الجين *SRY* في الأسبوع الحملي السابع .
- بلغت نسبة الأمهات المحسسات في دراستنا 25% وهي نسبة عالية جداً مقارنة بالنسب العالمية، مما يشير إلى فشل سياسة الوقاية لدينا.
- يعد استخدام ccffDNA في تحديد النمط المورثي RHD الجنيني طريقة آمنة، موثوقة، وسريعة والأهم أنها غير باضعة تستخدم لتدبير الحمول المحسسة، اذ أن 56/14 (25%) كن نساء ممنعات يحملن أجنّة إيجابية RHD وبالتالي هنّ في خطرٍ لحدوث HDFN الذي تطوّر لدى بعضهن بالفعل، والذي يستلزم متابعة بنقل الدم داخل الرحم او الولادة ليتمّ انقاذ الجنين، بينما تم تحديد RHD الجنيني السلبي في سيدة واحدة محسسة مما يخفف عبء المتابعة السريرية.
- إنّ تطبيق هذه السّياسة الصّحية في مراقبة السّيدات سلبيات RhD جميعهن دون أن ينحصر تطبيقها على المحسسات منهن قد ينعكس إيجابياً في خفض استهلاك Anti-D وحصره فقط بالحوامل غير

المحسسات الحوامل بأجنّة ايجابيّة الـ RHD، ممّا يساهم في خفض استهلاك الموارد البشريّة التي قد تحمل معها خطر الإصابة بالأمراض الفيروسيّة مثل التهاب الكبد (HCV)، أو داء كروتزفيلد جاكوب، وما يترتب على ذلك من خفض الأعباء المالية للدولة والمواطن.

الباب السادس: المقترحات والتوصيات

Suggestions and Recommendations

توصي الدراسة الحالية بـ:

- اهتمام السلطات المعنية بتشكيل فريق خبراء مختص بتوفير التدابير الوقائية والعلاجية المناسبة
- اعتماد تحديد النمط المورثي RHD الجنيني من الدم المحيطي للام كوسيلة لتحقيق ذلك الى جانب تحديد الحالة المناعية للحامل
- ضرورة اللجوء إلى تحديد النمط المورثي RHD الجنيني بطريقة غير باضعة كإجراء أساسي أثناء متابعة النساء سلبيات الـ RHD، لتكون أداة مفيدة في الممارسة السريرية كعنصر ضبط (تحكم) في الوقاية من حدوث التّمنيع قبل الولادة.
- توجيه الجهود من أجل جعل التنميط المورثي الجنيني RHD بطريقة غير باضعة خطوة أساسية في تدبير الحمول المحسسة لدى النّساء سلبيات RHD، وذلك خلال الفترة الحمليّة المبكرة من أجل توفير عبء المراقبة المخبريّة والسريريّة خلال الحمل وتوفير الاستقصاءات الباضعة في حالة الجنين سلبي RHD.
- الالتزام بوضع خطة عمل موحدة لتطبيق الوقاية المناعية الموجهة بـ Anti-D IG، وكذلك تقديم الوقاية الرّوتينيّة RAAPD في حالات الحمل بأجنّة إيجابية RHD لدى الأمهات غير المحسسات فقط.
- استخدام ccffDNA لتحديد جنس الجنين في مراحل عمرية مختلفة من الحمل هو بديل مثالي لطرائق التشخيص قبل الولادة الباضعة Invasive Prenatal Diagnosis IPD. كبزل السلي والزّغابات المشيمية خاصة في تدبير الامراض الوراثية المرتبطة بالصبغي X

مقترحات لأبحاث مستقبلية:

- ✓ إجراء المزيد من الدراسات المحلية التي تهدف للتنميط المورثي الجنيني RHD على أعداد أكبر من المرضى، وذلك باستخدام أزواج مختلفة من المشرعات النوعية للجين RHD.
- ✓ توظيف ccffDNA في مجال التشخيص ماقبل الولادة غير الباضع NIPD لبعض الاضطرابات الحملية الشائعة مثل حالات ما قبل الارتعاج.
- ✓ تحديد النمط الوراثي RHD للزوج، وتحديد كونه متغاير الألائل أو متماثل الألائل.

الباب السابع

المراجع

1. Achargui, S., Tijane, M., & Benchemsi, N. (2011). Fetal RHD genotyping by PCR using plasma from D negative pregnant women. *Transfus Clin Biol, 18*(1), 13-19. doi: 10.1016/j.tracli.2010.10.002

2. Akolekar, R. F., K .Kuppusamy, R.Daniels, G.Nicolaides, K. (2011). Fetal RHD genotyping in maternal plasma at 11–13 weeks of gestation. *Fetal diagnosis and therapy, 29*(4), 301-306.

3. Al-Dughaishi, T., Al Harrasi, Y., Al-Duhli, M., Al-Rubkhi, I., Al-Riyami, N., Al Riyami, A., et al. (2016). Red Cell Alloimmunization to Rhesus Antigen Among Pregnant Women Attending a Tertiary Care Hospital in Oman. *Oman Med J, 31*(1), 77-80. doi: 10.5001/omj.2016.15

4. Al-Ibrahim, N. A., A. (2008). Red blood cell alloimmunization among Saudi pregnant women in the central province of Saudi Arabia. *Kuwait Medical Journal, 40*, 116-123.

5. Alberry, M. M., D.Jones, M.Abdel Hadi, M.Abdel-Fattah, S.Avent, N.Soothill, PW. (2007). Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis, 27*(5), 415-418.

6. Alfirevic, Z., Navaratnam, K., & Mujezinovic, F. (2017). Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(9).

7. Ali.T. (2008). Fequency of ABO Bloodgroups and other blood systems in syria

8. Altuntas, N., Yenicesu, I., Himmetoglu, O., Kulali, F., Kazanci, E., Unal, S., et al. (2013). The risk assessment study for hemolytic disease of the fetus and newborn in a University Hospital in Turkey. *Transfus Apher Sci, 48*(3), 377-380. doi: 10.1016/j.transci.2013.04.021

9. Angert, R., M, LeShane, E., S., Lo, Y., D, Chan, L., Y , Delli-Bovi, L., C., & Bianchi, D., W. (2003). Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first-and third-trimester samples. *Clinical chemistry, 49*(1), 195-198.

10. Aubin, J. T., Le Van Kim, C., Mouro, I., Colin, Y., Bignozzi, C., Brossard, Y., et al. (1997). Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *British Journal of Haematology, 98*(2), 356-364.

11. Avent, N. D. (2008). RHD genotyping from maternal plasma: guidelines and technical challenges. *Methods Mol Biol, 444*, 185-201. doi: 10.1007/978-1-59745-066-9_14

12. Avent, N. D., & Martin, P. G. A.-F., S. S. (1997). Evidence of genetic diversity underlying Rh D-, weak D (Du), and partial D phenotypes as determined by multiplex polymerase chain reaction analysis of the RHD gene. *Blood, 89*(7), 2568-2577.

13. Azuonwu, O. (2017). Consequences of Haemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN) and the Clinical Significance of Antibody Screening in Prenatal Diagnosis: A Study of Multigravidal and Primigravidal Women in Port Harcourt, Niger Delta. *Journal of Clinical and Laboratory Medicine, 1*. doi: 10.16966/2572-9578.106

14. Basu, S., Kaur, R., & Kaur, G. (2011). Hemolytic disease of the fetus and newborn: Current trends and perspectives. *Asian J Transfus Sci, 5*(1), 3-7. doi: 10.4103/0973-6247.75963

15. Bennardello, F., Coluzzi, S., Curciarello, G., Todros, T., & Villa, S. (2015). Recommendations for the prevention and treatment of haemolytic disease of the foetus and newborn. *Blood Transfusion, 13*(1), 109.

16. Bennett, P. R. L. V. K., C.Colin, Y.Warwick, R. M.Cherif-Zahar, B.Fisk, N. M.Cartron, J. P. (1993). Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med, 329*(9), 607-610. doi: 10.1056/NEJM199308263290903

17. Bianchi, D. W. (1999). Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol, 105*(3), 574-583.

18. Bianchi, D. W. (2004). Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta, 25 Suppl A*, S93-S101. doi: 10.1016/j.placenta.2004.01.005

19. Bischoff, F. Z. N., Dianne D, & Marquéz-Do, D. M. J., Kenneth J Simpson, Joe Leigh Elias, Sherman. (1999). Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation, 6*(2), 64-69.

20. Blanco, S., Giacomi, V. S., L Gabriel,, F María, C., Carrizo, L., Fanin, G., & Culasso, J. G., Sandra V. (2018). Usefulness of Non-Invasive Fetal RHD Genotyping towards Immunoprophylaxis Optimization. *Transfusion Medicine and Hemotherapy, 45*(6), 423-428. doi: 10.1159/000490156

21. Bondagji, N. S. (2011). Rhesus alloimmunization in pregnancy. A tertiary care center experience in the Western region of Saudi Arabia. *Saudi Med J, 32*(10), 1039-1045.

22. Bowman, J. M. P., J. M.Penston, L. E. (1986). Fetomaternal transplacental hemorrhage during pregnancy and after delivery. *Vox Sang, 51*(2), 117-121. doi: 10.1111/j.1423-0410.1986.tb00226.x

23. Brennand, J. (2009). Middle cerebral artery Doppler. *Australas J Ultrasound Med, 12*(3), 35-38. doi: 10.1002/j.2205-0140.2009.tb00058.x

24. Breveglieri, G. D. A., E. Finotti, A. Borgatti, M. (2019). Non-invasive Prenatal Testing Using Fetal DNA. *23*(2), 291-299. doi: 10.1007/s40291-019-00385-2

25. Bullock, R. M., W. L.Coomarasamy, A.Kilby, M. D. (2005). Prediction of fetal anemia in pregnancies with red-cell alloimmunization: comparison of middle cerebral artery peak systolic velocity and amniotic fluid OD450. *Ultrasound Obstet Gynecol, 25*(4), 331-334. doi: 10.1002/uog.1886

26. Bustamante-A, A. G.-G., C. de Alba, M. R.Ainse, E. Ramos, C. (2010). Noninvasive prenatal diagnosis using ccffDNA in maternal blood: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn, 10*(2), 197-205. doi: 10.1586/erm.09.86

27. C, B., G, D., D, P., MG, C., Bellini T, LA, R., et al. (2015). Etiology of non-immune hydrops fetalis: An update. *Am J Med Genet, 167A*(Part A), 1082-1088.

28. Canick, J., A. Palomaki, G, E. Kloza, E, M. Lambert-Messerlian, G, M. Haddow, J, E. (2013). The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn, 33*(7), 667-674.

29. Cardo, L., García, B., & Alvarez, F. (2010). Non-invasive fetal RHD genotyping in the first trimester of pregnancy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 48*(8), 1121-1126.

30. Castleman, J. S., Kilby, Mark D. (2020). Red cell alloimmunization: a 2020 update. *Prenat Diagn*.

31. Chan, F. Y., Cowley, N. M., Wolter, L., Stone, M., Carmody, F., Saul, A., et al. (2001). Prenatal RHD gene determination and dosage analysis by PCR: clinical evaluation. *Prenat Diagn, 21*(4), 321-326. doi: 10.1002/pd.60

32. Chan, K. C., Yeung, S. W., Lui, W. B., Rainer, T. H., & Lo, Y. M. (2005). Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem, 51*(4), 781-784. doi: 10.1373/clinchem.2004.046219

33. Chan, K. C., Zhang, J., Hui, A. B., Wong, N., Lau, T. K., Leung, T. N., et al. (2004). Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem, 50*(1), 88-92. doi: 10.1373/clinchem.2003.024893

34. Chilcott, J., Jones, M. L., Wight, J., Forman, K., Wray, J., Beverley, C., et al. (2003). A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of routine anti-D prophylaxis for pregnant women who are rhesus-negative *NIHR Health Technology Assessment programme: Executive Summaries*: NIHR Journals Library.

35. Chim, S. S., Tong, Y. K., Chiu, R. W., Lau, T. K., Leung, T. N., Chan, L. Y., et al. (2005). Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 102*(41), 14753-14758.

36. Chitty, L. S. C., P. Wolffenbuttel, K P .Aigrain, Y. (2012). Prenatal management of disorders of sex development. *Journal of pediatric urology, 8*(6), 576-584.

37. Clausen, F., Christiansen, M., Steffensen, R., Jørgensen, S., Nielsen, C., Jakobsen, M., A ., et al. (2012). Report of the first nationally implemented clinical routine screening for fetal RHD in D- pregnant women to ascertain the requirement for antenatal RhD prophylaxis. *Transfusion, 52*(4), 752-758.

38. Clausen, F. B. (2018). Lessons learned from the implementation of non-invasive fetal RHD screening. *Expert Rev Mol Diagn, 18*(5), 423-431. doi: 10.1080/14737159.2018.1461562

39. Clausen, F. B. (2020). Cell-free fetal DNA and fetal blood group genotyping: non-invasive prenatal testing. *ISBT Science Series, 15*(1), 46-51.

40. Collins, E. M. (2001). *Anathema*: Book Guild.

41. Colmant, C. M.-S., M. Fuchs, F. Fernandez, H.Senat, M. V. (2013). Non-invasive prenatal testing for fetal sex determination: is ultrasound still relevant? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 171*(2), 197-204. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.09.005

42. Daniels, G. (2005). The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transplant immunology, 14*(3-4), 143-153.

43. Daniels, G., & Bromilow, I. (2014). *Essential guide to blood groups*: Wiley Online Library.

44. Daniels, G., Finning, K., Martin, P., & Soothill, P. (2004). Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and

prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox sanguinis, 87*(4), 225-232.

45. De Haas, M., Thurik, F., Koelewijn, J., & Mvan der Schoot, C. E. (2015). Haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox sanguinis, 109*(2), 99-113.

46. De Haas, M., Thurik, F. F., Van Der Ploeg, C. P., Veldhuisen, B., Hirschberg, H., Soussan, A. A., et al. (2016). Sensitivity of fetal RHD screening for safe guidance of targeted anti-D immunoglobulin prophylaxis: prospective cohort study of a nationwide programme in the Netherlands. *Bmj, 355*, i5789.

47. De Jong, A. D., W.J. de Die-Smulders, Ch.Frints, S. GM. De Wert, G. (2010). Non-invasive prenatal testing: ethical issues explored. *European Journal of Human Genetics, 18*(3), 272-277.

48. Dean, L. (2005). *Blood groups and red cell antigens* (Vol. 2): NCBI Bethesda, Md, USA.

49. Delaney, M. (2018). Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn (HDFN). *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*, 427.

50. Dhallan, R., Au, W. C., Mattagajasingh, S., Emche, S., Bayliss, P., Damewood, M., et al. (2004). Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA, 291*(9), 1114-1119. doi: 10.1001/jama.291.9.1114

51. Doescher, A. M., Th (2015). Noninvasive prenatal blood group genotyping *Molecular Typing of Blood Cell Antigens* (pp. 135-147): Springer.

52. Dovč-Drnovšek, T., Klemenc, P., Toplak, N., Blejec, T., Bricl, I., & Rožman, P. (2013). Reliable determination of fetal RhD status by RHD genotyping from maternal plasma. *Transfusion Medicine and Hemotherapy, 40*(1), 37-43.

53. Drury, S. H., M.Chitty, LS. (2016). Cell-free fetal DNA testing for prenatal diagnosis *Advances in clinical chemistry* (Vol. 76, pp. 1-35): Elsevier.

54. El Din, S. N., ARamy, A. R., & Ali, M. S. (2011). Correlation between the RhD genotyping and RhD serotyping in isoimmunized pregnancies. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 12*(2), 127-133.

55. Emanuel, S. L. P., S. (1993). Amplification of specific gene products from human serum. *Genet Anal Tech Appl, 10*(6), 144-146. doi: 10.1016/1050-3862(93)90009-8

56. Esan, A. (2016). Hemolytic Disorders of the Newborn, Current Meth-ods of Diagnosis and Treatment: A Review Study. *J Hematol Blood Transfus Disord, 3*(008).

57. Everett, T. C., LS. (2015). Cell-free fetal DNA: the new tool in fetal medicine. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 45*(5), 499.

58. Faas, B., Beuling, E., Christiaens, G. M., & von dem Borne, A. K. (1998). Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *The Lancet, 352*(9135), 1196.

59. Finning, K., Martin, P., & Daniels, G. (2004). A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1022*(1), 119-123.

60. Finning, K., Martin, P., & Daniels, G. (2009). The use of maternal plasma for prenatal RhD blood group genotyping *DNA and RNA Profiling in Human Blood* (pp. 143-157): Springer.

61. Finning, K., Martin, P., Soothill, P., & Avent, N. (2002). Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion, 42*(8), 1079-1085.

62. Fisk, N. M., Bennett, P., Warwick, R. M., Letsky, E. A., Welch, R., Vaughan, J. I., et al. (1994). Clinical utility of fetal RhD typing in alloimmunized pregnancies by means of polymerase chain reaction on amniocytes or chorionic villi. *American Journal of Obstetrics and Gynecology, 171*(1), 50-54.

63. Flegel, W. A. (2007). The genetics of the Rhesus blood group system. *Blood Transfus, 5*(2), 50-57. doi: 10.2450/2007.0011-07

64. Flegel, W. A. (2011). Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci, 44*(1), 81-91. doi: 10.1016/j.transci.2010.12.013

65. Gray, K. J. W.-H., L. E. (2018). Have we done our last amniocentesis? Updates on cell-free DNA for Down syndrome screening. *Pediatr Radiol, 48*(4), 461-470. doi: 10.1007/s00247-017-3958-y

66. gregory. (2013). Rhesus and Other Fetomaternal Incompatibilities. doi: 10.1016/B978-0-12-383834-6.00078-1

67. Guibert, J. B., A.Grebille, A-G..Ernault, P.Zorn, J-R.Costa, J-M. (2003). Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early

pregnancy after assisted reproductive technique. *Human reproduction, 18*(8), 1733-1736.

68. Hahn, S., Huppertz, B., & Holzgreve, W. (2005). Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation? *Placenta, 26*(7), 515-526. doi: 10.1016/j.placenta.2004.10.017

69. Haimila, K., Sulin, K., Kuosmanen, M., Sareneva, I., Korhonen, A., Natunen, S., et al. (2017). Targeted antenatal anti-D prophylaxis program for RhD-negative pregnant women–outcome of the first two years of a national program in Finland. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica, 96*(10), 1228-1233.

70. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, & K, O. (2011). Successful Diagnosis of Fetal Gender Using Conventional PCR Analysis of Maternal Serum. *Clinical chemistry, 47:1*, 41-46

71. Honda, H., Miharu, N., Ohashi, Y., Samura, O., Kinutani, M., Hara, T., et al. (2002). Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Human genetics, 110*(1), 75-79.

72. Hromadnikova, I., Vechetova, L., Vesela, K., Benesova, B., Doucha, J., Kulovany, E., et al. (2005). Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther, 20*(4), 275-280. doi: 10.1159/000085085

73. Illanes, S., & Soothill, P. (2009). Noninvasive approach for the management of hemolytic disease of the fetus. *Expert Rev Hematol, 2*(5), 577-582. doi: 10.1586/ehm.09.45

74. Illanes, S. S., P. (2010). Management of red cell alloimmunisation in pregnancy: the non-invasive monitoring of the disease. *Prenat Diagn, 30*(7), 668-673. doi: 10.1002/pd.2551

75. Isakhani, S. B., A. (2016). Early Non-invasive Determination of Fetal Sex Using Cell-free DNA. *Journal of Cell and Molecular Research, 8*(2), 78-82.

76. Ivanov, M. B., A Butler, T Spellman, P Mileyko, V. (2015). Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation. *BMC genomics, 16*(13), 1-12.

77. Izetbegovic, S. (2013). Occurrence of ABO and RhD incompatibility with Rh negative mothers. *Materia socio-medica, 25*(4), 255.

78. Knowles, S., & Regan, F. (2006). 19 Blood cell antigens and antibodies: erythrocytes, platelets, and granulocytes. *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 481.

79. Koelewijn, J. M., De Haas, M., Vrijkotte, T. G., Bonsel, G. J., & Van Der Schoot, C. E. (2008). One single dose of 200 μg of antenatal RhIG halves the risk of anti-D immunization and hemolytic disease of the fetus and newborn in the next pregnancy. *Transfusion, 48*(8), 1721-1729.

80. Kolialexi, A., Tounta, G., & Mavrou, A. (2010). Noninvasive fetal RhD genotyping from maternal blood. *Expert Rev Mol Diagn, 10*(3), 285-296.

81. Kumar, S., & Regan, F. (2005). Management of pregnancies with RhD alloimmunisation. *Bmj, 330*(7502), 1255-1258. doi: 10.1136/bmj.330.7502.1255

82. Landsteiner, K., & Wiener, A. S. (1940). An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 43*(1), 223-223.

83. Legler, T. J. M., S. P. Haverkamp, A .Grill, S. Hahn, S. (2009). Prenatal RhD Testing: A Review of Studies Published from 2006 to 2008. *Transfus Med Hemother, 36*(3), 189-198. doi: 10.1159/000216580

84. Leon, S., Shapiro, B., Sklaroff, D., & Yaros, M. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research, 37*(3), 646-650.

85. Lighten, A. D., Overton, T. G., Sepulveda, W., Warwick, R. M., Fisk, N. M., & Bennett, P. R. (1995). Accuracy of prenatal determination of RhD type status by polymerase chain reaction with amniotic cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology, 173*(4), 1182-1185. doi: https://doi.org/10.1016/0002-9378(95)91349-1

86. Liley, A. W. (1961). Liquor amnil analysis in the management of the pregnancy complicated by resus sensitization. *Am J Obstet Gynecol, 82*, 1359-1370. doi: 10.1016/s0002-9378(16)36265-2

87. Liumbruno, G. M. A., AngeloRea, Federica Piccinini, VanessaCatalano, Liviana Calizzani, Gabriele Pupella, Simonetta Grazzini, Giuliano. (2010). The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation. *Blood Transfus, 8*(1), 8-16. doi: 10.2450/2009.0108-09

88. Lo, Y. D., Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., Poon, P. M., et al. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications

for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics, 62*(4), 768-775.

89. Lo, Y. M., Chan, K. C., Sun, H., Chen, E. Z., Jiang, P., Lun, F. M., et al. (2010). Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med, 2*(61), 61ra91. doi: 10.1126/scitranslmed.3001720

90. Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., et al. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet, 350*(9076), 485-487. doi: 10.1016/s0140-6736(97)02174-0

91. Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M., & Hjelm, N. M. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet, 64*(1), 218-224. doi: 10.1086/302205

92. Londero, D. S., T.Bolzicco, D.Castro Silva, E.Candolini, M.Cortivo, C.Dreossi, C.Fantasia, I.Pecile, V.De Angelis, V. (2019). Fetal RHD detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma: validation of a diagnostic kit using automatic extraction and frozen DNA *Transfus Med, 29*(6), 408-414. doi: 10.1111/tme.12605

93. Lun, F. M., Chiu, R. W., Chan, K. C., Leung, T. Y., Lau, T. K., & Lo, Y. M. (2008). Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem, 54*(10), 1664-1672. doi: 10.1373/clinchem.2008.111385

94. Machado, I. C., L. Pellegrino Jr, J.Barini, R. (2006). Fetal RHD genotyping from maternal plasma in a population with a highly diverse ethnic background. *Revista da Associação Médica Brasileira, 52*, 232-235.

95. Mackie, F., Hemming, K., Allen, S., Morris, R. K., & Kilby, M. (2017). The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 124*(1), 32-46.

96. Mandel, P. M., P. (1948). Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil, 142*(3-4), 241-243.

97. Mari, G. (2005). Middle cerebral artery peak systolic velocity for the diagnosis of fetal anemia: the untold story. *Ultrasound Obstet Gynecol, 25*(4), 323-330. doi: 10.1002/uog.1882

98. Mari, G., Deter, R. L., Carpenter, R. L., Rahman, F., Zimmerman, R., Moise Jr, K. J., et al. (2000). Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. *New England Journal of Medicine, 342*(1), 9-14.

99. Mari, G., Hanif, F., Kruger, M., Cosmi, E., Santolaya-Forgas, J., & Treadwell, M. C. (2007). Middle cerebral artery peak systolic velocity: a new Doppler parameter in the assessment of growth-restricted fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol, 29*(3), 310-316. doi: 10.1002/uog.3953

100. Mari, G., Norton, M. E., Stone, J., Berghella, V., Sciscione, A. C., Tate, D., et al. (2015). Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM) Clinical Guideline #8: the fetus at risk for anemia--diagnosis and management. *Am J Obstet Gynecol, 212*(6), 697-710. doi: 10.1016/j.ajog.2015.01.059

101. McBain, R. D., Caroline AMiddleton, Philippa. (2015). Anti-D administration in pregnancy for preventing Rhesus alloimmunisation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(9).

102. McEwan, A. (2018). Red cell alloimmunization. *The Obstetric Hematology Manual*, 73.

103. Moezzi, L., Keshavarz, Z., Ranjbaran, R., Aboualizadeh, F., Behzad-Behbahani, A., Abdullahi, M., et al. (2016). Fetal RHD Genotyping Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Cell-Free Fetal DNA in Pregnancy of RhD Negative Women in South of Iran. *Int J Fertil Steril, 10*(1), 62-70.

104. Moise Jr, K. J. (2005). *Red blood cell alloimmunization in pregnancy.* Paper presented at the Seminars in hematology.

105. Moise, K. J. (2008). Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology, 112*(1), 164-176.

106. Moise, K. J., Jr., & Argoti, P. S. (2012). Management and prevention of red cell alloimmunization in pregnancy: a systematic review. *Obstet Gynecol, 120*(5), 1132-1139. doi: http://10.1097/AOG.0b013e31826d7dc1

107. Mujezinovic, F. A., Z. (2007). Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstetrics & Gynecology, 110*(3), 687-694.

108. Nardozza, L. M. M., Szulman, A., Barreto, J. A., Araujo Junior, E., & Moron, A. F. (2010b). The molecular basis of RH system and its applications in obstetrics and transfusion medicine. *Revista da Associação Médica Brasileira, 56*(6), 724-728.

109. Nelson, M. E., C Langshaw, M Popp, H Kronenberg, H. (2001). Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma. *Vox sanguinis, 80*(2), 112-116.

110. Neufeld-Kaiser, W. A. C., Edith Y.Liu, Yajuan J. (2015). Positive predictive value of non-invasive prenatal screening for fetal chromosome disorders using cell-free DNA in maternal serum: independent clinical experience of a tertiary referral center. *BMC medicine, 13*(1), 129.

111. Nicolaides, K. H. R., C. H. (1992). Maternal serum anti-D antibody concentration and assessment of rhesus isoimmunisation. *Bmj, 304*(6835), 1155-1156. doi: 10.1136/bmj.304.6835.1155

112. Nwogu, L. C. M. J., Kenneth J Tint, Hlaing Castillo, Brian Bai, Yu Klein, Kimberly L. (2018). Successful management of severe red blood cell alloimmunization in pregnancy with a combination of therapeutic plasma exchange, intravenous immune globulin, and intrauterine transfusion. *Transfusion, 58*(3), 677-684.

113. Obstetricians, A. C. o., & Gynecologists. (2018). ACOG practice bulletin no. 192: management of alloimmunization during pregnancy. *Obstet Gynecol, 131*(3), e82-e90.

114. Oleiwi, A. (2010). Using PCR Technician in Prenatal Diagnosis of Fetal Gender. . *Journal of Biotechnology Research Center., 4*, 84-90.

115. Oliveira, J. O., N Rocha, J Cruz, B Figueiredo, J Caseiro, A Valado, A Gabriel, A Mendes, F. (2012). Fetal RHD and RHCE genotyping in plasma of Rh negative pregnant women. *IFBLS, 1*(2), 50-58.

116. Pal, M., & Williams, B. (2015). Prevalence of maternal red cell alloimmunisation: a population study from Queensland, Australia. *Pathology, 47*(2), 151-155.

117. Papantoniou, N. S., Stavros Antsaklis, Aris. (2013). Therapeutic management of fetal anemia: review of standard practice and alternative treatment options. *Journal of perinatal medicine, 41*(1), 71-82.

118. Papasavva, T. M., P. Legler, T. J. Liasides, M. (2016). Prevalence of RhD status and clinical application of non-invasive prenatal determination of fetal RHD in maternal plasma: a 5 year experience in Cyprus. *BMC Res Notes, 9*, 198. doi: 10.1186/s13104-016-2002-x

119. Pilu, G., & Nicolaides, K. H. (1999). *Diagnosis of fetal abnormalities: The 18-23-week scan*: Taylor & Francis.

120. Pös, O., Biró, O., Szemes, T., & Nagy, B. (2018). Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *European Journal of Human Genetics, 26*(7), 937-945.

121. Qureshi, H., Massey, E., Kirwan, D., Davies, T., Robson, S., White, J., et al. (2014). BCSH guideline for the use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Transfus Med, 24*(1), 8-20.

122. Rijnders, R. J. V. D. L., R. B. Peters, E. D. Goeree, J. K. Van Der Schoot, C.Ploos Van Amstel, J. K. E.Christiaens, G. C. (2003). Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat Diagn, 23*(13), 1042-1044. doi: 10.1002/pd.750

123. Rossiter, J. P., Blakemore, K. J., Kickler, T. S., Kasch, L. M., Khouzami, A. N., Pressman, E. K., et al. (1994). The use of polymerase chain reaction to determine fetal RhD status. *Am J Obstet Gynecol, 171*(4), 1047-1051. doi: 10.1016/0002-9378(94)90032-9

124. Sayres, L. C. A., M. Norton, M. E.Cho, M. K. (2011). Cell-free fetal DNA testing: a pilot study of obstetric healthcare provider attitudes toward clinical implementation. *Prenat Diagn, 31*(11), 1070-1076. doi: 10.1002/pd.2835

125. Scheffer, P. G. d. H., M. van der Schoot, C. E. (2011). The controversy about controls for fetal blood group genotyping by cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Curr Opin Hematol, 18*(6), 467-473. doi: 10.1097/MOH.0b013e32834bab2d

126. Scott, F., & Chan, F. Y. (1998). Assessment of the clinical usefulness of the 'Queenan' chart versus the 'Liley' chart in predicting severity of rhesus iso-immunization. *Prenat Diagn, 18*(11), 1143-1148.

127. Scott, F. P., Menezes, M., Palma-Dias, R., Nisbet, D., Schluter, P., da Silva Costa, F., et al. (2018). Factors affecting cell-free DNA fetal fraction and the

consequences for test accuracy. *J Matern Fetal Neonatal Med, 31*(14), 1865-1872. doi: 10.1080/14767058.2017.1330881

128. Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Matsuoka, R., Koide, K., Okazaki, S., Farina, A., et al. (2007). Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 33*(6), 747-764.

129. Sekizawa, A., Sugito, Y., wasaki, M., Watanabe, A., Jimbo, M., Hoshi, S., et al. (2001). Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clinical chemistry, 47*(12), 2164-2165.

130. Sifakis, S. K., Z.Spandidos, D. A. (2015). Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications (review). *Mol Med Rep, 11*(4), 2367-2372. doi: 10.3892/mmr.2014.3118

131. Sillence, K. (2016). Cell-free fetal DNA (cffDNA) enrichment for non-invasive prenatal testing (NIPT): a comparison of molecular techniques.

132. Singleton, B. K. G., Carole A Avent, Neil D Martin, Peter G Smart, Elizabeth Daka, Abigail Narter-Olaga, Edwin G Hawthorne, Linda M Daniels, Geoff. (2000). The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 95*(1), 12-18.

133. Siva, S. J., S Mccracken, Sh Morris, J M. (2003). Evaluation of the clinical usefulness of isolation of fetal DNA from the maternal circulation. *Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology, 43*(1), 10-15.

134. Song, Y., Huang, S., Qi, Q., Bian, X., Zhou, X., Jiang, Y., et al. (2015). Non-invasive prenatal testing for fetal aneuploidies in the first trimester of pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology, 45*(1), 55-60.

135. Soothill, P., Nicolaides, K., Rodeck, C., Clewell, W., & Lindridge, J. (1987). Relationship of fetal hemoglobin and oxygen content to lactate concentration in Rh isoimmunized pregnancies. *Obstet Gynecol, 69*(2), 268-271.

136. Sparks, A. B. S., Craig A.Song, Ken. Oliphant, Arnold. (2012). Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *American Journal of Obstetrics and Gynecology, 206*(4), 319. e311-319. e319.

137. Stanghellini, I. B., R.Capone, L.Mazza, V.Neri, C.Percesepe, A.Forabosco, A. (2006). Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe. *Molecular human reproduction, 12*(9), 587-591.

138. Swarup, V., Rajeswari, MR. (2007). Circulating (cell-free) nucleic acids–a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS letters, 581*(5), 795-799.

139. Tan, E., Schur, P., Carr, R., & Kunkel, H. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation, 45*(11), 1732-1740.

140. Tardy-Guidollet, V., Menassa, R., Costa, J.-M., David, M., Bouvattier-Morel, C., Baumann, C., et al. (2014). New management strategy of pregnancies at risk of congenital adrenal hyperplasia using fetal sex determination in maternal serum: French cohort of 258 cases (2002–2011). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 99*(4), 1180-1188.

141. Thurik, F. F., Ait Soussan, A., Bossers, B., Woortmeijer, H., Veldhuisen, B., Page-Christiaens, G. C., et al. (2015). Analysis of false-positive results of fetal RHD typing in a national screening program reveals vanishing twins as potential cause for discrepancy. *Prenat Diagn, 35*(8), 754-760. doi: 10.1002/pd.4600

142. Tiblad, E., Westgren, M., Pasupathy, D., Karlsson, A., & Wikman, A. T. (2013). Consequences of being Rhesus D immunized during pregnancy and how to optimize new prevention strategies. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica, 92*(9), 1079-1085.

143. Tungwiwat, W. F., G. Ratanasiri, Th .Sanchaisuriya, K. Fucharoen, S. (2003). Non-Invasive fetal sex determination using a conventional nested PCR analysis of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chim Acta, 334*, 173-177. doi: 10.1016/S0009-8981(03)00224-9

144. Urbaniak, S. J. G., M. A. (2000). RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev, 14*(1), 44-61. doi: 10.1054/blre.1999.0123

145. Van den Veyver, I. B. M. J., K J. (1996). Fetal RhD typing by polymerase chain reaction in pregnancies complicated by rhesus alloimmunization. *Obstetrics & Gynecology, 88*(6), 1061-1067.

146. Van der Schoot, C. E. S., A.A. Koelewijn, J. Bonsel, G. Paget-Christiaens, L. G. de Haas, M. (2006). Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol, 13*(1-2), 53-57. doi: 10.1016/j.tracli.2006.02.021

147. Vlková, B., Szemes, T., Minárik, G., Turna, J., & Celec, P. (2010). Advances in the research of fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal diagnostics. *Med Sci Monit, 16*(4), Ra85-91.

148. Wagner, F. F., Moulds, Joann M ,Flegel, Willy A. (2005). Genetic mechanisms of Rhesus box variation. *Transfusion, 45*(3), 338-344.

149. Wang, E., Batey, A., Struble, C., Musci, T., Song, K., & Oliphant, A. (2013). Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn, 33*(7), 662-666.

150. Wang, X. D., Wang, B. L., Ye, S. L., Liao, Y. Q., Wang, L. F., & He, Z. M. (2009). Non-invasive foetal RHD genotyping via real-time PCR of foetal DNA from Chinese RhD-negative maternal plasma. *Eur J Clin Invest, 39*(7), 607-617. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02148.x

151. Wataganara, T., Chen, A. Y., LeShane, E. S., Sullivan, L. M., Borgatta, L., Bianchi, D. W., et al. (2005). Changes of cell-free fetal DNA in maternal plasma after elective termination of pregnancy. *Clinical chemistry, 51*(1), 217-219.

152. Wataganara, T., Metzenbauer, M., Peter, I., Johnson, K. L., & Bianchi, D. W. (2005). Placental volume, as measured by 3-dimensional sonography and levels of maternal plasma cell-free fetal DNA. *American Journal of Obstetrics and Gynecology, 193*(2), 496-500.

153. Westhoff, C. M. (2007). *The structure and function of the Rh antigen complex.* Paper presented at the Seminars in hematology.

154. Wright, C. F. B., H. (2008). The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human reproduction update, 15*(1), 139-151. doi: 10.1093/humupd/dmn047

155. Yang, H. L., Alexis Walker, Ruth Harden, Melissa Saad, Sara T. O. (2019). High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine, 17*(1), 37.

156. Yatsenko, S. A., & Witchel, S. F. (2017). Genetic approach to ambiguous genitalia and disorders of sex development: What clinicians need to know. *Semin Perinatol, 41*(4), 232-243. doi: 10.1053/j.semperi.2017.03.016

157. Yu, S. L., Sh. Jiang, P.Leung, T. N .Chan, K Allen Chiu, R. Lo, Y D. (2013). High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clinical chemistry, 59*(8), 1228-1237.

158. Zhong, X., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2002). Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Molecular human reproduction, 8*(9), 864-870.

159. Zhong, X., Laivuori, H., Livingston, J. C., Ylikorkala, O., Sibai, B. M., Holzgreve, W., et al. (2001). Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology, 184*(3), 414-419.

160. Zhou, Y., Zhu, Z., Gao, Y., Yuan, Y., Guo, Y., Zhou, L., et al. (2015). Effects of Maternal and Fetal Characteristics on Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma. *Reprod Sci, 22*(11), 1429-1435. doi: 10.1177/1933719115584445

161 - د. ايمن ناصر ،د. تهاني العلي ، فائدة تقدير جرعة الغاما غلوبولين ANTI-D وذلك بناء على كمية النزف الجنيني الوالدي لدى الحوامل سلبيات ال RHD, بحث علمي اعد لنيل شهادة الدراسات العليا في الطب المخبري، جامعة دمشق 2007

162- د.نوار الأزون ،أ.د تهاني العلي ، تقييم فائدة فحوص دم الحبل السري في التشخيص المبكر للداء الانحلالي الناتج عن أسباب مناعية عند حديثي الولادة - بحث علمي أعد لنيل درجة الماجستير في الطب المخبري2019

الملحق (1) صورة الاستبيان

الرقم المتسلسل	رقم الاضبارة	العنوان/رقم الهاتف
الاسم الثلاثي		
العمر		
عمر الحمل (أسبوع)		
ترتيب الحمل		
عددالحمول	عدد الاسقاطات	
سبب مراجعة المستشفى		
قصة نقل دم سابق		
الوقاية بـANTI-D السابقة \الجرعة		
سير الحمل الحالي	نزف تداخل طبي رض	
قصة الولادات والحمول السابقة		نوع الولادات قيصرية طبيعية
المراقبة السريرية		
MCV-PSV		
الضغط الشرياني		
الموجودات الصدوية		
التحاليل المخبرية الام		
الزمرة الدموية للأم ABO RHD Du		ALT AST
كشف الأضداد اللانظامية:	عيار اضداد Anti-D:	
زمرة الزوج ABO	RHD	

(2) الموافقة المستنيرة للمرضى المشاركين في البحث

"تحديد النمط المورثي لعامل الريزوس RHD الجنيني لدى الحوامل سلبية RHD بطريقة غير باضعة باستخدام DNA الجنيني الحر الجائل في البلاسما الوالدية"

انا الطبيبة أحلام حميد طالبة الدكتوراه في اختصاص الكيمياء الحيوية الطبية والبيولوجيا الجزيئية في كلية الطب البشري جامعة دمشق، أنفذ هذا البحث الذي يهدف إلى:

- استخلاص CcffDNA من الدم المحيطي للام
- مقارنة نتائج تنميط RHD الجنيني باستخدام ccffDNA مع النمط الظاهري RhD وذلك بعد الولادة.

ويتضمن هذا البحث الحصول على عينة دموية من الام سلبية RHD لدى مراجعتها لمستشفى التوليد الجامعي.

إن موافقتكم على الاشتراك في بحثنا هذا يعني تزويدنا بالمعلومات المتعلقة بمرضكم لملء استبيان خاص بالبحث، علما ان هذه المعلومات ضرورية لمتابعة حالتكم الصحية، وأود ان اؤكد ان هذه المعلومات ستبقى سرية ولا يمكن لاحد الاطلاع عليها، كما سيتم ترميز المشاركين والمشاركات، كذلك أتعهد بعدم إجراء أي استقصاء غير ضروري لحالة المريض، وعدم اعطاء أي دواء تجريبي او تداخل دوائي او استقصائي من شأنه ان يؤذي المريض بقصد او بغير قصد.

كما أود أن اشير إلى ان المشارك لن يحصل على تعويضات او أي مقابل مادي، كما ان رفض المشاركة ليس له أي تبعات وسينال حقه من العناية الطبية اللازمة وعليه المشاركة ليست الزامية ولك الحرية الكاملة في اختيار المشاركة من عدمها ولك حق الانسحاب متى شئت

يملأ من قبل المشارك في البحث :اسم المشارك..... :

الموافقة على المشاركة:

لقد اطلعت وادركت محتوى الموافقة المستنيرة واوافق طوعا على ان اكون مشاركا في هذا البحث وادرك انني املك فرصة الاستفسار عن اي امر مع ضرورة الاجابة , كما واملك الحق في الانسحاب في اي وقت اشاء ودون ان يعرضني ذلك لاي ضرر وعليه اوقع:

دمشق في ..... الرقم المتسلسل للمشارك

التوقيع:

التاريخ:

ملاحظة : بالنسبة للأشخاص الذين لا يجيدون القراءة والكتابة تم شرح هدف البحث لهم واخذت موافقتهم الشفهية بحضور فرد من عائلته

الملحق (3) تأكيد تسلسل البادئات المستخدمة في تضخيم الجين *RHD*، *RHCE* باستخدام برنامج PRIMER -BLAST

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TAAGCAAAAGCATCCAA	17	48.54	35.29	2.00	0.00
Reverse primer	ATGGTGAGATTCTCCT	16	46.82	43.75	7.00	3.00

Products on target templates

>NM_001282871.2 Homo sapiens Rh blood group D antigen (RHD), transcript variant 7, mRNA

```
product length = 186
Forward primer  1     TAAGCAAAAGCATCCAA  17
Template        1307  .................  1323

Reverse primer  1     ATGGTGAGATTCTCCT  16
Template        1492  .................  1477
```

>NM_001282869.2 Homo sapiens Rh blood group D antigen (RHD), transcript variant 5, mRNA

```
product length = 186
Forward primer  1     TAAGCAAAAGCATCCAA  17
Template        1137  .................  1153

Reverse primer  1     ATGGTGAGATTCTCCT  16
Template        1322  .................  1307
```

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGTGTTGTAACCGAGT	16	49.01	43.75	4.00	2.00
Reverse primer	ACATGCCATTGCCG	14	50.24	57.14	5.00	2.00

Products on target templates

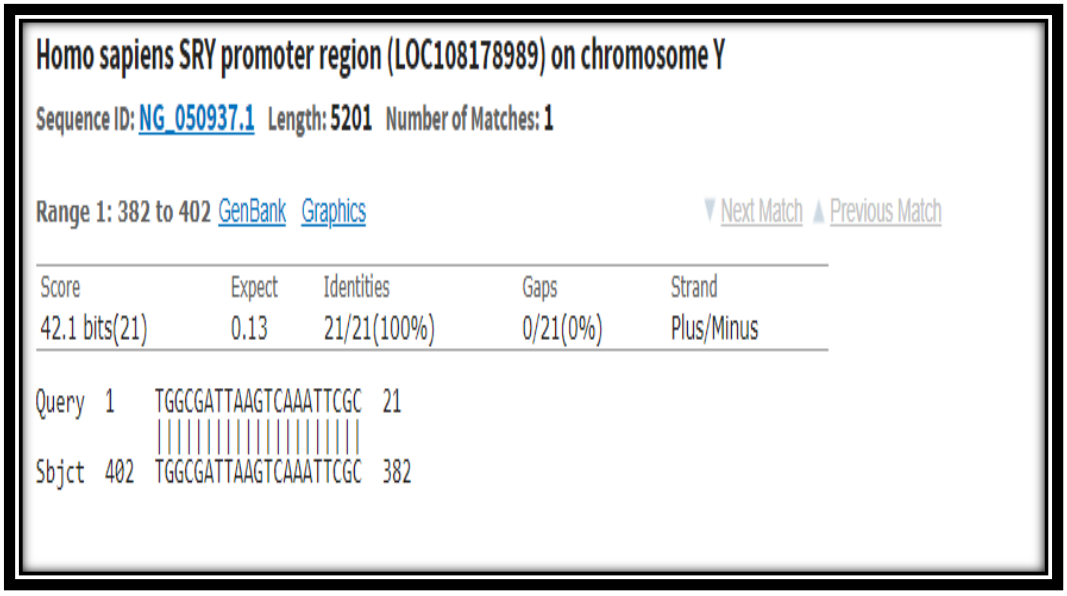
>NM_001330430.3 Homo sapiens Rh blood group CcEe antigens (RHCE), transcript variant 5, mRNA

```
product length = 135
Forward primer  1     TGTGTTGTAACCGAGT  16
Template        1069  ................  1084

Reverse primer  1     ACATGCCATTGCCG  14
Template        1203  ..............  1190
```

>NM_138617.4 Homo sapiens Rh blood group CcEe antigens (RHCE), transcript variant 4, mRNA

```
product length = 135
Forward primer  1    TGTGTTGTAACCGAGT  16
Template        754  ................  769

Reverse primer  1    ACATGCCATTGCCG  14
Template        888  ..............  875
```

الملحق (4) تأكيد تسلسل البادئات المستخدمة في تضخيم الجين *SRY* باستخدام برنامج– PRIMER BLAST



الأبحاث المنشورة

البحث الأول :

" تحديد جنس الجنين بواسطة الحمض النووي الجنيني الحر الجائل في الدم المحيطي للأم الحامل"

مجلة جامعة البعث، الرقم 708 تاريخ 2020/3/16

تم النشر في المجلد 42 لعام 2020

البحث الثاني:

"Noninvasive Fetal Rhesus D Genotype Determination by Using Circulating Cell-Free Fetal DNA (ccffDNA) in Peripheral Blood of Pregnant Women in Syria"

مجلة المجلس العربي للاختصاصات الطبية الرقم 2629 تاريخ 2020/7/7

ABSTRACT

"Non- Invasive Prenatal RHD Genotyping of RHD Negative Pregnant Women using Cell Free DNA from Maternal Plasma"

Background: Accurate prediction of fetal RHD genotype using cell-free fetal DNA from mother's blood is a great noninvasive progress in the diagnosis and treatment of Hemolytic Disease of Fetus and Newborn (HDFN), rather than invasive procedures such as amniocentesis, or chorionic villus sampling. This study aims to assess the concordance between RHD genotyping by conventional PCR using ccffDNA from mother's peripheral blood, and the newborn RHD phenotype.

Method: A prospective cohort study was carried out, on 60 RHD -negative pregnant women (23.4+6.29) ranging from 7– 38 weeks of pregnancy, who attended university Maternity hospital in Damascus, Syria. During the period from 1/2019 to10 /2019. Twin pregnancies were excluded. CcffDNA was extracted from peripheral blood of pregnant mothers by QIAamp DSP Virus Kit, and then polymerase chain reaction PCR was done at Hematopoietic Stem Cell Transplant LAB (H.C.S.T) at Pediatric Hospital, Damascus, to determine fetal RHD genotype by amplification of exon 7, and 10. In addition, SRY was used to determine fetal sex.

Results were compared with newborn RHD phenotype performed on neonate cord blood.

Results: 5/56 cases (7.3%) were correctly diagnosed as RHD negative fetuses, and 51/56 cases (92.7%) as RHD positive fetuses. 22/56 were male while 34 /56 were female .There were 15/56 RHD alloimmunized women and they were in different pregnancy trimesters

This study showed high concordance between the results of fetal RHD genotyping using ccffDNA, in all pregnancy trimesters, and newborns RHD phenotype.

Sex was also determined correctly in all participants, Sensitivity and specificity were both 100%, PPV, and NPV were 100%.

Conclusion: A non-invasive prenatal diagnosis of RHD is an appropriate alternative to an invasive prenatal (IPD) diagnosis, which will be a significant step in the clinical management of alloimmunized RHD women

Key words: cell-free fetal DNA, fetal genotyping, hemolytic disease of the fetus and newborn

Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Medicine
Department of Laboratory Medicine

Non- Invasive Prenatal RHD Genotyping of RHD Negative Pregnant Women using Cell- Free DNA from Maternal Plasma

A dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the (PhD) Degree in Medical Biochemistry and Molecular Biology

By

Ahlam Hameed

Supervisors

Dr.Tahani Ali **Dr. Rami Jarjour**

2020