الجمهورية
العربية
السورية

تنسيل مورثة عامل التخثر التاسع والتعبير عنها في خلايا الثدييات

دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية

ماجستير التقانات الحيوية

إعداد

أسامة محمد علي النجار

المشرف المشارك

أ.د. هدى القواص

أستاذ في قسم وقاية النبات

كلية الزراعة – جامعة دمشق

المشرف

أ.م.د مجد الجمالي

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة

كلية الصيدلة – جامعة دمشق

2023

فهرس المحتويات

العنوان	رقم الصفحة
فهرس الجداول	V
فهرس الأشكال	VI
جدول الاختصارات	VIII
الملخص باللغة العربية	X
الجزء التمهيدي (الإطار العام)	1
1- المقدمة	2
2- الإشكالية البحثية	3
3- تساؤلات البحث	4
4- فرضيات البحث	4
5- مسلمات البحث	4
6- أهداف البحث	5
7- أهمية البحث	5
8- مبررات البحث	5
9- حدود البحث	6
الجزء الأول (أدبيات البحث)	7
1- مفهوم تخثر الدم وآليه عمل شلال التخثر	8
1-1- الإرقاء الأولي (primary haemostasis)	9
1-2- الإرقاء الثانوي أو شلال التخثر	11
1-3- نظام المضاد لتشكل الخثرات (Anticoagulant System)	18
1-4- نظام الحال للفبرين (Fibrinolytic system)	20
2- عامل التخثر التاسع البشري	22
2-1- بنية بروتين عامل التخثر التاسع البشري	23
2-2- البنية الجزيئية لعامل التخثر التاسع البشري	24
3- الأمراض الناتجة عن خلل في مراحل تخثر الدم	28
3-1- اضطرابات في عملية التخثر بسبب عيوب في مرحلة الإرقاء الأولي	28
3-2- اضطرابات في عملية التخثر بسبب عيوب في مرحلة الإرقاء الثانوي	28
3-2-1- اضطرابات تؤدي إلى نزف الدم	29
3-2-2- أمراض تؤدي إلى تشكل الخثرات الدموية (Thrombotic Disorders)	31
3-3- اضطرابات في النزف بسبب عيوب في نظام حل الفبرين	32
4- مرض نزف الدم الوراثي (الناعور)	33
4-1- توزع وانتشار المرض	35
4-2- تشخيص مرض الناعور ب	36
4-3- طرق علاج الناعور ب	37

4-3-1- دراسات جديدة لتحديث عامل التخثر التاسع المؤشب	40
الجزء الثاني (منهج البحث وإجراءاته)	42
1- مواد البحث و طرائقه Material and Methods	43
1-1- مدة ومكان تنفيذ البحث Duration and Site of Research	43
1-2- المواد المستخدمة في البحث	43
1-3- الأجهزة	44
1-4- طرائق البحث Research Methods	44
1-4-1- الحصول على عينة مناسبة حاوية على المورثة	44
1-4-2- استخلاص ال RNA من خزعة الكبد	45
1-4-3- اصطناع الدنا المتمم Complementary DNA (CDNA)	46
1-4-4- مضاعفة مورّثة العامل التاسع	47
1-4-5- ترحيل نواتج الـ PCR على هلامة الآغاروز(Electrophoresis on Agarose Gel):	51
1-4-6- استخلاص الدنا من هلامة الأغاروز	53
1-4-7- التأكد من هوية الدنا المنقاة من الهلامة باستخدام تفاعل السلسلة DNA Sequencing	54
1-4-8- ربط الدنا مع البلاسميد المناسب DNA Ligation	55
1-4-8-1- تنمية الجراثيم الحاوية على بلازميد (pcDNA) ضمن وسط مغذي LB	56
1-4-8-2- تنقية البلازميد من الجراثيم	57
1-4-8-3- قطع البلازميد المنقى بإنزيمات القطع الملائمة للمورثة المطلوبة	59
1-4-8-4- قطع مورثة عامل التخثر التاسع بإنزيمي القطع KPNI و BAMHI	60
1-4-8-5- إلتحام المورثة المقطوعة مع البلازميد المقطوع	61
1-4-9- تحديد وعزل البلازميد الحاوي على المورثة الهدف	62
1-4-9-1- تحضير المحاليل الخاصة بالتهيئة و التحوير	62
1-4-9-2- زراعة الجراثيم ضمن وسط الـ LB السائل	64
1-4-9-3- تهيئة الجراثيم	64
1-4-9-4- تحوير الجراثيم	65
1-4-10- تحديد وعزل الخلايا الجرثومية الحاوية على مورثة عامل التخثر التاسع	67
2- النتائج Results	69
2-1- مرحلة قياس تركيز الـ RNA المستخلص من الخزعات الكبدية	69
2-2- مرحلة التأكد من تواجد المورثات البشرية في العينة وتضخيم مورثة عامل التخثر التاسع البشري	69
2-3- مرحلة ترحيل نواتج الـ PCR على هلامة الأغاروز	70
2-3-1- ترحيل ناتج الـ PCR للعينات الحاوية على بادئات خاصة بالمورثات البشرية	70
2-3-2- ترحيل ناتج الـ PCR للعينات الحاوية على بادئات لمورثة عامل التخثر التاسع البشري	71
2-4- مرحلة تنقية العصابتين من هلامة الأغاروز وإرسال العينتين إلى السلسلة	72
2-5- مرحلة قطع المورثة والبلازميد والتحام المورثة مع البلازميد	72
2-6- مرحلة تهيئة وتحوير الجراثيم	73

2-7- مرحلة عزل الجراثيم المحورة والتأكد من تواجد مورثة عامل التخثر التاسع البشري ضمنها	75
2-7-1- عوامل تتعلق بنجاح عملية عزل المستعمرات الجراثومية من أطباق البيتري وتضخيمها	76
3- المناقشة Discussion	77
الخاتمة	83
1- أهم النتائج التي توصل إليها البحث	84
2- المقترحات والتوصيات	84
المراجع	86
الملخص باللغة الإنكليزية	95

فهرس الجداول
Index of Tables

رقم الجدول	محتوى الجدول	رقم الصفحة
1	المواد المشكلة للخثرة والحالة للخثرة الدموية	8
2	أسماء وأرقام عوامل التخثر	12
3	تصنيف عوامل التخثر إلى ثلاث مجموعات	14
4	الأمراض الناتجة عن اضطرابات في مرحلة الإرقاء الأولي	29
5	الأمراض المكتسبة والوراثية التي تؤدي لنزف الدم أو تشكل الخثرات	33
6	الجرعات الموصوفة للوقاية ولمنع حدوث النزف عند مرضى الناعور ب	38
7	أسماء الأدوية والشركات المصنعة لعامل التخثر التاسع البشري ومصدره وطريقة تنقيته	39
8	المواد المستخدمة في تنفيذ البحث	43
9	الأجهزة المستخدمة في تنفيذ البحث	44
10	مقارنة بين العينات المأخوذة من خزعة كبدية لمرضى متطوعيين وبين خط خلوي كبدي	77
11	مقارنة بين العينات المأخوذة من خزعة كبدية لمرضى متطوعيين وبين كتلة كبدية لمتطوع	78

فهرس الأشكال والمخططات
Index of Charts and Figures

رقم الشكل	الموضوع	رقم الصفحة
1	بعض الأدوية التجارية الحاوية على بروتين عامل التخثر التاسع المؤشب	4
2	مخطط آليه تفعيل عوامل التخثر في كلا المسارين و المسار المشترك	16
3	مخطط عمل مرحلة البدأ في المفهوم الجديد للتخثر	17
4	آليه عمل طور الإنتاج	18
5	آلية عمل والتحكم بنظام الحال للفبرين	21
6	البنية الأولية لعامل التخثر التاسع البشري	24
7	الشكل الفعال للعامل التاسع البشري	25
8	مراحل تطور السلسلة البدائية من العامل التاسع البشري	25
9	إنتقال الصفة المتنحية من أب مصاب وأم سليمة أو أب سليم و أم حاملة للمرض	35
10	مراحل استخلاص الرنا	46
11	جهاز النانودروب	46
12	مرحلة صناعة الدنا المتمم	47
13	أنواع من أجهزة الـ PCR المتواجدة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية	48
14	مكونات ومراحل تفاعل الـ PCR	50
15	جهاز الرحلان الكهربائي وتصوير الهلامة	51
16	مراحل تنقية الدنا من هلامة الأغاروز	53
17	مراحل عمل تفاعل سانجر وطريقة قراءة السلسلة المدروسة	55
18	بلاسميد الـ pcDNA 3.1+	56
19	مراحل تنقية البلاسميد	58
20	مراحل قطع والتحام المورثة الهدف مع البلازميد	61
21	تحضير أطباق البيتري الخاصة بزراعة الجراثيم المحورة وراثياً	63
22	طبق بيتري مرجعي	76
23	رحلان عينات كبدية حاوية على بادئات للكشف عن المورثات البشرية GABDH	70
24	عصابة يتراوح طولها بين 1000و ال1500 bp لنفس العينة مع التعديل في شروط التفاعل	71
25	ترحيل البلازميد المقطوع للتأكد من سلامة القطع	72
26	مقارنة بين البلازميد الغير مقطوع والبلازميد المقطوع بإنزيم القطع KPNI والبلازميد المقطوع بإنزيمي القطع BAMHI و KPNI	73
27	أطباق البيتري بعد حضن 18 ساعة	74

رقم الشكل	الموضوع	رقم الصفحة
28	طبق البيتري الفارغ بعد حضن 18 ساعة	74
29	نمو المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلازميد الفارغ	74
30	نمو المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلازميد المحور	74
31	ظهورعصابات مطابقة لطول المورثة ضمن العينات العشوائية المأخوذة من أطباق البيتري للجراثيم المحورة وراثياً	75
32	نتائج السلسلة لأحد العينات المرسلة موضحا عدم إكتمال السلسلة و القراءة الكاملة للمورثة	76

المختصرات العلمية الواردة في الإطروحة
Abbreviations

المختصر العلمي	الاسم الإنكليزي	الاسم العربي
a-2AP	α-2 antiplasmin	ألفا-2 أنتي بلازمين
ADP	Adenosine Di Phosphate	أدينوزين ثنائي الفوسفات
AP	Activated Peptide	الببتيد فعال
APC	Activated C Protein	البروتين سي الفعال
AT	Antithrombin	عامل مضاد الثرومبين
ATP	Adenosine Tri Phosphate	أدينوزين ثلاثي الفوسفات
cDNA	complementary DNA	الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين المتمم
CMV	Human cytomegalovirus promoter	البادئ لفيروس المضخم للخلايا البشرية
DIC	Disseminated intravascular coagulation	مرض التخثر المنتشر داخل الأوعية
dNTPs	deoxynucleotide triphosphate	نيوكليوسيدات منقوصة الأكسجين ثلاثية الفوسفات
EGF	epidermal growth factor	عامل النمو للبشرة
FDA	US Food and Drug Administration	منظمة الغذاء والدواء الأمريكية
FDPs	fibrin degradation products	منتجات حطام الفبرين
FDP's	Fibrin Degradation products	تركيز حطام الفبرين
FIX	Coagulation Factor 9	عامل التخثر التاسع
FVa	Activated Coagulation Factor 5	عامل التخثر الخامس الفعال
FVIIa	Activated Coagulation Factor 7	عامل التخثر السابع الفعال
FX	Coagulation Factor 10	عامل التخثر العاشر
FXa	Activated Coagulation Factor 10	عامل التخثر العاشر الفعال
FXIa	Activated Coagulation Factor 9	عامل التخثر التاسع الفعال
GLA	Gamma-carboxyglutamic acid	الحمض كربوكسي غلوتامات غاما
GP-Ib	platelet glycoprotein complex I	معقد البروتين السكري الصفائحي
LB	Lysogeny broth	معلق استذابة الجراثيم
mRNA	Messenger RNA	الرنا المرسال
NFW	Nuclease Free Water	ماء منزوع النكلياز
PCR	Polymerase chain reaction	تفاعل البوليمراز المتسلسل
pdFIX	plasma-derived FIX	عامل التخثر التاسع المشتق من البلازما
PEG	Polyethelyne Glycol	بويلي إيتيلين غليكول

QOL	quality of life	جودة الحياة
rFIX	Recombinant Coagulation Factor 9	عامل التخثر التاسع المؤشب
rFIX–Fc	Recombinant factor IX-Fc fusion protein	عامل التخثر التاسع المؤشب المرتبط ببروتين FC
RNA	Ribonucleic acid	الحمض النووي الريبوزي (الرنا)
RPM	Round Per Minute	السرعة بالدقيقة
TAE	Tris base, acetic acid and EDTA	وقاء تريس/حمض الخل/EDTA
TAFI	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor	مثبط تحلل الفبرين المفعل بالثرومبين
TF	Tissue factor	العامل النسيجي
TF–VIIa	Activated Tissue Factor and Coagulation Factor 7	معقد العامل النسيجي مع العامل السابع الفعالين
TGF–α	Tumour growth factor–α	عامل النمو النخري
t–PA	Tissue plasminogen activator	مفعل البلاسمينوجين النسيجي
TxA2	Thromboxane	الثرومبوكسان
u–PA	Urokinase–type Plasminogen Activator	منشط البلاسمينوجين نمط يوروكيناز
vWF	Von Willebrand Factor	عامل فون فيلبراند

الملخص

يعد الناعور ب، أو ما يسمى الهيموفيليا ب، من الأمراض الوراثية ذات الأهمية الكبرى والتي تؤدي إلى حدوث إضطرابات في تخثر الدم وتوقف النزف، حيث يشخّص المرض بنقص في كمية وفعالية عامل التخثر التاسع البشري مما يؤدي إلى تثبيط تشكل الخثرات الضرورية لإيقاف النزوف التلقائية أو المحرَّضة بالآفات المختلفة. لقد ساهم حديثاً اصطناع الأدوية البيولوجية المتضمنة للعامل التاسع المأشوب rFIX في التدبير الجيد لمرضى الناعور ب وتحسين جودة حياتهم. مع ذلك، يشكل ارتفاع ثمن هذه الأدوية البيولوجية أحد المحددات الأساسية في تلقي شريحة كبيرة من المرضى للجرعات المناسبة والكافية لمعاكسة النزوف لديهم.

هدَفْنا في هذا البحث إلى تنسيل مورثة العامل التاسع البشري وإنتاجه في منظومات تعبير جيني لحقيقيات النوى، مع الأخذ بعين الاعتبار التعديلات اللاحقة للترجمة التي تطرأ على العامل التاسع البشري في خلايا الكبد، والضرورية للقيام بوظيفته في تحريض تشكل الخثرات وإيقاف النزف. إلا أن العديد من التحديات واجهتنا، بدءاً من الصعوبة الكبيرة في الحصول على عينات كبد بشرية ملائمة، وانتهاءً بظروف البنية التحتية في المختبرات والتي حالت دون تحقيق أهداف هذا البحث. إذ، وعلى الرغم من قيامنا بكافة الخطوات العملية المطلوبة، من عزل الرنا من عينات الخزعات الكبدية التي حصلنا عليها، واصطناع الدنا المتمم، وتضخيمه باستخدام بادئات نوعية لعامل التخثر التاسع البشري تم التأكد منها عبر وسائل المعلوماتية الحيوية، وتنسيله في البلازميد المناسب للتعبير، وتحوير خلايا الجراثيم به، جاءت نتيجة السَلسَلة النهائية لمنتج التضخيم سلبية ولم نتمكن من الحصول على تسلسل عامل التخثر التاسع للانتقال إلى الخطوات اللازمة للتعبير عنه. وتشير النتائج السلبية لبحثنا إلى ضرورة عزل الرنا المرسال الخاص بعامل التخثر التاسع البشري من خطوط خلوية كبدية بشرية لم نتمكن من الحصول عليها خلال فترة إجراء البحث.

الجزء التمهيدي

(الإطار العام)

1- المقدمة Introduction :

يعد العلاج البيولوجي من أهم العلاجات الواعدة التي توصل إليها العلم الحديث، حيث تشكل الأدوية البيولوجية بديلاً لعلاج الأمراض الحيوية التي لم يتم علاجها بالأدوية الكيميائية، مما دفع شركات الرعاية الصحية والصيدلانية إلى بذل أقصى جهودها بالإعتماد على التقانات الحيوية في العمل على إنتاج وتطوير الأدوية البيولوجية، كما وزاد محل إهتمامهم بعد إنتاج الإنسولين البشري المؤشب عام 1982.

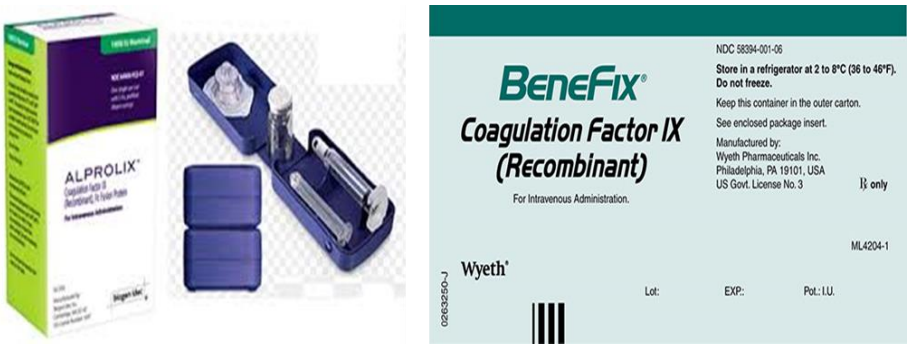
في السابق كانت الأدوية البيولوجية موجودة ولكن اقتصر إستخراجها من مصادر طبيعية. وبسبب الأهمية الكبيرة لهذه الأدوية، بذلت قصارى الجهود ومحاولات التطوير وإكتشاف تقنيات جديدة من أجل إنتاج الأدوية البيولوجية بكميات جيدة ومدروسة وبطرق أكثر ملائمة وحديثة، أدت في النهاية إلى ظهور ثورة بيولوجية في عالم الأدوية وإكتشاف علاجات جديدة لأمراض كانت سابقا مرتكزة على علاجات عرضية لا أساسية.

وتعرف الأدوية البيولوجية بحسب منظمة الغذاء والدواء الأميركية FDA (US Food and Drug Administration") بأنها المادة المصنوعة من الكائن الحي أو منتجاته، والمستخدمة في الوقاية والتشخيص وعلاج الأمراض، وهي عبارة عن أصناف مختلفة من المنتجات الدوائية ذات الوزن الجزيئي الكبير والمعقد. تتم صناعة هذه المنتجات داخل الكائن الحي مثل العضيات الصغيرة والخلايا النباتية والحيوانية، والتي من الصعب تحديدها مقارنة بالأدوية ذات الجزيئات الصغيرة. وهنالك الكثير من هذه الأدوية التي تمت المصادقة عليها من قبل الـ FDA بما فيها بروتينات مؤشبة Recombinant Proteins مثل filgrastim، أضداد وحيدة النسيلة Monoclonal Antibody مثل adalimumab، ولقاحات Vaccines المضادة للعوامل الممرضة مثل influenza and tetanus (Chan and Chan, 2017)

صادقت منظمة الغذاء والدواء الأمريكية FDA مؤخرًا على طرح دواء جديد لعلاج المرضى المصابين بنزف الدم الوراثي، المعروف باسم "الهيموفيليا ب"، ويعرف الدواء الجديد باسم أيدلفيون Idelvion، ويحتوى على عامل التخثر التاسع فى صورة مؤشبة، ويصلح لعلاج الأشخاص البالغين والأطفال المصابين بمرض "الهيموفيليا ب". يشكّل علاج الهيموفيليا إنجازاً ضخماً، يصيب هذا المرض واحداً من بين 30000 من الذكور، وتبلغ قيمة سوق بدائل عامل الدم 10 مليارات دولار (Castaman and Matino, 2019).

2- الإشكالية البحثية:

يعد بروتين عامل التخثر التاسع أحد أهم الأدوية العلاجية الضرورية في علاج مرض الناعور (الهيموفيليا ب، وخاصة بسبب إنتشاره في سورية والوطن العربي (Ali and Schved, 2012). ويقدر عدد المصابين بمرضى الناعور في سورية حوالي الـ 2000 مريضاً، معظمهم مصابون بمرض الناعور أ، كما يجري العمل في الجمعية السورية لمرضى نزف الدم الوراثي المتواجدة في مشفى التوليد الجامعي في جامعة دمشق على العناية الفائقة وتأمين الأدوية الضرورية والعلاجات المزمنة لمرضى الناعور مجاناً، حيث يعطى كل مريض حقنة اسعافية لأي سبب طارئ يؤدي الى نزوفات خطيرة لدى المرضى وما يكلف هذا العمل من مبالغ طائلة (الجمعية السورية لمرضى الناعور، 2006). من هذه الأدوية المستخدمة لعلاج مرض الهيموفيليا ب، دواء ALPROLIX و BeneFix واللذين يتضمنان عامل التخثر التاسع المؤشب المصنع من قبل شركة Biogen pharma و Wyeth الأميركيتين، على التوالي، على شكل حقن مديدة التأثير بعمر نصفي حوالي 12.5 يوم (الشكل 1). يحتاج المريض حقنة كل أسبوعين كجرعة وقائية من حدوث نزيف دموي طارئ ناجم عن الرضوض أو الجروح البسيطة وكجرعة قبل أي عملية جراحية، وبذلك تقدّر الحاجة الماسة للدواء والتكلفة العالية المترتبة على المريض للبقاء حياً، حيث يقدر سعر الدواء حوالي 11.23$ لكل وحدة دولية واحدة وتكون أقل جرعة هي 500 IU، أي مايعادل 5600 $ ثمن كل جرعة تعطى للمريض (Messori and Trippoli, 2017).



الشكل 1: بعض الأدوية التجارية الحاوية على بروتين عامل التخثر التاسع المؤشب

3- تساؤلات البحث:

- هل من الممكن تضخيم مورثة عامل التخثر التاسع البشري بدءا من الرنا RNA المستخلص من عينات كبد بشرية؟
- هل يمكن إدخال المورثة ضمن بلازميدات تمكننا من تحوير جراثيم قادرة على إنتاج بروتين عامل التخثر التاسع البشري ضمن وسط مغذي لها؟
- هل يمكن إنتاج بروتين العامل التاسع بشكله الفعال في الجراثيم، بحيث يكون البروتين المأشوب المنتج وظيفياً؟

4- فرضيات البحث:

يمكن الحصول على التسلسل النكليوتيدي المشفر لعامل التخثر التاسع البشري عن طريق الرنا المرسال المستخلص من عينات لخزعات كبدية بشرية، متبوعاً بتصنيع الدنا المتمم ومن ثم غرس التسلسل النكليوتيدي ضمن بلازميد مناسب للتعبير عن عامل التخثر التاسع البشري في طلائعيات النوى.

5- مسلمات البحث:

- يتم التعبير عن مورثة العامل التاسع البشري حصرياً في خلايا الكبد.

- يستخدم عامل التخثر التاسع البشري كعلاج بيولوجي لمرضى الناعور ب.

6- أهداف البحث :

يهدف البحث إلى:

1- عزل وتضخيم التسلسل النكليوتيدي الخاص بعامل التخثر التاسع البشري من عينة كبدية.

2- إجراء تنسيل للتسلسل النوعي لعامل التخثر التاسع البشري ضمن بلاسميد يُمكِّن من التعبير عنه.

7- أهمية البحث :

تعد العلاجات البيولوجية من أهم طرق العلاج الحديثة من حيث الأمان والفعالية في علاج الأمراض وبدون أية مضاعفات على إعتبارها تحاكي طبيعة الجسم البشري ومن نفس المكونات البشرية، وبالتالي الوصول إلى دواء يحتوي على بروتين عامل التخثر التاسع البشري بشكله الفعال لعلاج مرضى الناعور ب. من خلال الأبحاث والدراسات اللاحقة والتي يمكن من خلالها الوصول إلى الدواء البيولوجي العلاجي لمرض الناعور ب، يمكن إنتاجه محلياً وبتكلفة أقل بكثير من سعره عالمياً، مما يشكل علاجاً رخيص الثمن بمتناول جميع المرضى. ويشبه بروتوكول عزل مورثة عامل التخثر التاسع البشري إلى حدٍ كبير أي بروتوكول عزل مورثة بشرية أخرى. وعليه، يمكننا إتباع نفس الخطوات لعزل مورثة بشرية أخرى تفيدنا في التوصل إلى علاج بيولوجي أخر.

8- مبررات البحث:

1- تأمين مصدر علاجي فعال ورخيص الثمن لمرضى الناعور ب في سورية.

2- المساهمة بتوطين التقانات اللازمة لاصطناع الأدوية البيولوجية في سورية.

9- محدوديات البحث :

- الحجم الصغير جداً للعينات الكبدية، والتي تكون عادة على شكل خزعات إبرية، وكون تركيز الرنا المرسال الخاص بالعامل التاسع ضعيف جداً ضمن الخلايا الكبدية، مما قد يقلل من إحتمالية تضخيم التسلسل النكليوتيدي للعامل التاسع البشري من هذه العينات.
- يتم أخذ العينات والخزعات من كبد مرضى غير سليميين، مما قد يسبب تلفاً في معظم الخلايا الكبدية وندرة تواجد الرنا المرسال النوعي لعامل التخثر التاسع البشري.
- من غير الممكن أخلاقياً الحصول على عينات من متطوعيين سليمي الكبد.
- عدم توفر خط خلوي كبدي وصعوبة إمكانية الحصول على كتلة نسيجية من الكبد، مما يحصر التعامل مع الخزعات الكبدية الإبرية فقط.

الجزء الأول

(أدبيـات البـحث)

1- مفهوم تخثر الدم وآليه عمل شلال التخثر:

يعود مصطلح تخثر الدم إلى عام 1960 عندما أطلق العالم ديفي وراتنوف وماكفارلين نظرية شلال التخثر التي تحدد المبدأ الأساسي لعمل مجموعة من الإنزيمات تؤدي في النهاية الى حدوث الإرقاء وتشكيل الخثرة وبالتالي توقف النزف (Achneck HE, et al, 2010). ويتم هذا التوازن المحكم بين عمل إنزيمات التي تقوم على تنشيط وتثبيط إنزيمات التخثر ضمن سلسلة معقدة من التفاعلات ما بين نظام التخثر وتحلل الخثرات والصفائح الدموية وجدار الوعاء الدموي.

تعتمد آليه حدوث الخثرة على تثبيط سلسلة من التفاعلات التي تحد أساساً من تكون الخثرة الدموية، وبالتالي يؤدي حدوث التوازن بين تثبيط عمل التفاعلات التي تعمل على منع تشكل الخثرة الدموية وتنشيط عمل عوامل التخثر في النهاية إلى حدوث خثرة دموية مناسبة لإيقاف نزف الدم (Previtali et al, 2011). وفيما يلي جدول يبين مجموعة من العوامل التي تعمل على حدوث الخثرة وعوامل تعمل على عدم تشكلها (الجدول رقم 1).

الجدول 1: العوامل المشكلة للخثرة والحالة للخثرة الدموية

Thrombogenic and antithrombogenic components in the body

Site	Thrombogenic	Antithrombogenic
Vessel wall	Exposed endothelium	Heparin
	TF	Thrombomodulin
	Collagen	Tissue plasminogen activator
Circulating elements	Platelets	Antithrombin
	Platelet activating factor	Protein C and S
	Clotting factor	Plasminogen
	Prothrombin	
	Fibrinogen	
	vWF	

vWF – Von Willebrand factor; TF – Tissue factor

(Palta et al, 2014)

ولكي يتم فهم آلية عمل التخثر الدموي وتشكل الخثرات يجب فهم الآليات الأربع التي تعمل على التحكم وضبط حدوث الخثرة الدموية داخل جسم الإنسان وهي:

1- الإرقاء الأولي (Primary Haemostasis).

2- الإرقاء الثانوي أو ما يسمى بشلال التخثر (Coagulation pathways).

3- المنظومة المضادة لتشكل الخثرات (Anticoagulant System).

4- المنظومة الحالة للفبرين (Fibrinolytic system).

1-1- الإرقاء الأولي (primary haemostasis):

ينتج الإرقاء الأولي عن طريق تفاعلات معقدة بين الصفيحات وجدار الوعاء الدموي والبروتينات اللاصقة بينهم لتشكل في النهاية ما يسمى سدادة الصفيحات الأولية (Cines DB, et al , 1998).

يحتوي جدار الأوعية الدموية على خلايا ظهارية تمتد على طول السطح الداخلي للوعاء الدموي لها خصائص مضادة لتشكل الخثرات الدموية بسبب احتوائها على مجموعة من العوامل الحالة للخثرة وهي (الهيبارين سالب الشحنة أو ما يسمى غلوكوز أمينوغليكان – فوسفولبيدات – عوامل مثبطة لتشكل الصفيحات – عوامل مانعة للتخثر – عوامل منشطة لحل الفيبرين) (Lasne D, Jude B and Susen S , 2006)، وعوامل تحت ظهارية شديدة التجلط لها خصائص مساعدة في تشكل الخثرات وهي (الكولاجين – عامل فانويلبراند vWF – وبروتينات تساعد على التصاق الصفيحات الدموية مثل اللامينين و ثرومبوسبوندين و فيترونكتين) (Coagulation and bleeding disorders, 2000).

الصفيحات الدموية هي عبارة عن مجموعة من شدف الخلايا مشتقة من خلايا النواء الضخمة تتشكل على هيئة قرص لها دور هام في حدوث الإرقاء وذلك عن طريق تشكيل سدادة الصفيحات الأولية في مرحلة الإرقاء الأولي والتي تؤمن السطح الملائم لتتجمع عوامل التخثر النشطة، وبالتالي تشكل شبكة الفيبرين على سطح الصفيحات المكدسة ومنه تشكل الخثرة الدموية المستقرة.

تحتوي الصفيحات على نوعين من الحبيبات:

1. حبيبات ألفا: تحتوي على ب-سلكتين P-selectin ، فيبرينوجين fibrinogen ، فيبرينوكتين fibronectin، العامل الخامس factor V ، العامل الثامن factor VIII ، عامل الصفيحات الرابع platelet factor IV ، عامل النمو المشتق من الصفيحات platelet-derived growth factor وعامل النمو الاستحالي transforming growth factor-α (TGF-α) . (Heemskerk et al, 2002)
2. حبيبات غاما: تحتوي على أدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP)، أدينوزين ثنائي الفوسفات (ADP)، كالسيوم (Ca)، سيروتونين، هيستامين وأدرينالين epinephrine، (Heemskerk et al, 2002).

عند حدوث أذية في جدار الوعاء الدموي تلتصق الصفيحات مع الكولاجين وعامل فون فلبراند vWF المتواجدين ضمن الخلايا تحت الظهارية، وبالتالي تشكل العديد من الوصلات شبيه بالأرجل الكاذبة تزيد مساحة سطح الوعاء المتأذي ومنه تشكل السدادة الصفيحية الأولية.

ويتألف تشكل سدادة الصفيحات الأولية Platelet Plug من المراحل التالية:

1. إلتصاق الصفيحات:

يبدأ التصاق الصفيحات عند حدوث أي أذية في الوعاء الدموي مما يؤدي إلى ارتباط الصفيحات مع الكولاجين المتواجد ضمن خلايا تحت الظاهرية بواسطة عامل فون فالبراند، حيث يرتبط من جهة بالكولاجين ومن جهة أخرى على مستقبلات المتواجدة على سطح الصفيحات platelet glycoprotein (GP-Ib) complex I مشكلاً جسراً يلصق الصفيحات بجدار الوعاء.

2. إفراز الصفيحات:

بعد الاتصاق، تبدأ الصفيحات بتحرير العوامل المتواجدة ضمن الحبيبات المتواجدة ضمنها، حيث يتم فرز الكالسيوم بالإضافة للعوامل العديدة، ويرتبط الكالسيوم مع الفوسفولبيدات مما يؤمن سطحاً ملائماً لعمل عوامل التخثر الأخرى.

3. تكدس الصفيحات:

يرتبط الثرومبوكسان TxA2 مع الأدينوزين ثنائي الفوسفات ADP مما يزيد من تجمع الصفيحات الدموية وتشكيل السدادة الصفيحية المؤقتة، كما يؤدي هذا الإرتباط إلى إحداث تغيرات بنيوية في مستقبلات GpIIb/IIIa المتواجدة على سطح الصفيحات مما يؤدي إلى إفراغ الفيبرينوجين، ثم يتم تفعيل الترومبين والذي يعمل على تحويل الفيبرينوجين إلى فبرين وبالتالي زيادة في ثباتية السدادة الصفيحية وصولاً للإرقاء الثانوي (Heemskerk et al, 2002). هنالك توازن محكم بين عمل الثرومبوكسان والبروستاسايكلين وذلك لتشكيل خثرة ملائمة للأذية المحدثة وعدم تشكل خثرة زائدة تسد الوعاء الدموي، حيث يعمل الثرومبوكسان على تشكيل الخثرة بينما يعمل البروستاسايكلين على منع تشكلها (Ashby et al, 1990) و (Cines et al, 1998) .

1-2- الإرقاء الثانوي أو شلال التخثر:

تعد عوامل التخثر العنصر الأساسي في حدوث شلال التخثر الذي يؤدي في النهاية إلى تحول الفيبرينوجين المنحل إالى خيوط الفبرين الغير المنحلة وتشكل الخثرة الثابتة وذلك عن طريق سلسلة معقدة من التفاعلات فيما بينهم.

عوامل أو بروتينات التخثر (الجدول 2):

يتم إنتاج معظم عوامل التخثر من الخلايا الكبدية، ما عدا العامل الثالث، بشكل غير فعال أو ما يسمى بالـ Zymogen. عند حدوث الأذية الوعائية، تطرأ على هذه العوامل تعديلات ما بعد الترجمة مما يغير من البنية والشكل الفراغي للبروتينات لترتبط مع الفيتامين K وتصبح فعالة ويسمح لها أن ترتبط مع الشوارد الموجبة ثنائية القطب وبالأخص الكالسيوم وبالتالي المساهمة في عمل شلال التخثر (Monroe et al, 2010) .

تعتمد العديد من عوامل التخثر على وجود فيتامين K في الجسم لتتحول للشكل الفعال حيث يعمل على كربكسلة لحمض الغلوتاميك الموجود في عوامل التخثر، وبالتالي يؤدي حدوث أي نقص في فيتامين K أو استخدام الأدوية المضادة للفيتامين K مثل الوارفارين إلى عدم فعالية عوامل التخثر ومنه إلى خلل في عمل شلال التخثر وتشكل الخثرة الدموية.

الجدول 2: أسماء وأرقام عوامل التخثر

Nomenclature of the coagulation proteins/clotting factors

Clotting factor number	Clotting factor name	Function	Plasma half-life (h)	Plasma concentration (mg/L)
I	Fibrinogen	Clot formation	90	3000
II	Prothrombin	Activation of I, V, VII, VIII, XI, XIII, protein C, platelets	65	100
III	TF	Co factor of VIIa	-	-
IV	Calcium	Facilitates coagulation factor binding to phospholipids	-	-
V	Proacclerin, labile factor	Co-factor of X-prothrombinase complex	15	10
VI	Unassigned			
VII	Stable factor, proconvertin	Activates factors IX, X	5	0.5
VIII	Antihaemophilic factor A	Co-factor of IX-tenase complex	10	0.1
IX	Antihaemophilic factor B or Christmas factor	Activates X: Forms tenase complex with factor VIII	25	5
X	Stuart-Prower factor	Prothrombinase complex with factor V: Activates factor II	40	10
XI	Plasma thromboplastin antecedent	Activates factor IX	45	5
XII	Hageman factor	Activates factor XI, VII and prekallikrein		-
XIII	Fibrin-stabilising factor	Crosslinks fibrin	200	30
XIV	Prekallikerin (F Fletcher)	Serine protease zymogen	35	
XV	HMWK- (F Fitzgerald)	Co factor	150	
XVI	vWf	Binds to VIII, mediates platelet adhesion	12	10 µg/mL
XVII	Antithrombin III	Inhibits IIa, Xa, and other proteases	72	0.15-0.2 mg/mL
XVIII	Heparin cofactor II	Inhibits IIa	60	-
XIX	Protein C	Inactivates Va and VIIIa	0.4	-
XX	Protein S	Cofactor for activated protein C		-

HMWK – High molecular weight kininogen; vWf – Von Willebrand factor; TF – Tissue factor

(Palta et al,2004)

أسماء عوامل التخثر وأرقامها:

- العامل السادس لم يعد موجوداً.
- هنالك أكثر من اسم واحد لعوامل التخثر.
- العامل الخامس والثامن تسمى بالعوامل الشفوية لأنها لم ترى ضمن عينات الدم المخزنة.
- البروثرومبين هو بروتين غير مستقر ينشطر إلى بروتينات أصغر أهمها الثرومبين، له دور في حدوث الإلتهاب حيث يتم إفرازه بعد تفعيل المستقبلات المفعلة للبروتياز والموجودة على سطح الخلايا اللمفاوية lymphocytes وخلايا وحيدة النواة monocytes والظهارية endothelium و الدبقية dendritic cells.(Hall , 2010)
- عامل فون ويلبراند vWF هو عبارة عن بروتين سكري يتواجد ضمن بلازما الدم ويتم إنتاجه من الخلايا الظهارية والخلايا تحت الظهارية وخلايا النواء. يتواسط ارتباط الصفيحات الدموية مع الخلايا تحت الظهارية في جدار الوعاء الدموي كما يعمل كبروتين رابطاً لعامل التخثر الثامن (Sadler, 1998) و (Barash et al, 2006).
- يتم إنتاج الفيبرينوجين في الكبد، وهو أساس الفيبرين أو ما يعرف بقوة التجلط. (Doolittle et al, 1998 و Kamath and Lip, 2003).
- العامل الثالث (TF) هو عبارة عن بروتين سكري مرتبط بالغشاء متواجد بالخلايا تحت الظهارية والخلايا الليفية ولا يفرز إلى الدم ولا يتفعل إلا عند حصول أذية في جدار الوعاء الدموي سواء كانت أذية فيزيائية (جرح مباشر) أو أذية وظيفية (نقص أكسجة، إنتانات دموية، التهابات أو أورام خبيثة ....). (Mackman et al, 2007) و (Manly et al, 2011).

تصنف عوامل التخثر إلى ثلاث مجموعات (الجدول 3):

1- عائلة الفيبرينوجين

2- البروتينات المعتمدة على فيتامين K

3- عائلة التماس

الجدول 3: تصنيف عوامل التخثر إلى ثلاث مجموعات

Classification of coagulation factors

Fibrinogen family	Vitamin K dependent	Contact family
Fibrinogen	Factor II	Factor XI
Factor V	Factor VII	Factor XII
Factor VIII	Factor IX	HMWK
Factor XIIII	Factor X	Prekallikerin

HMWK – High molecular weight kininogen

(Palta et al, 2004)

شلال التخثر:

صنف شلال التخثر سابقاً إلى مسارين؛ مسار العامل النسيجي (المسار الخارجي) ومسار التفعيل بالتماس (المسار الداخلي) اللذين ينتهيان بتفعيل عامل التخثر العاشر FX. ولكن هذه النظرية أثبتت فوائدها فقط لفهم آلية حدوث التخثر ضمن عينات المختبر. أما ضمن الكائن الحي، فهنالك سلسلة أكبر ومفهوم مختلف لعمل شلال التخثر (Bombeli and Spahn, 2004)، حيث تبين أن المرضى الفاقدين لعوامل التخثر (الثاني عشر، الرابع عشر، الخامس عشر) لديهم خلل في عملية التخثر، وكذلك يكون المرضى ممن لديهم كمية قليلة من العامل الحادي عشر معرضين لحدوث كدمات متكررة. أما من يفقدون تماما العامل الحادي عشر، فيعانون من نزف دم متوسط الشدة (الناعور C)، والنقص في عاملي التخثر الثامن أو التاسع يؤدي إلى مرض الناعور A والناعور B، بالترتيب.

وبفرض أن هنالك مساران للتخثر، فإن عطل أحد المسارين أو نقصان عامل من عوامل التخثر يعوض من عمل المسار الأخر، بينما لا يتم التعويض تماماً في جسم الكائن الحي مما يدل على إختلاف عمل شلال التخثر ضمن الكائن الحي.

- المسار الخارجي (مسار العامل النسيجي):

ويعد المرحلة الأولى في حدوث الإرقاء ضمن البلازما، ويتم تنشيطه بواسطة العامل الثالث أو ما يسمى العامل النسيجي TF (Lasne et al, 2006). عند حدوث أذية وعائية، يرتبط العامل النسيجي مع عامل التخثر السابع الفعال FVIIa والكالسيوم ويؤدي هذا الإرتباط إلى تحويل العامل العاشر غير الفعال FX إلى العامل العاشر الفعال FXa (Owens and Mackman, 2010).

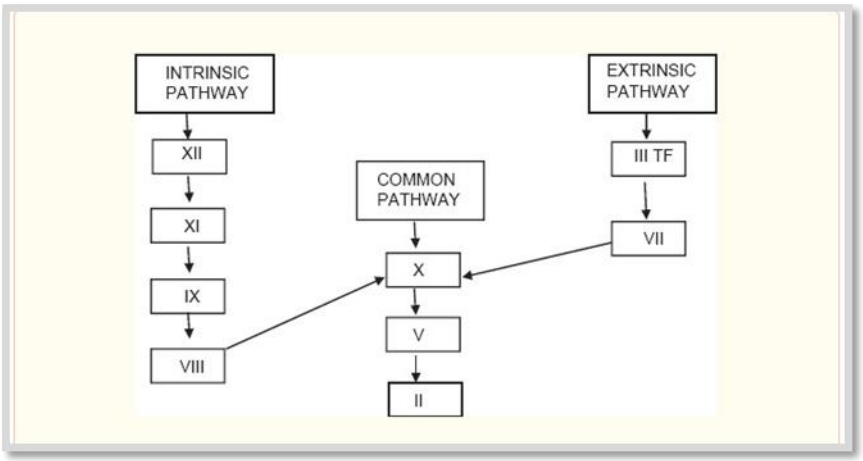
- المسار الداخلي (مسار التفعيل بالتماس):

يبدأ هذا المسار بتفعيل عامل التخثر الثاني عشر، أو عامل هيغمان، والذي بدوره يفعل العامل الرابع عشر (بريكاليكرين) والعامل الخامس عشر (الكينونيجين)، ومن ثم يتم تفعيل العامل الحادي عشر FXIa. يفعل العامل الحادي عشر الفعال العامل التاسع FIX، ويرتبط العامل التاسع الفعال مع العامل الثامن الفعال وهو عامل مساعد ويشكلان معقداً إنزيمياً يرتبط على أسطح الفوسفوليبيدات ليفعل العامل العاشر FX (Kumar et al, 2010) و (Hall, 2010).

- المسار المشترك:

يرتبط العامل العاشر الفعال FXa مع العامل المساعد له (العامل الخامس الفعال FVa) ومن ثم يرتبطان مع الفوسفوليبيدات المتواجدة على سطح النسج والصفيحات الدموية ومع الكالسيوم مشكلين معقداً يسمى معقد البروثرومبيناز، والذي يعمل على تحويل البروثرومبين (العامل الثاني غير الفعال) إلى الثرومبين (العامل الثاني الفعال). يعمل الثرومبين على تحويل الفيبرنوجين المنحل بالدم إلى خيوط من الفبرين غير المنحل، كما يعمل على

تنشيط عامل التخثر الثالث عشر FXIII والذي بدوره يعمل على خلق روابط تشاركيه بين خيوط الفبرين المتواجدة على سدادة الصفيحات، وبالتالي تشكيل شبكة مترابطة ومتينة من خيوط الفبرين التي تثبت السدادة الصفيحية ومنه تشكل الخثرة المتينة (Kumar et al, 2010) و (Hall, 2010) الشكل رقم 2.



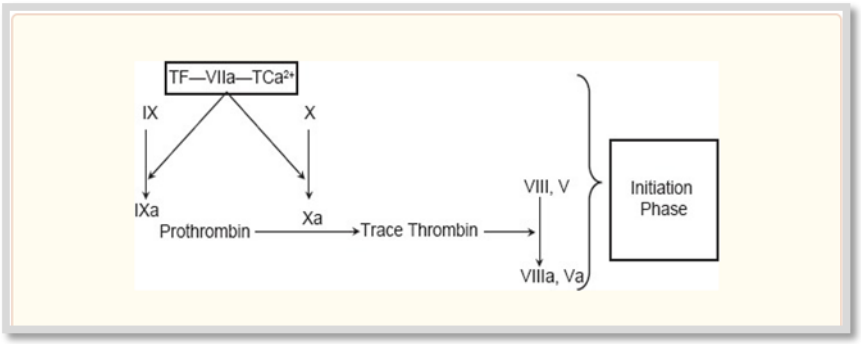
الشكل 2: مخطط آليه تفعيل عوامل التخثر في كلا المسارين و المسار المشترك (Palta et al, 2004)

مفهوم التخثر الجديد :

بعد أن تبين أن المسار الداخلي ليس موازٍ لعمل المسار الخارجي وإنما يزيد من إنتاج الثرومبين وحدوث أي خلل فيه يمكن أن يعيق عمل التخثر بالكامل (Coagulation and bleeding disorders, 2000) ، تم إعتماد آلية جديدة في عمل شلال التخثر وفق الخطوات الآتية:

1- طور البدء:

يبدأ بارتباط العامل النسيجي عند حدوث أذية وعائية مع العامل السابع الفعال FVIIa. ويعمل هذا المعقد على تفعيل العامل العاشر والعامل التاسع، ويعتبر هذا التفعيل خطوة مشتركة بين المسار الداخلي والخارجي. بدوره، يفعل العامل العاشر العامل الثاني ومنه يتم إنتاج الثرومبين، ولكن كمية الثرومبين في هذه المرحلة ليست كافية إذ يمكن إيقاف إنتاجه بواسطة العامل المثبط للعامل النسيجي TF pathway inhibitor (الشكل 3).



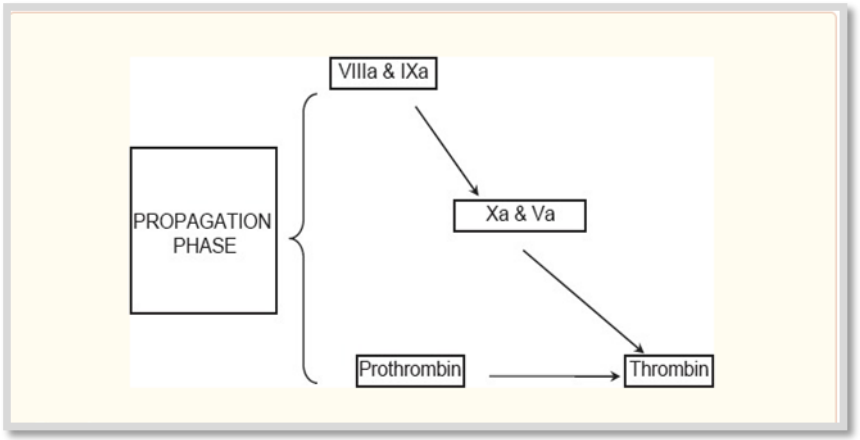
الشكل 3: مخطط عمل مرحلة البدأ في المفهوم الجديد للتخثر (Palta et al, 2004)

2- طور التضخيم:

تكون كمية البروثرومبين المنتجة في مرحلة البدء غير كافية، وهنالك آلية تلقيم راجع إيجابية تزيد من إنتاج الثرومبين، حيث تقوم الكمية القليلة من الثرومبين المنتجة بتفعيل العاملين الخامس والثامن واللذان يعملان كعوامل مساعدة ضمن معقد البروثرومبيناز، والذي يقوم بدوره بتفعيل العامل التاسع ومنه تفعيل العامل العاشر ومنه الحصول على كمية أكبر من الثرومبين.

3- طور الإنتاج:

تتراكم كميات وفيرة من المعقدات الإنزيمية (معقد البروثرومبيناز ومعقد التيناز) على سطح الصفيحات وبالتالي تزيد من تفعيل الصفيحات الدموية وإنتاج الثرومبين، ومنه يتم توليد الثرومبين بشكل مستمر واصطناع كمية كافية من الفبرين لتشكيل الخثرة الكبيرة والمناسبة لإيقاف النزف وسد الأذية الوعائية، (الشكل 4).



الشكل 4: آلية عمل طور الإنتاج (Palta et al, 2004)

4- طور التثبيت:

يؤدي تفعيل الثرومبين أيضا إلى تفعيل العامل الثالث عشر (fibrin stabilizing factor)، والذي بدوره يربط خيوط الفبرين بعضها ببعض عن طريق تشكيل روابط تشاركية فيما بينها مكونة شبكة متينة من الفبرين ومثبتة على السدادة الصفيحية الأولية. ويقوم أيضا الثرومبين بتثبيط الإنزيم الحال للفبرين thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)، وبالتالي يحمي الخثرة المتشكلة من التحلل.

1-3- المنظومة المضادة لتشكل الخثرات (Anticoagulant System):

يلعب هذا النظام دوراً متوازناً ومحكماً مع آليات حدوث الخثرة وذلك لمنع تشكيل خثرة غير مناسبة كبيرة الحجم قد تؤدي لحدوث انسداد في الوعاء الدموي (Colvin, 2004).

هنالك عدة آليات تعمل للحد من تشكل الخثرات الدموية وهي:

1- مثبطات الثرومبين :

ويعد أهمها عامل مضاد الثرومبين Antithrombin (AT) ، والمثبط الأساسي للثرومبين ويعمل على تثبيط السيرين بروتياز ومنه تثبيط عمل الثرومبين والعامل التاسع والعاشر والحادي العشر والثاني عشر المفعلة. كما تزيد فعالية مضاد الثرومبين بوجود الهيبارين، حيث يرتبط الـ AT مع سلفات الهيبارين المتواجد على سطح الخلايا الظهارية. يرتبط الـ AT مع عوامل التخثر بنسبة 1:1 ويشكل معقداً يتم إزالته بواسطة خلايا الشبكية البطانية (reticuloendothelial).

من العوامل المثبطة أيضاً للثرومبين، العامل المساعد للهيبارين (heparin cofactor II) و 2-ألفا ماكروغلوبيولين (α2 macroglobulin) و 1-ألفا أنتي تربسين (α1-antitrypsin) (Opal et al, 2002) و (Ejiofor, 2013). والمثبط الآخر هو مثبط العامل النسيجي (Tissue factor plasminogen

inhibitor)، وهو عبارة عن عديد ببتيدي ينتج من الخلايا البطانية، يعد مثبطاً للمسار الخارجي عن طريق معقد العامل النسيجي مع العامل السابع الفعالين TF–VIIa (Ejiofor, 2013) و (Price et al, 2004).

2- مسار البروتين سي (Protein C pathway):

يعمل هذا المسار على تثبيط عمل طور الإنتاج في مراحل التخثر الدموي، و يتألف من أربعة عناصر أساسية هي:

- بروتين سي Protein C:

هو عبارة عن إنزيم السيرين بروتياز له خواص مضادة للتخثر وحال للفبرين ومضادة للإلتهاب، يتم تفعيله بواسطة الثرومبين ليشكل البروتين سي الفعال (APC) وبدوره يعمل على تثبيط عاملي التخثر الخامس والثامن الفعاليين وذلك بالتعاون مع بروتين س (Protein S) والفوسفولبيدات.

- ثرومبوميديوللين أ (Thrombomodulin – A):

وهو عبارة عن مستقبل ضمن غشاء الخلايا البطانية، يمنع تشكل الخثرة في الخلايا البطانية غير المتأذية وذلك عن طريق إرتباطه مع الثرومبين.

- مستقبل بروتين سي البطاني:

وهو عبارة أيضاً عن مستقبل ضمن غشاء الخلايا البطانية، يساعد على تفعيل بروتين سي.

- بروتين س (Protein S):

هو عبارة عن بروتين سكري مصنع من الخلايا البطانية وخلايا الكبد، ويتواجد في البلازما بالشكل الحر 40% و الشكل المرتبط 60% (يرتبط مع بروتين C4b)، وتعتمد خاصيته المضادة للتخثر على الشكل الحر فقط. أما الشكل المرتبط فيعمل كمثبط للجملة المتممة ومنظم لحالات الإلتهاب، حيث ينخفض تركيز البروتين س. يلعب دور عامل مساعد للبروتين سي الفعال حيث يساعد على تثبيط عاملي التخثر الخامس

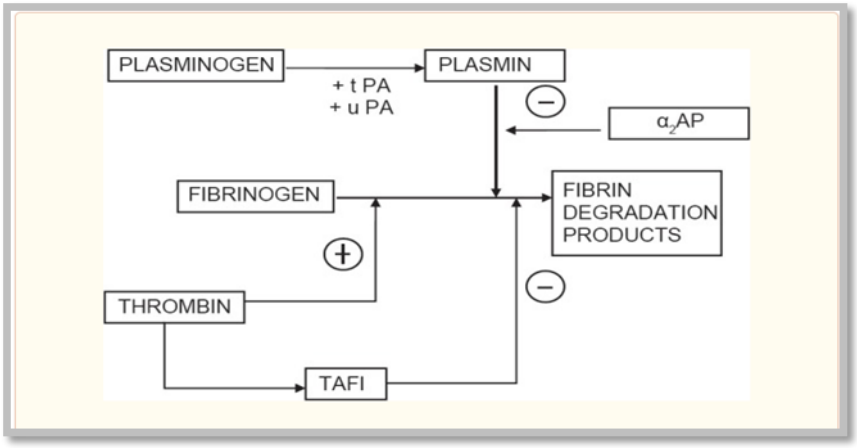
و الثامن المفعلين، كما يعمل كمثبط مباشر لمعقد البروثرومبيناز (FVa–FXa) (Rigby and Grant, 2004).

- بروتين Z المثبط للبروتياز (PZI):

اكتشف حديثاً، يتم إنتاجه من خلايا الكبد، ويعمل على تثبيط العامل العاشر الفعال وذلك بالتفاعل مع الكاسيوم.

1-4- المنظومة الحالة للفبرين (Fibrinolytic system):

هي عبارة عن منظومة تعمل بشكل متوازٍ مع نظام شلال التخثر، حيث يتم تنشيط المنظومتين معاً. وتعمل المنظومة الحالة للفبرين على تحديد حجم شبكة الفبرين المتشكلة، وتقوم بمجموعة من التفاعلات الإنزيمية التي تحل خثرة الفبرين إلى مجموعة من منتجات حطام الفبرين fibrin degradation products (FDPs) بواسطة إنزيم البلازمين الذي يتم إنتاجه من البلازمينوجين الرابط للفبرين في الخلايا الكبدية. يتم تحفيز هذا التفاعل بواسطة إنزيم t–PA أو الإنزيم المحفز لليوريكناز urokinase plasminogen activator (u–PA) الذي يتحرر من الخلايا البطانية الوعائية، حيث ينشط تحريره عند حالات إنسداد الأنسجة أو عند تحرر الثرومبين، الأدرينالين، الفاسوبريسين وحالات التمارين الشاقة. ويتم التحكم بعمل البلازمين بواسطة ألفا–2 أنتي بلازمين α–2 antiplasmin (a–2AP) الذي يحد من توسع عمل نظام الحال للفبرين (Cesarman–Maus and Hajjar, 2005) (الشكل 5).



الشكل 5: آلية عمل والتحكم بنظام الحال للفبرين (Palta et al, 2004)

تحدد نسبة نشاط المنظومة الحالة للفبرين سريريا عن طريق قياس تركيز حطام الفبرين FDP's، حيث يتم قياس D dimers وهو أحد المكونات الناتجة من الروابط بين الفبرين، ويعد مشعراً أساسياً في منظومة حل الفبرين ويستخدم لتشخيص وتقيم نسبة الصمة الرئوية و الخثار داخل الوعاء المنتشر (DIC) وتجلطات الأوردة العميقة (Colvin, 2004).

وهنالك ثلاثة عوامل تضبط وتنظم عمل المنظومة الحالة للفبرين:

- الإنزيم المثبط لعمل البلازمينوجين (Plasminogen activator inhibitor)، وهو المثبط الرئيس لحل الفبرين عن طريق تثبيط عمل إنزيمي الـ t–PA و الـ u–PA بشكل غير عكوس.
- TAFI هو عبارة عن برو إنزيم متواجد بالبلازما يتم تصنيعه بالخلايا الكبدية وينشط بالثرومبين، يعمل على تقليل الإلفة بين البلازمينوجين والفبرين كما يزيد من نشاط إنزيم الأنتي تربسين anti–trypsin الذي يثبط البلازمين.
- مثبط البلازمين ألفا–2 (α2– antiplasmin) و ألفا–2 ماكروغلوبيولين (α2Macroglobulin) وهم عبارة عن بروتينات سكرية التي تعمل على تثبيط البلازمين.

2– عامل التخثر التاسع البشري:

يتم إنتاج عامل التخثر التاسع، أو ما يسمى عامل كريستماس (FIX, Christmas factor) نسبةً إلى أول طفل اكتشف فيه المرض واسمه ستيفن كريستماس، من الخلايا الكبدية على شكل طليعة إنزيم (zymogen) من سلسلة السيرين بروتياز (حجمه 57 كيلو دالتون والعمر النصفي له من 18–24 ساعة)، وهو الشكل غير الفعال من العامل التاسع، حيث ينشط إلى سيرين بروتياز فعال يرتبط مع فوسفولبيدات الغشاء الخلوي بوجود الكالسيوم ليتحلمه إلى أرجينين– ايزولوسين. يرتبط العامل التاسع الفعال مع العامل العاشر غير الفعال ليحوله إلى عامل عاشر فعال (FXa) (Zhong et al, 2002)، كما يعمل العامل الثامن الفعال كعامل مساعد للعامل التاسع يزيد من تحفيزه ونشاطه.

يتم إنتاج العامل التاسع من الخلايا الكبدية على شكل غير فعال ثم تتم معالجته في الغشاء الهيولي وجهاز غولجي حيث يطرأ عليه عدة تعديلات ما بعد الترجمة تؤدي إلى انشطار لبعض البروتينات، ثم يطرح بالشكل الفعال في الدم. يتم تفعيل العامل التاسع إما بواسطة العامل الحادي عشر في المسار الداخلي للتخثر أو عن طريق العامل السابع الفعال في المسار الخارجي فينشطر البروتين ليشكل سلسلتين عديدات ببتيدية مرتبطة مع بعضها البعض بجسر وحيد ثنائي الكبريت، ويعاد تثبيطه ببطئ بإرتباطه بعدة عوامل وهي مضاد الثرومبين،2–نكسين، بروتين Z المثبط للبروتياز، ومستقبلات داخل خلايا الكبد أو يحطم بواسطة النتروفيل إيلاستاز (Howard et al, 2007).

تقع مورثة العامل التاسع على الصبغي الجنسي X، وتحتوي على 8 إكسونات ويبلغ طولها 33.5 كيلو شفع أساس، ويمكن للطفرات في مواقع متعددة للمورثة أن تسبب اضطرابات في النزف تسمى مرض الناعور ب (Green et al, 1989).

يحدث المرض بنسبة مريض 1 لكل 30 ألف مريض رجل، وهو ما يعادل تقريبا 20% من جميع حالات الناعور. في بعض الحالات، إذا كانت الطفرة في المنطقة البادئة للجين (promoter region) تؤدي إلى مرض ناعور قليل الخطورة مقارنة بحدوث الطفرة من مناطق أخرى (Reitsma et al, 1998)، حيث تشخص هذه

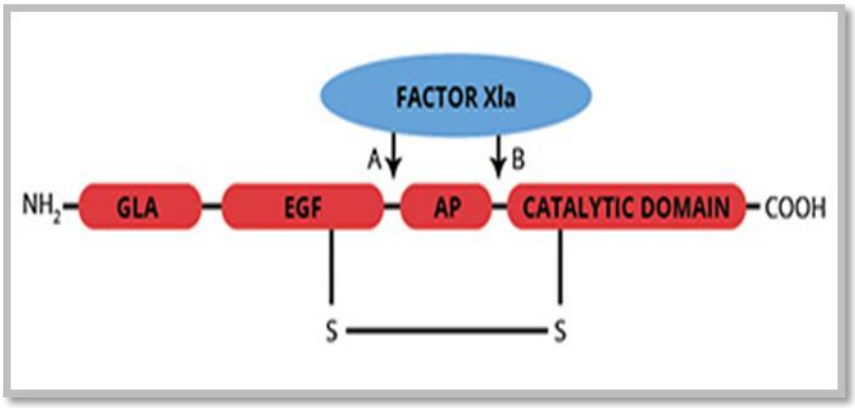
الحالة بغياب كامل للعامل التاسع في مرحلة الطفولة وإعادة ظهوره تدريجيا في مراحلة البلوغ حتى يصل تقريبا للقيمة الطبيعية.

المعالجة الوحيدة والحالية للمرض هو معاوضة البروتين المفقود وهي مكلفة جدا، بحيث يتلقى فقط 20 % من المرضى المصابين في العالم العلاج، بينما لا يزال الناعور يشكل مرضاً مميتاً خاصة في مرحلة الطفولة في المجتمعات الفقيرة.

2-1- بنية بروتين عامل التخثر التاسع البشري:

تتألف البنية الأولية للعامل التاسع من أربعة أقسام:

- القسم الأول يسمى GLA يحوي نهاية حمض الغلوتاميك كاربوكسي غاما الحاوي على NH_2، وهي تحوي على 12 ثمالة حمض الغلوتاميك والتي تتحول إلى غاما كاربوكسي حمض الغلوتاميك عند التحول للشكل الفعال والتي تعمل على تسهيل ارتباط العامل التاسع مع سطح الفوسفولبيدات بوجود شوارد الكالسيوم.
- القسم الثاني يسمى EGF يحوي على سلسلتين مشابهتين لعامل النمو للبشرة (epidermal growth factor)، تمتدان على طول المنطقة المحصورة بين النهاية NH_2 و الـ AP .
- القسم الثالث يسمى AP وهو عبارة عن ببتيد فعال يتم تحرره عندما يتحول الزيموجين إلى سيرين بروتياز فعال.
- القسم الرابع يسمى CATALYTIC DOMAIN وهو عبارة عن ثلاثة ثمالات حموض أمينية تعمل سويةً على تحفيز السيرين بروتياز وهي (Ser-365, His 221, Asp-269).



الشكل 6: البنية الأولية لعامل التخثر التاسع البشري (COAGULATION FACTOR IX)

يتم تفعيل عامل التخثر التاسع إما بواسطة العامل الحادي عشر أو بواسطة معقد الفوسفوليبيد مع العامل السابع والعامل النسيجي، حيث يتم قطع المنطقة A (Arg145–Ala146) ، الموضحة بالشكل 6 فيتحول إلى عامل التاسع نصف الفعال (intermediate IXa) ومن ثم يحدث قطع في المنطقة B (Arg180–Val181) فيتحول إلى العامل التاسع الفعال أو ما يسمى عامل التاسع–بيتا (IXaβ).

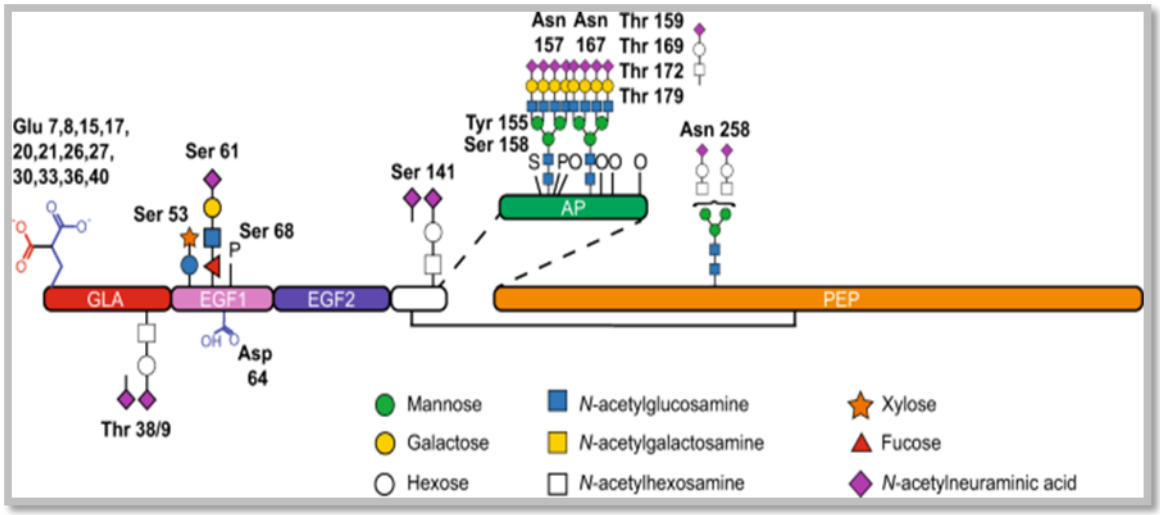
وتنتج عن هذا القطع سلسلتان؛ سلسلة خفيفة 145 حمضاً أمينياً (light chain) تحتوي على منطقة الـ GLA والـ EGF، وسلسلة ثقيلة 236 حمضاً أمينياً (heavy chain) تحتوي على منطقة الـ CATALYTIC DOMAIN. ويتم ربط السلسلتين مع بعضهما بواسطة جسر ثنائي الكبريت disulfide bond، وتتحرر قطعة 35 حمضاً أمينياً تمثل الببتيد الفعال AP (الشكل 7).

يعتبر العامل التاسع الفعال (IXaβ) أحد مكونات المعقد المحفز للعامل العاشر (factor VIIIa/IXa/Ca2+/phospholipid) والذي يعمل على تحويله إلى العامل العاشر المفعل (FXa).

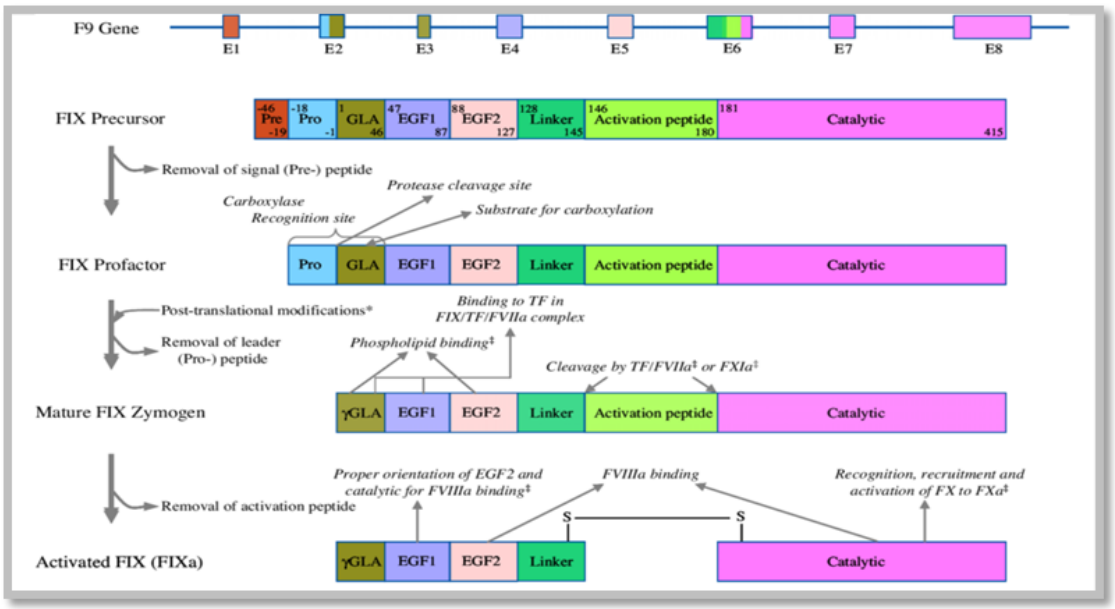
2-2- البنية الجزيئية لعامل التخثر التاسع البشري:

توجد سلسلتان مرجعيتان للدنا الجينومي للعامل التاسع البشري والتي تعطي سلسلتين متغايرتين من الدنا الفعال cDNA المنسوخ من الرنا المرسال. تتألف سلسلة الدنا كاملةً من 38 كيلو شفع أساس ممثلةً المورثة مع

النهايات اللاحقة عند '5 و '3 وتمثل المورثة لوحدها 33,5 كيلو شفع أساس تتضمن سبعة إنترونات وثمانية إكسونات. تشكل الإكسونات الثمانية مجتمعةً السلسلة قبل الناضجة للسلسلة الرئيسة (prepro leader sequence) مع 415 حمضاً أمينياً، ومن ثم تتحول للسلسة القبلية ومنه إلى طليعة الإنزيم الممثل للشكل غير الفعال للعامل التاسع، والذي يتم طرحه بالدم ويتحول عند حدوث أذية وعائية إلى الشكل الفعال (الشكل 8).



الشكل 7: الشكل الفعال للعامل التاسع البشري (Zacchi et al, 2021)



الشكل رقم 8، مراحل تطور السلسلة البدائية من العامل التاسع البشري (Chavali et al, 2011)

وتوجد سلسلتان متغايرتان من التسلسل النكليوتيدي للدنا الجينومي (الإكسونات فقط) للعامل التاسع البشري؛ تسمى الأولى متغاير النسخ 1 (transcript variant 1) والثانية متغاير النسخ 2(transcript variant 2). تتألف الأولى من 2800 شفع أساس وتقدر المنطقة الفعالة والمرمزة لبروتين عامل التخثر التاسع ب 1386 شفع أساس:

```
   1 actttcacaa tctgctagca aaggttatgc agcgcgtgaa catgatcatg gcagaatcac
  61 caggcctcat caccatctgc cttttaggat atctactcag tgctgaatgt acagtttttc
 121 ttgatcatga aaacgccaac aaaattctga atcggccaaa gaggtataat tcaggtaaat
 181 tggaagagtt tgttcaaggg aaccttgaga gagaatgtat ggaagaaaag tgtagttttg
 241 aagaagcacg agaagttttt gaaaacactg aaagaacaac tgaattttgg aagcagtatg
 301 ttgatggaga tcagtgtgag tccaatccat gtttaaatgg cggcagttgc aaggatgaca
 361 ttaattccta tgaatgttgg tgtccctttg gatttgaagg aaagaactgt gaattagatg
 421 taacatgtaa cattaagaat ggcagatgcg agcagttttg taaaaatagt gctgataaca
 481 aggtggtttg ctcctgtact gagggatatc gacttgcaga aaaccagaag tcctgtgaac
 541 cagcagtgcc atttccatgt ggaagagttt ctgtttcaca aacttctaag ctcacccgtg
 601 ctgagactgt ttttcctgat gtggactatg taaattctac tgaagctgaa accattttgg
 661 ataacatcac tcaaagcacc caatcattta atgacttcac tcgggttgtt ggtggagaag
 721 atgccaaacc aggtcaattc ccttggcagg ttgttttgaa tggtaaagtt gatgcattct
 781 gtggaggctc tatcgttaat gaaaaatgga ttgtaactgc tgcccactgt gttgaaactg
 841 gtgttaaaat tacagttgtc gcaggtgaac ataatattga ggagacagaa catacagagc
 901 aaaagcgaaa tgtgattcga attattcctc accacaacta caatgcagct attaataagt
 961 acaaccatga cattgccctt ctggaactgg acgaaccctt agtgctaaac agctacgtta
1021 cacctatttg cattgctgac aaggaataca cgaacatctt cctcaaattt ggatctggct
1081 atgtaagtgg ctggggaaga gtcttccaca aagggagatc agctttagtt cttcagtacc
1141 ttagagttcc acttgttgac cgagccacat gtcttcgatc tacaaagttc accatctata
1201 acaacatgtt ctgtgctggc ttccatgaag gaggtagaga ttcatgtcaa ggagatagtg
1261 ggggacccca tgttactgaa gtggaaggga ccagtttctt aactggaatt attagctggg
1321 gtgaagagtg tgcaatgaaa ggcaaatatg gaatatatac caaggtatcc cggtatgtca
1381 actggattaa ggaaaaaaca aagctcactt aatgaaagat ggatttccaa ggttaattca
1441 ttggaattga aaattaacag ggcctctcac taactaatca ctttcccatc ttttgttaga
1501 tttgaatata tacattctat gatcattgct ttttctcttt acaggggaga atttcatatt
1561 ttacctgagc aaattgatta gaaaatggaa ccactagagg aatataatgt gttaggaaat
1621 tacagtcatt tctaagggcc cagcccttga caaaattgtg aagttaaatt ctccactctg
1681 tccatcagat actatggttc tccactatgg caactaactc actcaatttt ccctccttag
1741 cagcattcca tcttcccgat cttctttgct tctccaacca aaacatcaat gtttattagt
1801 tctgtataca gtacaggatc tttggtctac tctatcacaa ggccagtacc acactcatga
1861 agaaagaaca caggagtagc tgagaggcta aaactcatca aaaacactac tccttttcct
1921 ctaccctatt cctcaatctt ttacctttтc caaatcccaa tccccaaatc agtttttctc
1981 tttcttactc cctctctccc ttttaccctc catggtcgtt aaaggagaga tggggagcat
2041 cattctgtta tacttctgta cacagttata catgtctatc aaacccagac ttgcttccgt
2101 agtggagact tgcttttcag aacataggga tgaagtaagg tgcctgaaaa gtttgggggа
2161 aaagtttctt tcagagagtt aagttatttt atatatataa tatatatata aaatatataa
2221 tatacaatat aaatatatag tgtgtgtgta tgcgtgtgtg tagacacaca cgcatacaca
2281 catataatgg aagcaataag ccattctaag agcttgtatg gttatggagg tctgactagg
2341 catgatttca cgaaggcaag attggcatat cattgtaact aaaaaagctg acattgaccc
2401 agacatattg tactctttct aaaaataata ataataatgc taacagaaag aagagaaccg
2461 ttcgtttgca atctacagct agtagagact ttgaggaaga attcaacagt gtgtcttcag
2521 cagtgttcag agccaagcaa gaagttgaag ttgcctagac cagaggacat aagtatcatg
2581 tctcctttaa ctagcatacc ccgaagtgga gaagggtgca gcaggctcaa aggcataagt
2641 cattccaatc agccaactaa gttgtccttt tctggtttcg tgttcaccat ggaacatttt
2701 gattatagtt aatccttcta tcttgaatct tctagagagt tgctgaccaa ctgacgtatg
2761 tttccctttg tgaattaata aactggtgtt ctggttcata
```

بينما تتألف الثانية من 2686 شفع أساس وتقدر المنطقة الفعالة والمرمزة لبروتين عامل التخثر التاسع بـ 1272 شفع أساس.

```
   1 actttcacaa tctgctagca aaggttatgc agcgcgtgaa catgatcatg gcagaatcac
  61 caggcctcat caccatctgc cttttaggat atctactcag tgctgaatgt acagtttttc
 121 ttgatcatga aaacgccaac aaaattctga atcggccaaa gaggtataat tcaggtaaat
 181 tggaagagtt tgttcaaggg aaccttgaga gagaatgtat ggaagaaaag tgtagttttg
 241 aagaagcacg agaagttttt gaaaacactg aaagaacaac tgaattttgg aagcagtatg
 301 ttgatgtaac atgtaacatt aagaatggca gatgcgagca gttttgtaaa aatagtgctg
 361 ataacaaggt ggtttgctcc tgtactgagg gatatcgact tgcagaaaac cagaagtcct
 421 gtgaaccagc agtgccattt ccatgtggaa gagtttctgt ttcacaaact tctaagctca
 481 cccgtgctga gactgttttt cctgatgtgg actatgtaaa ttctactgaa gctgaaacca
 541 ttttggataa catcactcaa agcacccaat catttaatga cttcactcgg gttgttggtg
 601 gagaagatgc caaaccaggt caattccctt ggcaggttgt tttgaatggt aaagttgatg
 661 cattctgtgg aggctctatc gttaatgaaa aatggattgt aactgctgcc cactgtgttg
 721 aaactggtgt taaaattaca gttgtcgcag gtgaacataa tattgaggag acagaacata
 781 cagagcaaaa gcgaaatgtg attcgaatta ttcctcacca caactacaat gcagctatta
 841 ataagtacaa ccatgacatt gcccttctgg aactggacga acccttagtg ctaaacagct
 901 acgttacacc tatttgcatt gctgacaagg aatacacgaa catcttcctc aaatttggat
 961 ctggctatgt aagtggctgg ggaagagtct tccacaaagg gagatcagct ttagttcttc
1021 agtaccttag agttccactt gttgaccgag ccacatgtct tcgatctaca aagttcacca
1081 tctataacaa catgttctgt gctggcttcc atgaaggagg tagagattca tgtcaaggag
1141 atagtggggg accccatgtt actgaagtgg aagggaccag tttcttaact ggaattatta
1201 gctggggtga agagtgtgca atgaaaggca aatatggaat atataccaag gtatcccggt
1261 atgtcaactg gattaaggaa aaaacaaagc tcacttaatg aaagatggat ttccaaggtt
1321 aattcattgg aattgaaaat taacagggcc tctcactaac taatcacttt cccatctttt
1381 gttagatttg aatatataca ttctatgatc attgcttttt ctctttacag gggagaattt
1441 catattttac ctgagcaaat tgattagaaa atggaaccac tagaggaata taatgtgtta
1501 ggaaattaca gtcatttcta agggcccagc ccttgacaaa attgtgaagt taaattctcc
1561 actctgtcca tcagatacta tggttctcca ctatggcaac taactcactc aattttccct
1621 ccttagcagc attccatctt cccgatcttc tttgcttctc caaccaaaac atcaatgttt
1681 attagttctg tatacagtac aggatctttg gtctactcta tcacaaggcc agtaccacac
1741 tcatgaagaa agaacacagg agtagctgag aggctaaaac tcatcaaaaa cactactcct
1801 tttcctctac cctattcctc aatcttttac cttttccaaa tcccaatccc caaatcagtt
1861 tttctctttc ttactccctc tctccctttt accctccatg gtcgttaaag gagagatggg
1921 gagcatcatt ctgttatact tctgtacaca gttatacatg tctatcaaac ccagacttgc
1981 ttccgtagtg gagacttgct tttcagaaca tagggatgaa gtaaggtgcc tgaaaagttt
2041 gggggaaaag tttctttcag agagttaagt tattttatat atataatata tatataaaat
2101 atataatata caatataaat atatagtgtg tgtgtatgcg tgtgtgtaga cacacacgca
2161 tacacacata taatggaagc aataagccat tctaagagct tgtatggtta tggaggtctg
2221 actaggcatg atttcacgaa ggcaagattg gcatatcatt gtaactaaaa aagctgacat
2281 tgacccagac atattgtact ctttctaaaa ataataataa taatgctaac agaaagaaga
2341 gaaccgttcg tttgcaatct acagctagta gagactttga ggaagaattc aacagtgtgt
2401 cttcagcagt gttcagagcc aagcaagaag ttgaagttgc ctagaccaga ggacataagt
2461 atcatgtctc ctttaactag catacccga agtggagaag ggtgcagcag gctcaaaggc
2521 ataagtcatt ccaatcagcc aactaagttg tccttttctg gtttcgtgtt caccatggaa
2581 cattttgatt atagttaatc cttctatctt gaatcttcta gagagttgct gaccaactga
2641 cgtatgtttc cctttgtgaa ttaataaact ggtgttctgg ttcata
```

3- الأمراض الناتجة عن خلل في مراحل تخثر الدم:

3-1- اضطرابات في عملية التخثر بسبب عيوب في مرحلة الإرقاء الأولي:

تحدث تشوهات في جدار الوعاء الدموي، أو تسبب نقصاً كمياً أو وظيفياً في الصفيحات الدموية يؤدي في النهاية إلى النزف بمستويات مختلفة الشدة.

قد يحدث نقص في عدد الصفيحات الدموية (Thrombocytopenia) وهو من الأمراض الوراثية نادرة الحدوث تسبب اضطرابات في الصفيحات الدموية، ويمكن تشخيصها في مرحلة الطفولة ويحتاج معظم مرضاها إلى نقل صفيحات فقط قبل وبعد أي عمل جراحي.

قد تحدث اضطرابات وراثية بسبب نقص البروتينات السكرية للصفيحات، كنقص (IIb/IIIa) والذي يسبب مرض غلانزمان Glanzmann thromboasthenia، ونقص البروتين السكري (Ib) ويسبب متلازمة بيرنار (Bernard–Soulier syndrome) (Yenicesu et al, 2002) و (Colvin, 2004). كما يمكن أيضاً لنقل الدم للمريض بكميات كبيرة أو تبديل كامل دم المريض خلال 24 ساعة أن يسبب اضطرابات نزفية بسبب عوز الدم المنقول للصفيحات الوظيفية وعوامل التخثر الفعالة (الجدول 4).

3-2- اضطرابات في عملية التخثر بسبب عيوب في مرحلة الإرقاء الثانوي:

في الحالة الفيزيولوجية الطبيعة هنالك توازن محكم بين النزف وتشكل الخثرة، وبالتالي أي حالة مرضية يمكن أن تخل في هذا التوازن وتقود إما لحالة نزف غير مضبوط أو تشكل جلطات معقدة.

الجدول 4: الأمراض الناتجة عن اضطرابات في مرحلة الإرقاء الأولي

Bleeding disorders due to vessel wall abnormalities
Septicaemia
Drug reactions
Scurvy and the Ehlers-Danlos syndrome
Henoch-Schönlein purpura
Perivascular amyloidosis
Bleeding disorders due to reduced platelet number (thrombocytopenia)
Leading to decreased production
Vitamin B12 deficiency
Aplastic anaemia
Leukaemia
Chromic immune thrombocytopenic purpura
Leading to decreased platelet survival
Acute immune thrombocytopenic purpura
Systemic lupus erythematosus
Drug-associated: Quinidine, heparin, sulpha compounds
Infections: HIV, dengue fever
Hypersplenism
Bleeding disorders due to decreased platelet function
Inherited
Bernard-Soulier syndrome (deficiency of platelet glycoprotein Ib)
Glanzmann thrombasthenia (deficiency of platelet glycoprotein IIb/IIIa)
Acquired
Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs
Uraemia
Massive blood transfusion

(Palta et al, 2004)

3-2-1- اضطرابات تؤدي إلى نزف الدم:

- الأمراض المتعلقة بالناعور:
  - الناعور أ (Haemophilia A) وهو الشكل الأكثر شيوعا في معظم حالات الناعور ويحدث بسبب عوز بالعامل التخثر الثامن.

- الناعور ب (Haemophilia B) يحدث بسبب عوز عامل التخثر التاسع.
- الناعور سي (Haemophilia C) يشكل 1% من حالات الناعور ويحدث بسبب عوز عامل التخثر الحادي عشر، وهو مرض وراثي ينتقل عن طريق الجنس مرتبط بالصبغي X كصفة متنحية ويصيب الرجال بنسبة أكبر، وتحدد نسبة خطورة النزف بحسب مستوى عوامل التخثر المتواجدة (Martlew VJ , 2000) .
- مرض فون وليبراند (Von Willebrand disease) وهو من أشهر أمراض التخثر الوراثية، يحدث بسبب عوز عامل فون ويلبراند (vWF) كمياً أو وظيفياً، والذي يعمل كجزيء حامل لعامل التخثر الثامن مما يؤثر على ثبات العامل الثامن.

يتم تشخيص الحالة المرضية بملاحظة تطاول في زمن النزف رغم تواجد كمية وافرة من الصفيحات الدموية، وتعالج عرضيا إما بالعوامل المضادة لتحلل الفبرين أو حمض الترانكساميك في حالات النزف الطفيفة كما يمكن إعطاء دواء الديسموبريسين د والأرجنين والفاسوبريسين قبل العمليات الجراحية لتوقع عملها على رفع مستوى عامل التخثر الثامن عند المرضى المصابين باضطرابات كمية من العامل الثامن (Martlew, 2000).

- الأمراض المتعلقة بعوز الفبرينوجين:

يمكن أن يكون العوز جزئياً أو كلياً، وهي تعتبر من الحالات الوراثية النادرة جدا.

- مرض الفيبرنوجينيميا (Afibrinogenemia): هو أقل أمراض عوز الفبرينوجين خطورة ويمكن أن يكون محتملاً لدى المريض، حيث يظهر على شكل ورم دموي تحت الجلد أو ورم دموي مخفي في مرحلة الولادة (Roberts et al, 2001).
- مرض التخثر المنتشر داخل الأوعية (DIC): وهو حالة مرضية مكتسبة شائعة الحدوث وذلك بسبب إستهلاك زائد لعوامل التخثر بالمشاركة مع ندرة الصفيحات الدموية، مما يؤدي إلى حدوث انسداد في

الأوعية الدموية الصغيرة. ومن الأسباب الشائعة لهذا المرض الإنتانات والالتهابات الدموية، نقل دم غير ملائم، الصدمات والصمات المتكررة.

- الأمراض المتعلقة بالكبد:

يعتبر الكبد المصنع لمعظم عوامل التخثر بالإضافة لإستقلاب عوامل التخثر الفعالة والعوامل الحالة للفبرين، وبالتالي عند حدوث أي أذية كبدية شديدة يمكن أن تؤثر سلباً على حدوث التخثر.

- انخفاض حرارة الجسم (Hypothermia):

له دور مؤثر على عمل التخثر وخاصة في حالات حماضات الدم، حيث يحدث فشل في عمل الصفيحات عند درجة حرارة 35° س و في درجات حرارة أقل من 33 ° س ينقص مستوى إنزيمات التخثر والإنزيم المثبط للبلازمينوجين (الجدول 5) (Polderman, 2012).

3-2-2- أمراض تؤدي إلى تشكل الخثرات الدموية (Thrombotic Disorders):

يزداد تركيز بعض عوامل التخثر (factor V, VII, VIII, IX, fibrinogen) مع التقدم في العمر (Franchini, 2006)، وكذلك الأمر بالنسبة لعامل فونوليراند vWF (Coppola et al, 2003)، وبالتالي الاحتمالية العالية للإصابة بأمراض القلبية الوعائية عند كبار السن تكون ربما بسبب زيادة تركيز الفيبرينوجين بالبلازما والذي يؤدي إلى زيادة ترابط الصفيحات الدموية وزيادة حدوث الخثرات وزيادة لزوجة الدم (Previtali et al, 2011)

- الثرومبوفيليا (thrombophillia) مصطلح يقال على جميع حالات التجلط المكتسبة.

أيضا هنالك عوامل عديدة تساهم في حدوث الجلطات مثل التدخين، السمنة، الحمل، السرطانات، العمليات الجراحية، واستخدام حبوب منع الحمل الفموية (Pinjala et al, 2012)

- يؤدي عوز إنزيم ATIII إلى انخفاض بروتين سي وبروتين س ويزيد من احتمالية تكون الجلطات سواء كان بسبب وراثي أو بسبب نقص فيتامين K، المعالجة بالوارفارين، الحمل وحالات تنخر والتهاب الكبد.

يمكن أن يحدث خلال الحمل انسداد بالوريد الأجوف السفلي بسبب الضغط من الرحم يترافق بزيادة في تركيز عوامل التخثر، الفيبرينوجين وعامل فون فيلبراند . أيضاً سجلت حالات انخفاض في نشاط البروتين س ومقاومة مباشرة للروتين سي، بالإضافة إلى فشل في عمل نظام حل الفبرين. جميع هذه الاضطرابات تزيد من احتمالية تكون الجلطات الدموية (Thornton and Douglas, 2010).

تنشأ خلال مرحلة ما بعد العمل الجراحي ونقص الحركة والجمود فترة طويلة حالة من نقص الأكسجة الموضعي وهذا يؤدي إلى زيادة تركيز العامل النسيجي TF مما يزيد احتماليه تكون الجلطات الدموية، (Coppola et al, 2003)، وكذلك بالنسبة للساعة الأولى من العمل الجراحي يرتفع تركيز الـ TF والمفعل للبلازمينوجين tPA و العامل فون ويلبراند vWF مما يزيد من احتمالية تكون الجلطات الدموية (الجدول 5).

3-3- اضطرابات في النزف بسبب عيوب في نظام حل الفبرين:

تكون الأمراض الوراثية المتعلقة بفشل عمل نظام حل الفبرين نادرة جداً. سُجلت حالات تفاقم في عمل منظومة حل الفبرين وبالتالي زيادة احتمالية النزف وخاصة في حالة المجازة القلبية الرئوية (cardiopulmonary bypass)، كما لوحظت زيادة في عمل منظومة حل الفبرين في حالات الرضوح، تنخر الكبد، انصمام السائل الأمينوسي، ورم نقي متعدد، لدغة الثعبان وحالات تتعلق بتفعيل كبير للـ t-PA والتي تؤدي إلى النزف الكبير أو التنخر المنتشر داخل الأوعية DIC (الجدول 5)(Ejiofor, 2013).

الجدول 5: الأمراض المكتسبة والوراثية التي تؤدي لنزف الدم أو تشكل الخثرات

Bleeding disorders	Thrombotic disorders (thrombophilia)
Hereditary	Hereditary
Von Willebrand disease	Hereditary thrombophillia
Haemophilia A	Antithrombin III deficiency
Haemophilia B	Protein C deficiency
Haemophilia C	Protein S deficiency
Factor V deficiency	Factor V Leiden (factor V mutation)
Factor X deficiency	Prothrombin mutation (Gene 20210A mutation)
Factor VII deficiency	
Factor XIII deficiency	
Prothrombin deficiency	
Afibrinogenemia	
Acquired	Acquired
Consumptive coagulopathies	Antiphospholipid antibody syndrome
DIC	Increased levels of factors VIII, IX, XI, or fibrinogen
Microangiopathic haemolytic anemias	Fibrinolysis defects
Vitamin K deficiency	Homozygous homocystinuria
Liver disease	

DIC – Disseminated intravascular coagulation

(Palta et al, 2004)

4- مرض نزف الدم الوراثي (الناعور):

نزف الدم الوراثي أو الناعور، ويسمى أيضاً الهيموفيليا، هو من الأمراض الوراثية الخطيرة التي تؤدي إلى حدوث إضطرابات في تخثر الدم وتوقف النزف، وبالتالي نزف الدم لفترات أطول (Berntorp and Shapiro, 2012).

أتت تسميته بالهيموفيليا من كلمتين الهيمو وتعني الدم وفيليا وتعني الحب وهي تعتبر من أكثر أمراض نزف الدم شيوعاً وخطورةً (Rogaev et al, 2009).

هنالك ثلاثة أنواع من الهيموفيليا:

- الناعور أ (hemophilia A) : والذي يحدث بسبب نقص عامل التخثر الثامن البشري.
- الناعور ب (hemophilia B): والذي يحدث بسبب نقص عامل التخثر التاسع البشري.

ويعتبر الناعور أ وب هما أكثر حالات الناعور خطورةً، حيث يسببان نزفاً شديداً ولفترة زمنية طويلة إثر أي إصابة طفيفة أو حتى بدون إصابات.

- الناعور سي (hemophilia C): والذي يحدث بسبب نقص عامل التخثر الحادي عشر البشري وهو نادر جداً.
- الناعور المكتسب (acquired hemophilia): الذي ينتج بسبب نقص في عوامل التخثر من حيث العدد أو الجودة وخاصة عند الأطفال حديثي الولادة أو كبار السن والذي يختفي فورا بعد أول علاج له (Schramm, 2014).

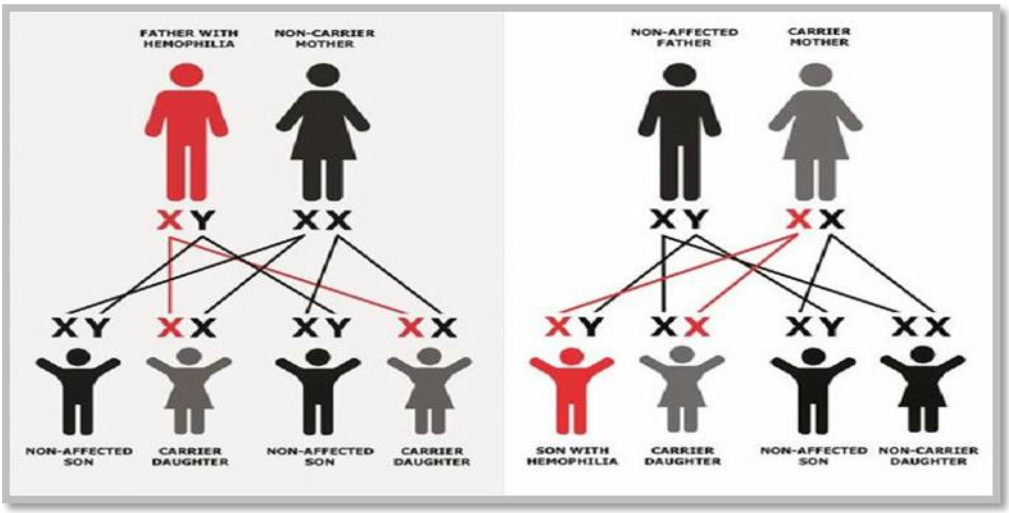
أيضا سمي مرض الناعور بداء الملوك حيث اكتشف في نسل الملكة فيكتوريا ملكة انجلترا، وتم تسجيل أول حالتين في العصور الوسطى لوفاة طفلين بعد عملية الختان لهم (Salen and Babiker, 2021).

وأقدم وصف للمرض في العصور الوسطى من قبل الطبيب الأميركي جون كونراد، حيث تحدث أن هنالك مرض نزفي وراثي في عدة عائلات، إذ وجد الصبيين المولودين من أم غير مصابة مصابين وأطلق عليهم اسم "النازفون". أما مصطلح الهيموفيليا فتم إدراجه رسميا من الدكتور NAS الذي نشر مقال يشرح فيه وصف جيني مفصل للهيموفيليا وأصدر قانون ناس الذي ينص على أن الهيموفيليا لا ينتقل إلا من أم غير مصابة إلى أبنائها الصبية (Kruse-Jarres et al, 2017).

يعود سبب الهيموفيليا إلى نقص في عوامل تخثر الدم، حيث ينتج إما عن عيب أو طفرة في المورثات المعبرة عن عوامل التخثر، وهنالك حوالي الـ 1000 طفرة في المورثة المعبرة عن العامل الثامن والعامل التاسع ويكون حوالي 30% من هذه الطفرات بسبب طفرات تلقائية (spontaneous mutation).

تقع المورثة المعبرة عن عاملي التخثر الثامن والتاسع في الساق الطويلة للصبغي X، وعند زواج أب مصاب مع أم سليمة تكون كامل الإناث حاملات للمرض والذكور غير مصابين أبداً. والإناث الحاملات للمرض 50% من الذكور المنجبين منهن مصابين و 50% من الإناث المنجبات منهن حاملات للمرض، وبالتالي المرض

لايصيب إلا الذكور (Zimmerman and Valentino, 2013). مع ذلك، قد يصيب الإناث بحالات نادرة، كمتلازمة تيرنر (غياب كلي أو جزئي للصبغي X وبالتالي سيادة الصفة المتنحية) أو بحالة زواج أب وأم مصابين أو زواج أب مصاب مع زوجة حاملة للمرض(Bertamino et al, 2017) (الشكل 9).



الشكل رقم 9، إنتقال الصفة المتنحية من أب مصاب وأم سليمة أو أب سليم و أم حاملة للمرض (Eveline et al, 2020)

4-1- توزع و انتشار المرض:

يعد الناعور من الأمراض المنتشرة بشكل متساوٍ تقريبا في كل الأعراق وكل بقاع العالم. وتقدر نسبة المرض بمريض واحد لكل 10000 مولود حي، ويقدر عدد المصابين حول العالم بـ 400000 مصاباً، (Stonebraker et al, 2010). ويعتبر الناعور أ أكثر انتشاراً ويقدر بحوالي (80- 85 %) من جميع حالات الناعور.

تقدر نسبة الإصابة بالناعور أ بمصاب واحد لكل 5000 مولود ذكر حي بينما الناعور ب يقدر بمصاب واحد لكل 30000 مولود ذكر حي. وباعتباره مرتبطاً بالجنس، تزداد نسبة الإصابة في المناطق التي يكثر فيها زواج الأقارب (Llinás, 2010) و (Berntorp and Shapiro, 2012). أما الناعور سي فتقدر نسبة إصابته بمصاب واحد لكل 100000 شخص سليم، بينما تقدر نسبة الإصابة لدى اليهود الأشكيناز بالناعور سي حوالي الـ 8 % (Tonbary et al, 2010).

4-2- تشخيص مرض الناعور ب:

يشخص المرض بنقص في كمية ونشاط عامل التخثر التاسع البشري التي تؤدي إلى إرتشاحات ونزوف للجروح بعد قلع الأسنان وبعد العمل الجراحين والتي تطول قبل أن يحدث التئام للجروح.

وتختلف نسبة النزف وتكرارها وخطورتها بحسب نسبة فعالية العامل التاسع كالآتي:

- الناعور ب الشديد: يشخص عادة بنزوفات عميقة ومفاجئة في المفاصل والعضلات، ويتم الكشف عن المرض في أول سنتين من عمر المريض، ويعاني المريض من اثنين إلى خمسة نزوفات مفاجئة وتلقائية بالشهر الواحد.
- الناعور ب متوسط الشدة: لا يعاني المريض من نزوفات مفاجئة وعفوية، ولكن عند حدوث أي أذية طفيفة يمكن أن تؤدي إلى إرتشاحات ونزف لفترات طويلة، ويتم الكشف عنه في السن الخامس أو السادس من العمر، وتقدر نسبة النزف من مرة واحدة كل شهر وقد تصل إلى مرة واحدة بالسنة.
- الناعور ب الخفيف: لايعاني المريض من أي نزف عفوي، ويحدث النزف فقط عند أي عمل جراحي أو قلع للأسنان، ونسبة النزف تقدر مرة واحدة بالسنة أو مرة واحدة كل 10 سنوات، وقد يتم الكشف عن وجود المرض بمراحل متقدمة من العمر.

وبشكل عام، تكون نسبة تكرار النزف عند جميع مرضى الناعور أعلى في مرحلة الطفولة ومرحلة الشيخوخة، بينما تقل في مرحلة الشباب. أما بالنسبة للإناث المصابات بالمرض، فهنالك 30% منهن لديهن نسبة نشاط عامل التخثر التاسع أقل من 40 % وهي على خطورة عالية من النزف حتى ولو كنّ مصابات بالناعور ب الخفيف، حيث أن التعرض لكدمات كبيرة وجروح بالغة يؤدي إلى نزف شديد وعالي الخطورة بغض النظر عن حدة المرض.

4-3- طرق علاج الناعور ب :

يصنع عامل التخثر التاسع البشري من خلايا الكبد ويكون على شكل سلسة عديدة الببتيد وحيدة ثم يطرأ عليها تعديلات مابعد الترجمة (انشطار بسلسلة الببتيد – تشكل الجسر ثنائي الكبريت – غلكزة glycosylation – كربكسلة carboxylation لحمض الغلوتاميك بوجود فيتامين k – هدركسلة بيتا beta–hydroxylation – شطر لببتيد الإشارة) (Kurachi et al, 1993) و (Mann, 1999)، حيث يتم تفعيل العامل التاسع من قبل العامل الحادي عشر أو العامل السابع والذي بدورة يرتبط مع العامل الثامن الفعال والفوسفولبيدات بوجود شاردة الكالسيوم ليشكل معقد التيناز الذي يفعل العامل العاشر.

وبالتالي، يؤدي النقص بتركيز وفعالية عامل التخثر التاسع البشري إلى تراجع وظيفي في تشكل معقد التيناز وبالتالي نقص في إنتاج الثرومبين الذي ينتهي بتشكل خثرة دموية ثابتة (Mann, 1999) و (Oldenburg and Schwaab, 2001).

يعالج الناعور ب إما بتعويض الفاقد الدموي لعامل التخثر التاسع الفعال عند حدوث النزف (علاج لحظي) أو عن طريق إعطاء جرعات من العامل التاسع مجدولة عدة مرات بلاسبوع كمعالجة وقائية (Franchini et al, 2012). في عام 1992، تم الحصول على عامل التخثر التاسع المشتق من البلازما (pdFIX) والذي حسّن تدريجيا من متوسط العمر المتوقع لمرضى الناعور ب أو ما يقارن بتحسن جودة الحياة quality of life (QOL)، مما سمح من رفع نسبة الأمان في العمليات الجراحية خاصة عمليات تقويم العظام (Mannucci, 2008) و (Mannucci, 2003). وتم إعتماد المعالجة الوقائية البدائية (30–40 وحدة دولية لكل1 كغ مرتين أسبوعياً) كأفضل معالجة مثالية لمرضى الناعور ب شديد الخطورة، وذلك لمنع حدوث نزوفات بالمفاصل والجروح وبالتالي تحسين جودة الحياة للمرضى. يجب أن يكون تركيز العامل التاسع بالبلازما عند مرضى الناعور ب من 60–80 وحدة/ كغ في حالات النزف الشديدة ومن 20–40 وحدة/ كغ في حالات النزف الصغيرة (الجدول 6).

الجدول 6: الجرعات الموصوفة للوقاية ولمنع حدوث النزف عند مرضى الناعور ب

Recommended dosages of factor IX (FIX) concentrates for the treatment or prevention of bleeding episodes in hemophilia B patients

Type of hemorrhage	FIX dose (U/kg)
Mild or moderate hemarthroses or hematomas	20–40
Severe hemarthroses or hematomas	40–60
External bleeding with anemia	
Moderate posttraumatic bleeding	
Cranial trauma	50–100*
Cerebral hemorrhage	
Surgery prophylaxis	
Primary prophylaxis	30–40 (two times weekly)

Note:

*For surgical prophylaxis, FIX levels should be maintained above 50% for 7–15 days after surgery.

(Massimo et al, 2013)

هنالك العديد من المنتجات للعامل التاسع المشتقة من البلازما وبطرق عالية النقاوة (high–purity pdFIX) والتي تم الموافقة على طرحها بالاسواق كعلاج للناعور ب (الجدول 7). وتم العمل على تحسين الأمان والفعالية لهذه المنتجات في السنوات الأخيرة السابقة، حيث تم إعتماد خطوات عديدة في تنقية وتثبيط الفيروسات ولكن هنالك بعض المخاوف من البريونات والفيروسات المجردة من الغلاف، (Azzi, 1992) و (Ludlam and Turner, 2006) والتي قد تسبب إنتانات دموية.

في عام 1982، تم البدء بالعمل على تنسيل مورثة عامل التخثر التاسع (Kurachi and Davie, 1982) و (Choo et al , 1982)، مما دفع إلى العمل على التحوير الوراثي لخلايا مبيض الهامستر الصيني وبالتالي تم الحصول على بروتين عامل التخثر التاسع البشري المؤشب وطرحة بالأسواق عام 1998 (Pipe, 2008). وبما أن تصنيعه تم بدون تواجد بروتينات حيوانية وبشرية في وسط الزرع أو بالشكل النهائي، بالتالي يعتبر آمناً من مخاطر حدوث الانتانات.

الجدول 7: أسماء الأدوية والشركات المصنعة لعامل التخثر التاسع البشري ومصدره وطريقة تنقيته

Characteristics of licensed factor IX concentrates

Brand name	Company	Source	Fractionation
Aimafix®	Kedrion	Plasma	Anion exchange, DEAE Sephadex®/Sepharose®, and heparin affinity chromatography
AlphaNine® SD	Grifols	Plasma	Dual polysaccharide ligand affinity chromatography
Berinin® P	CSL Behring	Plasma	DEAE Sephadex and heparin affinity chromatography
Betafact®	LFB	Plasma	Ion exchange and affinity chromatography
Factor IX Grifols®	Grifols	Plasma	Precipitation and multiple chromatography
Haemonine®	Biotest	Plasma	Anion exchange, immunoaffinity, and hydrophobic interaction chromatography
Hemo-B-RAAS	Shanghai RAAS	Plasma	Ion exchange and affinity chromatography
Immunine®	Baxter BioScience	Plasma	Ion exchange and hydrophobic interaction chromatography
Mononine®	CSL Behring	Plasma	Immunoaffinity chromatography
Nanotiv®	Octapharma	Plasma	Ion exchange and affinity chromatography
Nonafact®	Sanquin	Plasma	Immunoaffinity and hydrophobic interaction chromatography
Octanine F®	Octapharma	Plasma	Ion exchange and affinity chromatography
Replenine®-VF	Bio products laboratory	Plasma	Metal chelate chromatography
TBSF FIX	CSL biotherapies	Plasma	Ion exchange and heparin affinity chromatography
BeneFIX®	Pfizer	Recombinant	Anionic chromatography

(Franchini et al, 2013)

احتل العامل التاسع المؤشب مكانة مرموقة في علاج حالات الناعور ب وأصبح له الأفضلية بالمقارنة مع العامل التاسع المشتق من البلازما، وهنالك منتج رئيسي تم قبوله لعلاج الناعور ب وهو (BeneFIX®; Pfizer, Sandwich, UK) nonacog alfa (Monahan and Di Paola, 2010) (الجدول 7).

4-3-1- دراسات جديدة لتحديث عامل التخثر التاسع المؤشب:

تم تطبيق بعض التعديلات لتحسين من العمر النصفي للعامل التاسع المؤشب، ومنه تقليل عدد الجرعات المعطاة للمرضى. أحد أهم هذه التعديلات هو التعديل بالشكل البوليميري بإضافة بويلي إيتيلين غليكول (PEG) بإستخدام تقنية دمج البروتين مع المنتج، إذ تتم إضافة روابط تشاركية بين الـ PEG إلى البروتين العلاجي، كعامل التخثر التاسع، أو ما أصبح يعرف بالـ PEGylation (Ivens et al, 2013)، إذ يشكل الـ PEG غمامة تحيط

بالبروتين وبالتالي تحميه من التعرض للإنزيمات الحالة للبروتين (proteolytic enzymes)، والمستقبلات الرابطة للبروتين والخلايا المناعية ،(Franchini et al, 2012).

يبلغ حجم العامل التاسع المؤشب المدمج مع الـ PEG (glycoPEGylated rFIX nonacog beta pegol) 40 كيلو دالتون ويعادل العمر النصفي خمسة أضعاف العمر النصفي للعامل التاسع المؤشب (Elm et al, 2009). وقد ظهر تحسن ملحوظ بالحركية الدوائية بالإضافة إلى زيادة في أمان وفعالية الدواء، وتم إعتماد الدواء بشكل خاص في الحالات الوقائية وقبل العمليات الجراحية وفي حالات النزف المتكرر والمطول مع التقليل من عدد الجرعات المستخدمة وتقليل كمية البروتين المستهلك بالمقارنة مع عامل التخثر التاسع المؤشب أو المرتبط بالبلازما.

كما تمت أيضاً إضافة الجزء Fc من الغلوبيولين المناعي G لكل جزيئ من عامل التخثر التاسع المؤشب rFIX وسمي (rFIX–Fc)، تبين أيضا أنه يزيد من زمن تواجد البروتين بالدم والعمر النصفي له يقدر بـ 48 ساعة بالمقارنة بالعمر النصفي للعامل التاسع المؤشب وهو 18 ساعة فقط (Peters et al, 2010) . ولوحظت زيادة في أمان وطول العمر النصفي للدواء بالمقارنة مع الدواء المؤشب لوحدة (Shapiro et al, 2012) و (Santagostino et al, 2012).

أدى أيضا دمج عامل التخثر التاسع المؤشب مع الألبومين إلى زيادة العمر النصفي خمسة أضعاف، وتم تطبيقه على مرضى الذين يعانون من ناعور ب شديد الخطورة (Santagostino et al, 2012) و (Martinowitz and Lubetsky, 2013).

الجزء الثاني

(منهج البحث وإجراءاته)

1- مواد البحث وطرائقه Material and Methods:

1-1- مدة ومكان تنفيذ البحث Duration and Site of Research:

نُفّذ البحث في مخبر التقانات الحيوية الصيدلانية والمناعية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية – وزارة التعليم العالي، خلال الأعوام 2019 - 2022.

1-2- المواد المستخدمة في البحث:

جميع المواد المستخدمة في البحث متواجدة في مخبر التقانات الحيوية الصيدلانية والمناعية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، (الجدول 8).

الجدول 8 ، المواد المستخدمة في تنفيذ البحث

العتيدة	المصدر
TRI Reagent (Total RNA Isolation kit)	Sigma-aldrich, Germany
Revertaid first strand Synthesis kit cDNA	Thermo Scientific, USA
Primers	Macrogen, korea
OnePCR mastermix	GeneDirex, China
PCR Clean Up and Gel Extraction Kit	GeneDirex, China
GeneJET plasmid mimiprep Kit	Thermo Scientific, USA
Restriction Enzymes	Thermo Scientific, USA
T4 DNA ligase	Thermo Scientific, USA
GScript RTase	GeneDirex, China

1-3- الأجهزة :

جميع الأجهزة التي تم إستعمالها لإجراء التجارب متوفّرة في قسم التقانات الحيوية الصيدلانية و المناعية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية وتشمل،(الجدول 9).

الجدول 9 ، الأجهزة المستخدمة في تنفيذ البحث

الجهاز	المصدر
Homogenizing device	Auto Science, China
Water bath	Faithful, China
PCR device	Sensoquest, Germany
Centrifugation device	USA Scientific, USA
Nanodrop	Maestogen, China
Electrophoresis device	Cleaver Scientific, UK
Gel Documentation Device	Cleaver Scientific, UK
Freezer −80 c	JSR, Republic of Korea
Incubator at 37 c	JSR, Republic of Korea
Incubator at 37 c with shaker	JSR, Republic of Korea

1-4- طرائق البحث Research Methods:

1-4-1- الحصول على عينة مناسبة حاوية على المورثة:

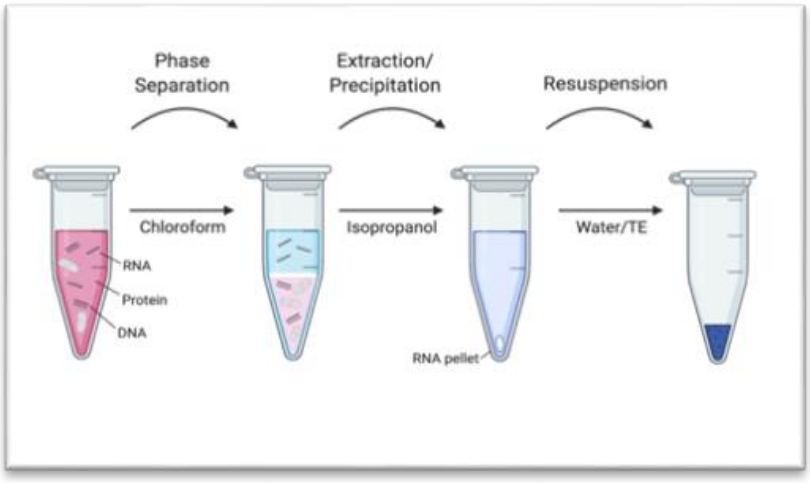
تم التعاون مع شعبة الجراحة الهضمية في مشفى المواساة ومشفى الأسد الجامعي بعد الحصول على الموافقات اللازمة وذلك بقصد الحصول على خزعات كبدية لإستخلاص الرنا المرسال لمورثة عامل التخثر التاسع

البشري وتم حفظ العينات ضمن كاشف RNAse Later وذلك لمنع تخرب الـ RNA ضمن العينة، تم الحصول على سبع خزعات كبدية من مجمل المرضى.

1-4-2- استخلاص ال RNA من خزعة الكبد:

اتُبعت الخطوات التالية لاستخلاص الرنا من الخزعات التسع للكبد لتي تم الحصول عليها:

1. تم تجميد العينة بالآزوت السائل ولذلك ليسهل سحق العينة مع المحافظة على حيويتها.
2. أضيف كاشف ترايزول (Trizol Reagent) لفصل المكونات الدسمة بالطور العلوي الأصفر ليبقى الرنا (RNA) في الطور السفلي الأحمر وتمت مجانسة العينة بإستخدام جهاز التجانس حتى يتم الذوبان الكامل للعينة ثم تركت لمدة 5 دقائق لفصل الطورين.
3. أضيف الكلوروفورم بمقدار 200 ميكروليتر لكل 1 مل ترايزول، لتتشكل ثلاثة أطوار؛ طور مائي حاوي على الرنا RNA، وطور بيني، وطور عضوي يحوي على بروتين ودنا DNA.
4. تم تثفيل العينة، ومن ثم نقل الطور المائي لأنبوب جديد.
5. أضيف الإيزوبروبانول لترسيب الرنا، وتم انتظار 10 دقائق ريثما يتم ترسيب كامل الرنا ومن ثم التثفيل والاحتفاظ بالرسابة المتشكلة.
6. أضيف الايتانول 75% لتنقية الرنا من الشوائب المتبقية وترك ليجف تماماً.
7. أضيف ماء منزوع الشوارد وحضن ضمن حمام مائي مدة 15 دقيقة ليعاد حل الرنا المرسب، (الشكل 10).
8. قيس تركيز الـ RNA الناتج: بعد إستخلاص كل عينة يتم قياس تركيز الـ RNA بالعينة وذلك للتأكد من وجود الرنا بالعينة وبتركيز كافي لتحويل الرنا الناتج إلى دنا متمم، وذلك باستخدام جهاز النانودروب، (الشكل 11).

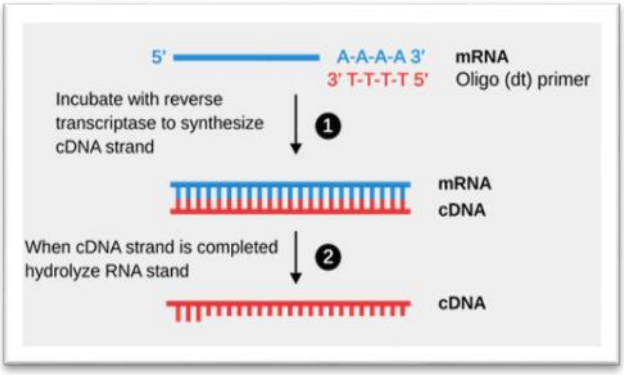


الشكل 10: مراحل استخلاص الرنا، (Piotr and Sacchi, 2020)

الشكل 11: جهاز النانودروب Nanodrop

1-4-3- اصطناع الدنا المتمم (Complementary DNA (CDNA :

تم اصطناع الدنا المتمم للرنا المستخلص وذلك باستخدام كيت تحويل الرنا الى دنا متمم لشركة جين دايركس وذلك بوجود إنزيم الناسخ العكسي وعدد من النكليوتيدات والشوارد الملائمة للتفاعل (GScript First-Strand Synthesis Kit , n.d.) ، (الشكل 12).



الشكل 12: مراحل اصطناع الدنا المتمم (Reverse Transcription PCR, 2022)

1. أضيف تركيز محدد من الرنا المستخلص.
2. أضيف 1 ميكرولتر من oligo dT و الـ dNTP mix
3. نكمل لل 13 ميكرولتر ماء منزوع الشوارد.
4. تم الحضن ضمن حمام مائي 65°س مدة 5 دقائق.
5. أضيف 4 ميكرولتر من 5x Buffer ، 1 مكرولتر من DDT و 1 مكرولتر من Ribon RNAse Inhibitor و 1 مكرولتر من Gscriptase ، ليصبح الحجم النهائي للأنبوب 20 مكرولتر.
6. حضن عند درجة الحرارة 50°س لمدة ساعة كاملة.
7. حضن عند درجة الحرارة 70°س لمدة 15 دقيقة لتعطيل عمل الإنزيمات.
8. تم الحفظ في المجمدة – 20 أو – 80 .

1-4-4- مضاعفة مورّثة العامل التاسع:

تم ذلك باستخدام جهاز تفاعل البلمرة التسلسلي Polymerase Chain Reaction (PCR) ، (الشكل 13).

الشكل 13: جهاز الـ PCR المتواجد في الهيئة العامة للتقانة الحيوية

يحتاج التفاعل إلى عدة مكونات لإتمام عملية بناء جزيئة الدنا الجديدة وهي:

1. قالب دنا رئيس المراد تضخيمه والكشف عن تواجد مورثة عامل التخثر التاسع ضمنه بعد استخراجه من الخزعات الكبدية المأخوذة مسبقا من المرضى المتطوعين.
2. خليط من النكليوتيدات.
3. زوج البادئات (Primers) ، وتتألف من تسلسل قصير من النكليوتيدات مكمل للتسلسل المستهدف على قالب الدنا، إذ يرتبط زوج البادئات عند بداية المنطقة المراد تضخيمها ونهايتها.
4. إنزيم الدنا بوليميراز مهمته بناء تسلسل الدنا برصف النكليوتيدات في مكانها الصحيح ابتداءً من البادئات.
5. العوامل المساعدة : كالمغنزيوم ومحلول موقي يحافظ على درجة حموضة معينة للوسط وذلك لزيادة كفاءة التفاعل.

صمّمت بادئات نوعية تحصر التسلسل النكليوتيدي للدنا المتمم للرنا المرسال لمورثة عامل التخثر التاسع البشري (الجزء النشط من مورثة عامل التخثر التاسع) ، وتمت إضافة نكليوتيدات كمواقع قطع مناسبة للإنزيمات القطع المتوفرة وغير متكررة ضمن المورثة ومتواجدة ضمن البلاسميد المتوفر لدينا مسبقاً لكي يتم إدخالها ضمن البلاسميد في مراحل متقدمة، بالإضافة لتسلسل نكليوتيدي من ATATAT لحماية البادئ من التدرك، مع الأخذ

بعين الإعتبار الشروط المثالية للبادئ بحيث تكون نسبة الغوانين والسيتوزين من 40 – 60 % من نسبة البادئ كاملة وأن لا يكون هنالك تسلسل متكرر من النكليوتيدات وخاصة على طرفي البادئ لكي لا يحدث مثنوي للبادئات Primer Dimer .

FOR FIX : ATATATGGTACCATGCAGCGCGTGAACAT

REV FIX : ATATATGGATCCGTTAGTGAGAGGCCCTGTT

وبحيث تكون درجة الحرارة المثلى للبادئات هي 63.

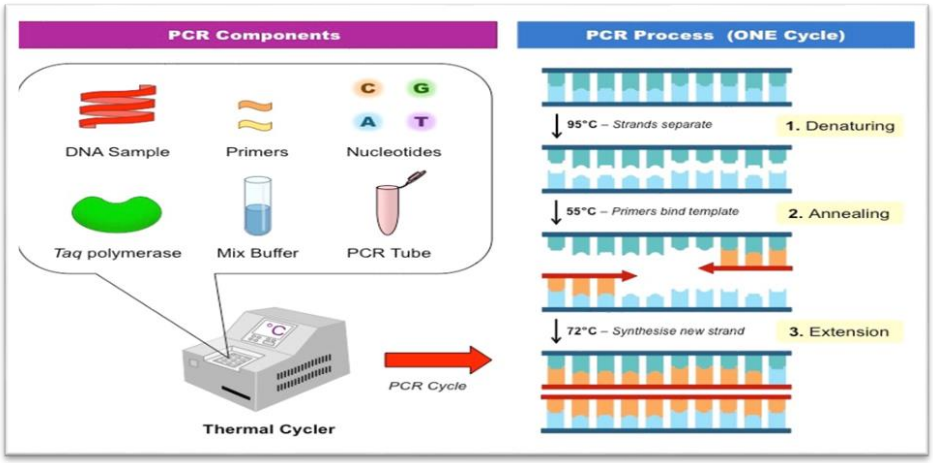
نلاحظ بما تحته خط تسلسل موقع القطع للبادئة الأمامية forward primer لإنزيم الـ KpnI وموقع القطع للبادئة الخلفية Reverce primer لإنزيم القطع الـ BamHI .

تم اعتماد كيت يسمى Master Mix صنع شركة Gene Direx يحتوي على إنزيم بوليميراز الدنا ومزيج النكليوتيدات وملح $MgCl_2$ ووقاء بتراكيز مدروسة ومناسبة لمعظم تفاعلات الـ PCR، حيث تم وضع الدنا المراد تضخيمه مع البادئات المناسبة و الـ Master Mix ضمن أنبوب PCR ويعرض هذا المزيج لسلسلة متكررة من التدوير الحراري من رفع وخفض درجات الحرارة بشكل دوري ومتكرر وذلك بغرض تضخيم المورثة المراد الكشف عنها بحسب شروط التفاعل المناسبة ودرجات الحرارة المناسبة للبادئات الموجودة.

هنالك ثلاثة مراحل أساسية ضمن جهاز التدوير الحراري (الشكل 14).

1. مرحلة التمسيخ أو التفكك (Denaturation): حيث يتم فصل سلسلتي الدنا المتطابقتين وذلك بكسر الروابط الهدروجينية بين السلسلتين وتحتاج هذه المرحلة إلى درجة حرارة 94–98 °س وتستغرق دقيقتين.
2. مرحلة تشفع البادئ أو الالتصاق (Annealing): ترتبط البادئات بالتسلسل المكمل لها على قالب الدنا المتمسخ .
3. مرحلة الإطالة (Elongation):

يتم فيها بناء النكليوتيدات المتممة لسلسلة الدنا الأساسية بالاعتماد على إنزيم الدنا البوليميراز عند درجة حرارة بين 70 –80 °س تسمح بالفعالية المثلى لإنزيم الدنا بوليمراز ولمدة دقيقة أو أكثر وذلك حسب طول المنطقة المراد تضخيمها، وفي النهاية نحصل على نسختين من الدنا تحتوي كل منهما على سلسلة من القالب الأصلي وسلسلة جديدة مكملة لكل منهما.



الشكل 14: مكونات ومراحل تفاعل الـ PCR، (Koirala, 2018)

تم العمل على عدة برامج وبروتوكولات للبحث عن أفضل برنامج مثالي لتضخيم مورثة عامل التخثر التاسع البشري، وتم اعتماد البرنامج التالي:

- مرحلة التمسيخ عند درجة الحراة 94 °س ولمدة 5 دقائق.
- مرحلة تشفع البادئ عند درجة حرارة 59.8 °س ولمدة دقيقة.
- مرحلة التطاول عند درجة حرارة 72 °س ولمدة دقيقة ونصف.
- عدد دورات التفاعل 40 دورة.

1-4-5- ترحيل نواتج الـ PCR على هلامة الآغاروز (Electrophoresis on Agarose Gel) :

تستخدم تقنية الرحلان الكهربائي لفصل المادة الوراثية عن طريق تطبيق مجال كهربائي في وسط هلامي، وبما أن مجمل الشحنة سالبة على المادة الوراثية ترحل من القطب السالب إلى القطب الموجب (الشكل 15).

بما أن كل مادة وراثية لها وزن جزيئي خاص فيها وبالتالي بتثبيت تركيز الهلامة وتثبيت شدة التيار المطبق بين القطبين نرى الاختلاف في ترحيل العينات من القطب السالب إلى القطب الموجب بحسب الوزن الجزيئي لكل مادة وراثية والمادة الأقل وزن جزيئي ترحل أسرع من المادة الأكثر وزن جزيئي.

تتم مقارنة العصابة المرحلة مع معلم عياري معلوم مسبقا الوزن الجزيئي لكل عصابة مرحلة بتركيز هلامة ثابت وبالتالي يمكننا تحديد أطوال العصابات المرحلة بالمقارنة بالمعلم العياري.

الشكل رقم 15، جهاز الرحلان الكهربائي وتصوير الهلامة

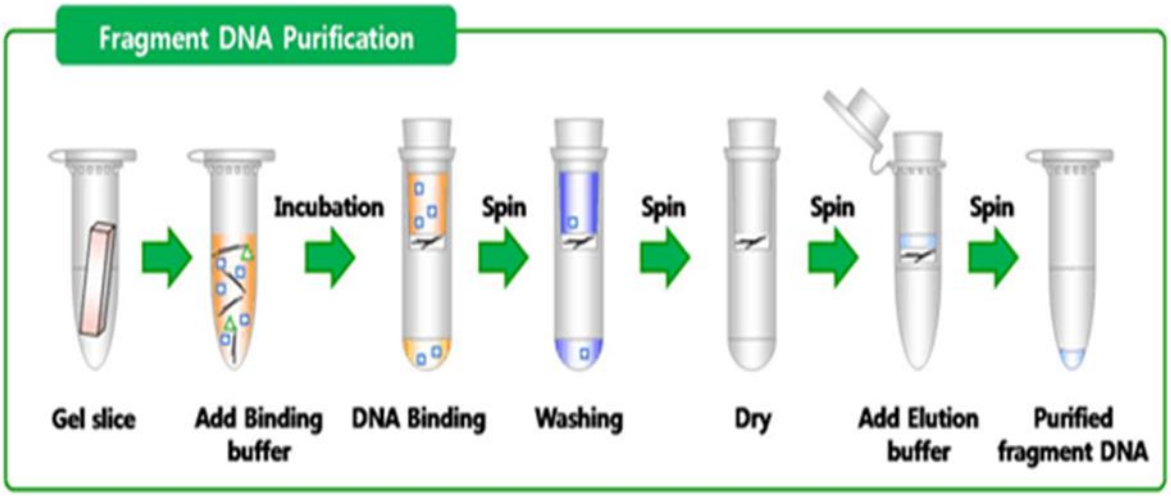
1. تحضير هلامة الأغاروز بتركيز 1.5 %:

- نزن بودرة الأغاروز
- يتم حل الأغاروز بوقاء الـ TAE تركيز 1X
- ثم يوضع في المايكروويف حتى يتم ذوبان كامل مسحوق الأغاروز
- يترك ليبرد في درجة حرارة الغرفة حتى يصل لدرجة 50 °س
- يضاف الإيتيديوم بروميد وهو يساعد في تظهير الهلامة على الأشعة
- ثم يصب في قالب ويترك حتى تتهلم الهلامة

2. يتم نقل الهلامة إلى حوض الرحلان ويتم تحميل العينات المراد ترحيلها والتي تم تضخيمها مسبقاً في جهاز التدوير الحراري بالإضافة الى Ladder كمعلم لمعرفة طول العصابات الظاهرة في العينات.
3. تطبيق التيار الكهربائي وشدة تيار مناسبة لمدة زمنية ملائمة للعينات المدروسة: تم من خلال التجربة وتكرار العمل اعتماد برنامج مناسب لطول والوزن الجزيئي للمورثة المطلوبة، شدة التيار 115 / 250 فولط، وزمن الترحيل 45 دقيقة.
4. نقل الهلامة الى حجرة التصوير: تم تعريض الهلامة إلى الأشعة فوق البنفسجية والتقاط صورة لها من خلال كاميرا خاصة حيث تظهر الهلامة لإحتوائها على الإيتيديوم بروميد. ومن خلال الصورة الملتقطة يمكن مقارنة طول العصابة المتشكلة مع المعلم العياري ومعرفة ما إذا كانت طول العصابة مطابق لطول المورثة المطلوبة أم لا.
5. قطع الهلامة الحاوية على طول المورثة المتوقعة: بعد التأكد من تواجد عصابات مطابقة بحسب المعلم المعياري إلى طول المورثة المطلوبة يتم قطع الهلامة تحت الأشعة فوق البنفسجية (أشعة الـUV) بإستخدام المشرط الطبي المعقم والنظارات الواقية للأشعة وذلك بهدف الحصول على العصابة المطابقة لطول المورثة المطلوبة للتأكد من تواجد المورثة المطلوبة ضمنها.

1-4-6- استخلاص الدنا من هلامة الأغاروز:

تم استخدام كيت مناسب لتنقية العصابة من هلامة الأغاروز وعدم إلحاق أي ضرر بالمادة الوراثية المنقاة وبنسبة نقاوة عالية خالية من مخلفات الأغاروز (الشكل 16).



الشكل رقم 16، مراحل تنقية الدنا من هلامة الأغاروز، (Basic Methods in Cellular and Molecular Biology.Gel Purification, 2014)

1. تم وزن الهلامة المقطوعة باستخدام ميزان الكتروني عالي الحساسية.
2. أضيف لكل 100 ملغ وزن من الأغاروز 300 ميكرولتر من وقاء يسمى Binding Buffer.
3. تم وضع الأنبوب ضمن حمام مائي 55°س لمدة 5 دقائق أو حتى الذوبان التام للهلامة مع قلب الأنبوب كل دقيقة لضمان ذوبان كامل قطعة الهلامة.
4. أضيف 5 ميكرولتر من معلق بودرة السيلكا والذي يعمل على ترسيب المادة الوراثية.
5. نثفل لمدة خمسة ثواني ليتشكل رسابة، ثم نقوم بإزالة السائل الطافي بحذر والتخلص منه.
6. نعيد تعليق الرسابة (معقد الدنا مع بودرة السيليكا) بإضافة 300 ميكرولتر من Binding Buffer وحضن الأنبوب لعدة دقائق عند درجة حرارة 55 °س لضمان ذوبان أي شيء متبقي من الهلامة ثم تعاد الخطوتان 4 و 5 .
7. أضيف 500 ميكرولتر من وقاء washing buffer المتواجد ضمن الثلج لإعادة حل الرسابة بواسطة الممص و الرجاج (حيث يرتبط الوقاء مع الدنا وتبقى بودرة السيلكا معلقة في الوسط) ثم نثفل لمدة خمسة ثواني و نتخلص من السائل الطافي ونحافظ على الرسابة ، نعيد الخطوة (7) 3 مرات.

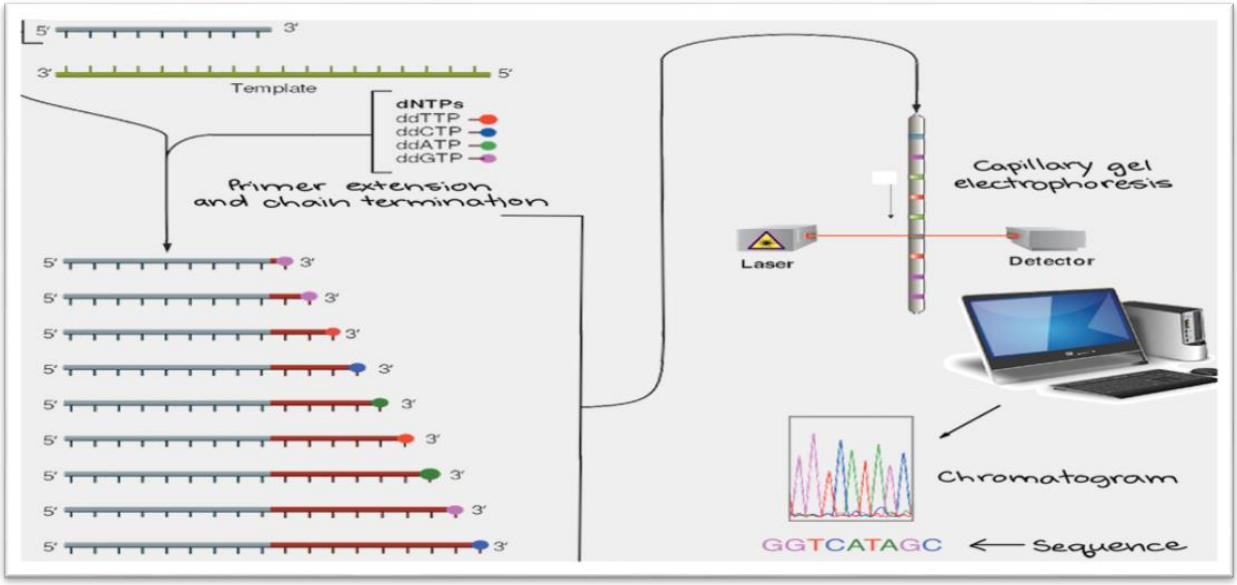
8. بعد التخلص من السائل الطافي للمرة الثالثة نعيد تثفيل الأنبوب ونتخلص من أي بقايا من السائل الطافي باستخدام الممص، ثم يترك الأنبوب ليجف تماما ضمن في حرارة الغرفة لمدة 10-15 دقيقة وذلك لضمان عدم وجود أي بقايا من الإيتانول بسبب احتمالية تثبيط الايتانول لبعض التفاعلات الإنزيمية.
9. أعيد حل الرسابة في حجم محدد (20 ميكرولتر) من ماء عقيم منزوع الشوارد أو TE، ثم حضن الأنبوب عند درجة حرارة 55°س لمدة 5 دقائق.
10. تم تثفيل الأنبوب ثم نقل السائل الطافي إلى أنبوب جديد مع إبقاء الرسابة وأعيد حل الرسابة مرة ثانية حسب الخطوة (8)، ونقل أيضا السائل الطافي الى الأنبوب الجديد الحاوي على الدنا المنحل والتخلص من الرسابة (بقايا بودرة السيلكا والشوائب).

1-4-7- التأكد من هوية الدنا المنقاة من الهلامة باستخدام تفاعل السلسلة DNA Sequencing:

يعتمد مبدأ تفاعل السلسلة للدنا على تقنية عد سلاسل أو أسس الدنا المطلوبة وتحديد هوية الأسس المرصوفة مع بعضها البعض للدنا المراد الكشف عنه وبالتالي تحديد هوية عينة الدنا المدروسة للتأكد من تطابقها مع دنا المورثة المطلوبة أو قطعة الدنا المطلوبة (Reece, J. B. et al , 2022).

يتم ذلك بطريقة تعرف بأسم تفاعل سانجر Sanger method: حيث يتم تقسيم قطعة الدنا المراد إجراء تفاعل السلسلة لها إلى عدة قطع صغيرة تحتوي على نهاية مرتبطة بصباغ يمكن من خلال عملية الرحلان الكهربائي مع الليزر كشف نهايات وأطوال هذه القطع حيث يتم تمرير هذه القطع ضمن أنبوب شعري هلامي مطبق عليه تيار كهربائي وليزر لكشف نهايات القطع المتألقة والقطع الأقصر تمر أسرع من الأطول وبالتالي يمكن من خلال قراءة الضوء المتألق من هذه القطع رسم جدول بياني يبدأ من أقصر القطع المتألقة إلى الأطول.

بقراءة ذروة المخطط لأقصر القطع المتشكلة والمولفة من (البادئ ونكليوتيد وحيد والنكليوتيد المتألق) يمكن تحديد هوية السلسلة التي تم دراستها و إجراء تفاعل السلسلة لها،(الشكل17).

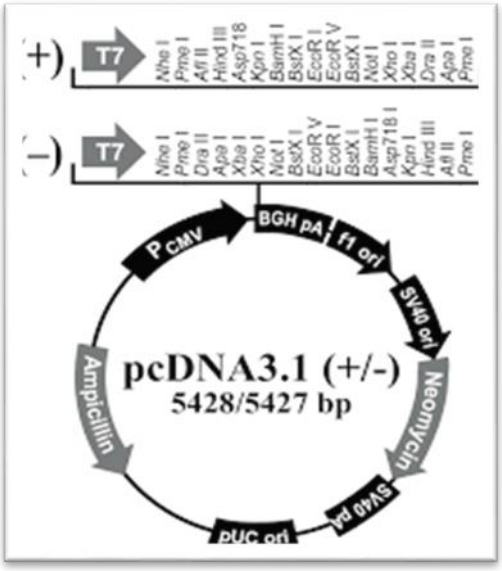


الشكل 17: مراحل عمل تفاعل سانجر وطريقة قراءة السلسلة المدروسة، (DNA sequencing, 2022)

1-4-8- ربط الدنا مع البلاسميد المناسب DNA Ligation :

تم العمل ضمن مخبر العزل الجرثومي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية. تم اعتماد بلاسميد الـ PCDNA 3.1+ والمتواجد مسبقا في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، (الشكل 18). وبلاسميد الـ PCDNA 3.1 عبارة عن ناقل حجمه 5.4 كيلو أساس مشتق من بلاسميد الـ PCDNA 3 ومصمم خصيصا للخلايا الثديية المضيفة حيث الثباتية والتعبير عالي الأداء، ويحتوي على عدة عناصر:

- Human cytomegalovirus promoter (CMV): للتعبير ضمن مستوى عالي و مجال واسع من الخلايا الثديية.
- مواقع تنسيل متعددة في كلا الاتجاهين + forward و – reverse لتسهيل عملية التنسيل.
- المورثة المقاومة للنيومايسين والأمبيسللين لتحقيق الاستقرار ضمن الخط الخلوي.



الشكل 18: بلاسميد الـ pcDNA 3.1+، (Naddafia et al, 2019)

1-4-8-1- تنمية الجراثيم الحاوية على بلازميد (pCDNA) ضمن وسط مغذي LB :

تحضير محلول الـ LB:

- أضيف 20.5 غ من مسحوق الـ LB ونكمل لـ 500 مل من الماء المقطر.
- وضعت ضمن الـ Autocalve عند درجة حرارة 121 °س لمدة 20 دقيقة .
- أضيف الامبيسللين بتركيز 50 ميكروغرام/ مل الى وسط الـ LB بعد التعقيم وانخفاض درجة حرارة الوسط وذلك لمنع تخرب الامبيسللين (يمنع الامبيسللين نمو جراثيم وبالتالي يسمح فقط للجراثيم الحاوية على بلاسميد PCDNA من النمو على اعتباره مقاوم للامبيسللين).

زراعة الجراثيم الحاوية على الـ + PCDNA 3.1 ضمن وسط مغذي LB :

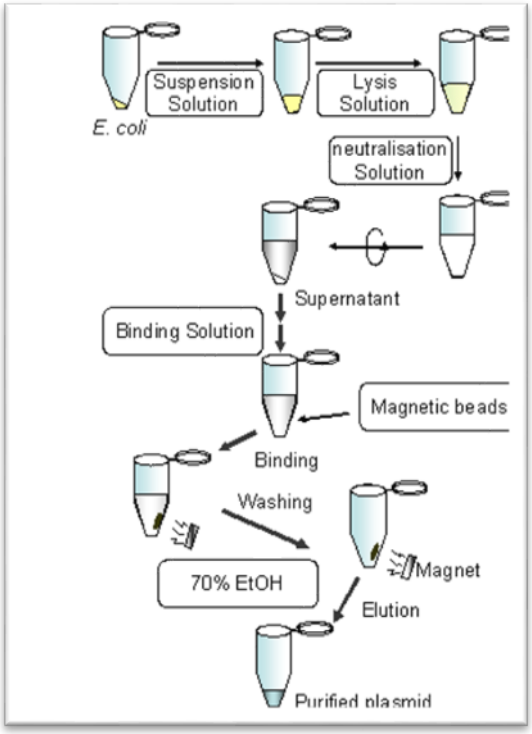
- تم أخذ 50 مل من الـ LB المحضر مسبقا مع الامبيسللين.
- أضيف له 1 مل من المعلق الجرثومي الحاوي على البلاسميد والمتواجد مسبقا بالمجمدة −80 °س.
- ترك ضمن حاضنة هزازة عند درجة حرارة 37 °س لمدة 16 – 18 ساعة .

- قيس تركيز البلازميد باستخدام جهاز nanodrop ، يجب ان يكون التركيز أعلى أو يساوي 100 نانوغرام / ميكروليتر.
- تم تثفيل الانبوب عند سرعة 14000 rpm لمدة 5 دقائق .
- تم التخلص من السائل الطافي والاحتفاظ بالرسابة ليطبق عليها بروتوكول عزل البلاسميد من الجراثيم.

1-4-8-2- تنقية البلازميد من الجراثيم

- أعيد حل الرسابة بإضافة 250 ميكرولتر من resuspension solution وذلك بتطبيق الرج أو باستخدام الممص حتى يتم حل الرسابة بالكامل، ثم تم نقل المعلق الخلوي إلى أنبوب تثفيل صغير 1.5 مل (الشكل 19).
- أضيف 250 ميكرولتر من lysis solution وخلط الانبوب عن طريق قلب الانبوب عدة مرات 4-6 مرات حتى يصبح المحلول لزج و رائق نسبياً (ننتقل فورا للمرحلة التالية لكي لا يحدث تحطم بالبلازميد، لا تتجاوز الخمسة دقائق في هذه المرحلة)
- أضيف 350 ميكرولتر من Neutralisation Solution و نخلط مباشرة وبلطف بقلب الأنبوب عدة مرات 4- 6 مرات حتى نحصل على محلول غائم. (الخلط بلطف لكي لا يترسب شيء من حطام الخلايا الجرثومية).
- تم التثفيل لمدة 5 دقائق بسرعة 12000 xg ليترسب الدنا الجرثومي وبقايا حطام الخلايا الجرثومية.
- نُقل السائل الطافي بالممص إلى انبوب فلترة (geneJET spin column)، وتم التخلص من الرسابة.
- تم التثفيل لمدة دقيقة ثم نتخلص من السائل المرتشح.
- أضيف 500 ميكرولتر من wash solution ونثفل لمدة 30 – 60 ثانية، ومن ثم التخلص من السائل المرتشح.

- تمت إعادة الخطوة السابقة مرة أخرى لضمان الغسل بشكل كامل ثم التخلص مرة أخرى من السائل المرتشح، وإعادة التثفيل دقيقة واحدة للتخلص من أي سائل مرتشح متبقي (للتخلص من أي أثر للإيتانول المتبقي من محلول الغسيل).
- نقل الفلتر إلى أنبوب جديد 1.5 مل، ونضيف 50 ميكرولتر من elution buffer الدافئ (70 °س) إلى مركز الفلتر لإزاحة وترسيب البلازميد ونحضن الانبوب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 2 دقيقة ثم نثفل الأنبوب لمدة 2 دقيقة.
- نتخلص من الفلتر ونحتفظ بالبلازميد المنقى ضمن الانبوب عند درجة حرارة – 20 °س.



الشكل رقم 19، مراحل تنقية البلازميد، (High Efficient Plasmid purification Kit, n.d.)

1-4-8-3- قطع البلازميد المنقى بإنزيمات القطع الملائمة للمورثة المطلوبة :

قطع البلازميد بإنزيمي القطع BamHI و KpnI، حيث تم اختيار إنزيمي القطع بناءً على مواقع القطع الموجودة بالبادئات المصممة على طرفي المورثة المطلوبة حيث موقع القطع الخاص بإنزيم القطع KpnI متواجد على الـ Forward primer الخاص بالمورثة و موقع القطع الخاص بإنزيم القطع BamHI متواجد على الـ Reverse primer الخاص بالمورثة.

1. أضيف 5 ميكرولتر من البلازميد المنقى الى أنبوب جديد
2. أضيف 2 ميكرولتر من Green Buffer Fast 10X
3. أضيف 1 ميكرولتر من إنزيم القطع BamHI
4. نمدد الأنبوب لـ 20 ميكرولتر (12 ميكرولتر) من ماء منزوع النكلياز WFN .
5. تم الحضن لمدة 1.5 ساعة عند درجة حرارة 37°س ثم تعطيل الإنزيمات لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 80°س ، أو يحضن الأنبوب طول الليل عند درجة حرارة 2- 8 °س.

1. أضيف 5 ميكرولتر من البلازميد المنقى الى أنبوب جديد
2. أضيف 2 ميكرولتر من Green Buffer Fast 10X
3. أضيف 1 ميكرولتر من إنزيم القطع KpnI
4. تم تمديد الحجم لـ 20 ميكرولتر (12 ميكرولتر) من ماء منزوع النكلياز WFN .
5. تم الحضن لمدة 3 ساعات عند درجة حرارة 37 °س ثم تعطيل الإنزيمات لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 80 °س، أو حضن الأنبوب طول الليل عند درجة حرارة 2- 8 °س.

- قطع البلازميد بإنزيمي القطع BamHI و KpnI:

1. أضيف 5 ميكرولتر من البلازميد المنقى الى أنبوب جديد

2. أضيف 2 ميكرولتر من Green Buffer Fast 10X

3. أضيف 1 ميكرولتر من إنزيم القطع KpnI و 1 ميكرولتر من إنزيم القطع BamHI.

4. مدد الأنبوب لـ 20 ميكرولتر (11 ميكرولتر) من ماء منزوع النكلياز WFN .

5. تم الحضن لمدة 3 ساعات عند درجة حرارة 37 °س ثم تعطيل الإنزيمات لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 80°س ، أو الحضن الأنبوب طول الليل عند درجة حرارة 2–8 °س .

ترحيل نواتج القطع على هلامة الأغاروز بالمقارنة مع البلازميد غير المقطوع للتأكد من سلامة القطع والإحتفاظ بالبلازميد المقطوع بإنزيمي القطع لإلتحامه مع المورثة المقطوعة لاحقاً.

1-4-8-4- قطع مورثة عامل التخثر التاسع بإنزيمي القطع KPNI و BAMHI :

1. أضيف 6.6 ميكرولتر (200 نانو غرام/ ميكرولتر) من المورثة الى أنبوب جديد

2. أضيف 2 ميكرولتر من green buffer fast 10X

3. أضيف 1 ميكرولتر من إنزيم القطع KPNI و 1 ميكرولتر من إنزيم القطع BAMHI.

4. نمدد الأنبوب لـ 30 ميكرولتر (19.4 ميكرولتر) من ماء منزوع النكلياز WFN .

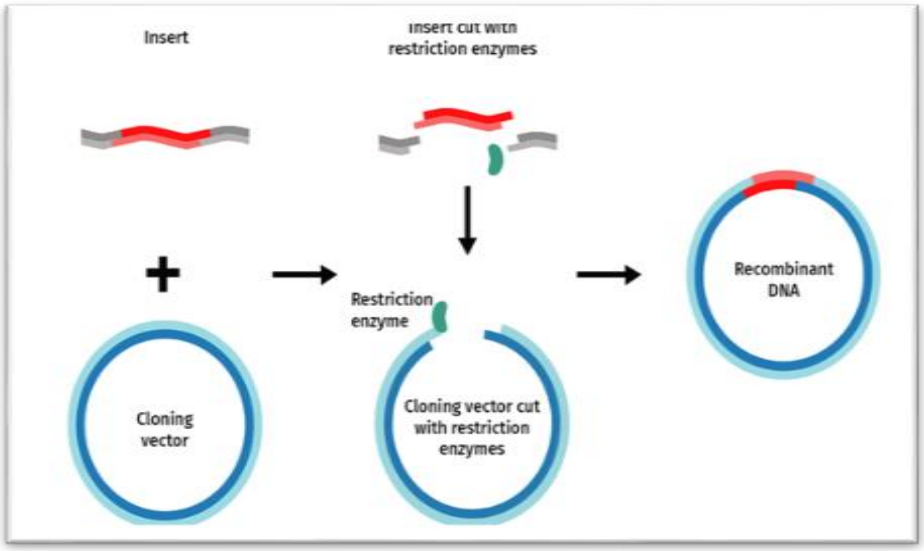
5. تم الحضن لمدة 3 ساعات عند درجة حرارة 37 دْ ثم تعطيل الإنزيمات لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 80°س ، أو الحضن الأنبوب طول الليل عند درجة حرارة 2– 8 °س

1-4-8-5- إلتحام المورثة المقطوعة مع البلازميد المقطوع :

يتم حساب نسبة كمية المواد المضافة لإجراء التحام المورثة مع البلازميد بالإعتماد إلى معادلة حسابية ويتم تحديد نسبة المورثة على البلازميد بالإعتماد إلى عدة تجارب لإختيار النسبة الأمثل وكانت النسبة الأفضل 1/5 أو 1/3 . (Ligation Protocol Utilizing T4 DNA Ligase , 2018)

{(Plasmid w/v * gene kb)/vector Kb} * (gene/vector) ratio

{(25ng/ul * 1.386)/5.428} * 5/1 = 31ng/ul



الشكل 20: مراحل قطع والتحام المورثة الهدف مع البلازميد ، (The Plasmid Cloning Cycle,n.d.)

1. أضيف 1 ميكرولتر من البلازميد المقطوع بإنزيمات القطع.
2. أضيف 5 ميكرولتر من المورثة المقطوعة بإنزيمات القطع.
3. أضيف 2 ميكرولتر من وقاء الليغاز ligas buffer.
4. أضيف 1 ميكرولتر من إنزيم الليغاز.
5. نكمل لـ 20 ميكرولتر ماء منزوع النكلياز (11 ميكرولتر WFN).

6. تم حضن الأنبوب لمدة ساعة عند درجة حرارة 22 °س.

7. تم تعطيل عمل الإنزيم لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 65 °س.

8. تم الإحتفاظ بالأنبوب عند −20 °س ، (الشكل 20).

1-4-9- تحديد وعزل البلازميد الحاوي على المورثة الهدف:

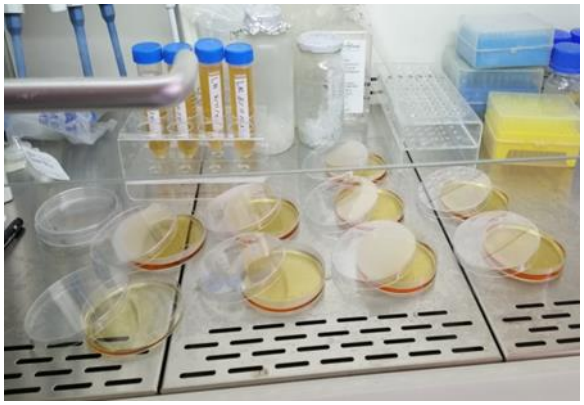
تتم تهيئة الجراثيم المناسبة لإستقبال البلازميد الحاوي على المورثة الهدف ومن ثم تحوير هذه الجراثيم وزراعتها ضمن أطباق بتري لتتكاثر ونحصل على جراثيم محورة وراثياً تحتوي ضمن موراثتها على مورثة عامل التخثر التاسع البشري حيث يتم التأكد من احتواء الجراثيم المحورة على المورثة الهدف من خلال عدة تجارب لتأكيد تحور الجراثيم. (Chang et al, 2017)

- زراعة جراثيم محورة مع البلازميد والمورثة الهدف و جراثيم محورة بالبلازميد الفارغ فقط للتأكد للمقارنة بين نوعي الجراثيم من حيث شكل المستعمرة.
- إضافة الامبيسليين للوسط المغذي مما يمنع نمو جراثيم غير محورة وراثيا أو جراثيم في المحيط الخارجي.
- إجراء تفاعل الـ PCR على عينات عشوائية من الجراثيم المحورة وترحيل نواتج الـ PCR على هلامة الأغاروز لمقارنة أطوال العصابات المتواجدة مع المورثة الهدف.
- تنقيه العصابات المتوقع إحتوائها على المورثة الهدف من الهلامة وإرسالها إلى السلسلة للتأكيد النهائي على تواجد المورثة الهدف ضمنها ونجاح عملية التحوير الجرثومي.

1-4-9-1- تحضير المحاليل الخاصة بالتهيئة و التحوير:

- تحضير وسط الـ LB المغذي: نضيف 5 غ من مسحوق الـ LB ونكمل لـ 200 مل من الماء المقطر.

- تحضير وسط الـ LB Agar : نضيف 8 غ من مسحوق الـ LB Agar ونكمل لـ 200 مل من الماء المقطر .
- تحضير محلول كلوريد الكالسيوم الامائي بتركيز 1 M : نضيف 11.1 غ من مسحوق كلوريد الكالسيوم الامائي ونكمل لـ 100 مل من الماء المقطر.
- تحضير محلول كلوريد الكالسيوم الامائي بتركيز 0.1 M : نأخذ 10 مل من محلول كلوريد الكالسيوم اللامائي بتركيز 1 M ونكمل لـ 90 مل من الماء المقطر.
- تحضير محلول كلوريد الكالسيوم الامائي بتركيز 0.1 M مع الغلسيرول 15% : نأخذ 6 مل من محلول كلوريد الكالسيوم الامائي بتركيز 1 M و 9 مل من الغلسيرول العقيم ونكمل بـ 45 مل من الماء المقطر.



الشكل 21: تحضير أطباق البيتري الخاصة بزراعة الجراثيم المحورة وراثياً

توضع جميع المحاليل السابقة ضمن معقمة الجافة Autocalve عند درجة حرارة 121 °س لمدة 20 دقيقة. ويضاف الامبيسللين بتركيز 50 ميكروغرام / مل لوسط الـ LB و الـ LB Agar بعد تعقيم المحاليل وعند درجة حرارة 37 °س فما دون. يتم صب محلول الـ LB Agar بعد إضافة الامبيسللين إلى أطباق بيتري وذلك ضمن حجرة عقيمة مخلاة من الهواء لضمان عدم تلوثها قبل أن يتهلم الوسط وتترك الأطباق حتى تتهلم ثم تغلق بإحكام و تحفظ في البراد 4 °س ، يمكن حفظها لمدة أسبوعين مع ضمان عدم تلوثها، (الشكل 21).

1-4-9-2- زراعة الجراثيم ضمن وسط الـ LB السائل:

من مميزات جراثيم الـ E.coli TOP 10 :

- مقاومة للأمبيسللين والنيومايسين
- قابلية عالية في استقبلال بلازميد الـ PCDNA واندماجه ضمن المادة الوراثية للجرثوم.

1. نضيف 3 مل من وسط الـ LB المحضر مسبقا إلى 50 ميكرولتر من جراثيم الـ TOP10 .

2. يوضع الأنبوب ضمن حضانة هزازة 37 °س لمدة 18 ساعة (بزاوية ميلان للأنبوب 45 د مع ابقاء الأنبوب عابر جزئي للهواء)

3. نضع أنبوباً أخراً 10 مل من الـ LB كشاهد سلبي.

4. بعد حضن مدة 18 ساعة نضع في أنبوب جديد 50 مل من الـ LB و 2مل من الأنبوب المحضون (TOP10 + LB)

5. يحضن الأنبوب الجديد في حضانة هزازة 37 °س مدة تتراوح بين 2 – 4 ساعات حتى تصل نسبة الـ OD بين 0.4 و 0.6 وهو الطور الذي يكون فيه الجراثيم بمرحلة التكاثر الأعظمي .

6. نأخذ ما تبقى من الأنبوب المحضون مسبقاً 1 مل (TOP10 + LB) ويضاف له 150 ميكرولتر من الغلسيرول العقيم المحضر مسبقا يمزج جيدا مع الجراثيم ويحفظ بالـ – 80 °س.

1-4-9-3- تهيئة الجراثيم :

بعد حضن الجراثيم ووصولها لطور التكاثر الأعظمي نبدأ بعملية تهيئة الجراثيم واستعدادها للتحوير مع البلازميد الحاوي على المورثة الهدف.

1. توضع جميع المحاليل الداخلة في عملية التهيئة عند درجة حرارة 4 °س.

2. نقسم الأنبوب الحاوي على الجراثيم المحضون مسبقا إلى عدة أنابيب ويحضن في الثلج لمدة 20 دقيقة لتثبيط نشاط الانقسام الخلوي للجراثيم.

3. نثقل الأنابيب لمدة 10 دقائق بسرعة 4000 rpm عند درجة حرارة 4 °س.

4. نتخلص من السائل الطافي ونحافظ على الرسابة .

5. نعيد تعليق كل رسابة بـ 20 مل من كلوريد الكالسيوم الامائي 0.1 M البارد ونحضن الأنابيب بالثلج لمدة 30 دقيقة.

6. نثقل الأنابيب لمدة 10 دقائق بسرعة 4000 rpm عند درجة حرارة 4 °س.

7. نتخلص من السائل الطافي ونعيد تعليق الرسابات المتشكلة ب 5 مل من كلوريد الكالسيوم الامائي 0.1 M مع الغلسيرول 15% البارد.

8. نحتفظ بالأنابيب بالمجمدة – 80 °س لحين تطبيق التحوير عليها.

1-4-9-4- تحوير الجراثيم :

يتم في هذه المرحلة إدخال البلازميد الملتحم مسبقا مع المورثة الهدف إلى الجراثيم المهيئة مسبقا لاستقبال البلازميد المحور لتندمج مع المادة الوراثية للجراثيم الـ TOP 10 ونحصل على جراثيم محورة وراثيا تحتوي على المورثة الهدف.

يتم إجراء التحوير باستخدام البلازميد الفارغ كشاهد للتاكد من نجاح التحوير الجرثومي، وعلى البلازميد المعدل مع المورثة المطلوبة كما يضاف طبق بيتري فارغ للتأكد من عدم نمو أي جرثومة غير الـ TOP 10 في الوسط.

1. نضع جميع الأنابيب والمحاليل الداخلة في التفاعل ضمن الثلج.

2. نضيف من 1− 5 ميكرولتر من البلازميد لكل 50 ميكرولتر من الجراثيم المهيئة مسبقا.

3. حضن ضمن الثلج مدة 30 دقيقة.

4. نقل مباشر إلى درجة حرارة 42° س لمدة 30 ثانية كصدمة حرارية للجراثيم.

5. ثم نقل مباشرة إلى الثلج لمدة 2 دقيقة.

6. نضيف 500 ميكرولتر من محلول الـ LB الدافئ ثم ننقل الأنبوب إلى حاضنة هزازة لمدة ساعة عند درجة حرارة 37 °س.

7. نثقل الأنبوب بعد الحضن مدة 5 دقائق بسرعة 5000 rpm .

8. نعيد حل الرسابة ب 100 ميكرولتر من الـ LB السائل

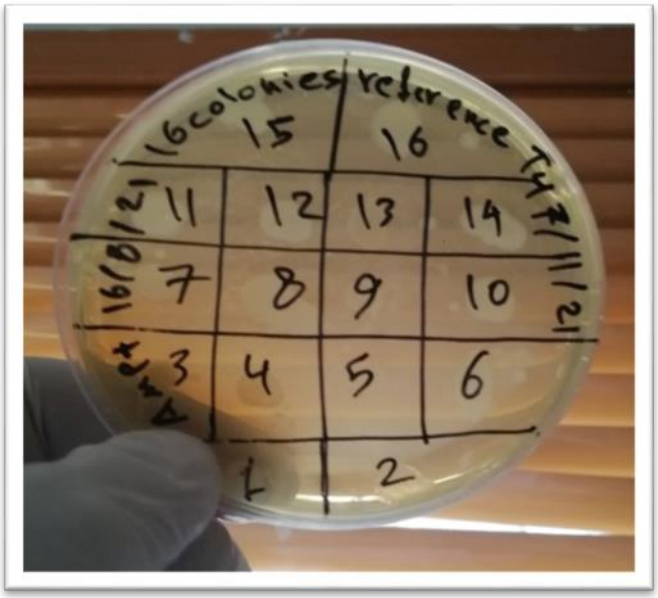
9. نزرع محتوى كل أنبوب على طبق بيتري ضمن حجرة عقيمة مخلاة من الهواء بحيث يتم تقسيم كل طبق بيتري لقسمين :

- قسم يحتوي 10 ميكرولتر (10%) من محتوى الأنبوب
- قسم يحتوي 90 ميكرولتر (90%) من محتوى الانبوب

10. يتم حضن أطباق البتري المزروعة ضمن حاضنة جافة 37° س لمدة 18 ساعة.

1-4-10- تحديد وعزل الخلايا الجرثومية الحاوية على مورثة عامل التخثر التاسع:

تم أخذ حوالي 16 مستعمرة جرثومية عشوائية من كل طبق بيتري وإجراء تفاعل الـ PCR عليها للتأكد من تواجد المورثة الهدف ضمنها، حيث يتم حل المستعمرة بماء منزوع النكلياز، 10 ميكرولتر من WFN لكل مستعمرة يؤخذ منها 5 ميكرولتر لتفاعل الـ PCR و 5 ميكرولتر يتم زراعتها ضمن طبق بيتري مرجعي للمحافظة على المستعمرات التي يحتمل تواجد مورثة عامل التخثر التاسع ضمنها (الشكل 22).



الشكل 22: طبق بتري مرجع للعينات

1. إجراء تفاعل الـ PCR للمستعمرات العشوائية المأخوذة من كل طبق بتري:

- 5 ميكرولتر من المعلق الجرثومي
- 0.5 ميكرولتر من Forward primer
- 0.5 ميكرولتر من Reverse primer
- 4 ميكرولتر من WFN
- 10 ميكرولتر من Master mix

يتم إجراء التفاعل ضمن نفس الشروط المثالية الخاصة بمورثة عامل التخثر التاسع البشري.

2. ترحيل نواتج الـ PCR على هلامة الأغاروز:

- ترحيل العينات بنفس الشروط المثالية الخاصة بترحيل مورثة عامل التخثر التاسع البشري.
- قطع العصابات المطابقة بالطول لطول مورثة عامل التخثر التاسع البشري.
- يتم تنقية العصابات المقطوعة من الهلامة بإستخدام بروتوكول التنقية .
- إرسال العينات المنقاة من الهلامة إلى السلسلة للتأكد من هوية الحزمة المقطوعة ومطابقتها للمورثة المطلوبة.

2- النتائج:

2-1- مرحلة قياس تركيز الـ RNA المستخلص من الخزعات الكبدية:

بعد إستخلاص الـ RNA من الخزعات الكبدية المأخوذة من المرضى المتطوعيين، تم قياس تركيز الـ RNA في كل عينة وذلك للتأكد من تواجد الرنا في العينة، وضمان وجود تركيز محدد يجب الحصول علية حتى يمكننا من إتمام عملية تحويل الرنا إلى دنا حلقي ومناسب لإتمام باقي التفاعلات.

تم قياس تركيز العينات بـ ng/ul (نانوغرام لكل ميكرولتر) بواسطة جهاز النانودروب فكان كالآتي:

- العينة رقم 1 مشفى المواساة الجامعي: 360 ng/ul
- العينة رقم 2 مشفى الأسد الجامعي: 179 ng/ul
- العينة رقم 3 مشفى المواساة الجامعي: 0.8 ng/ul
- العينة رقم 4 مشفى المواساة الجامعي: 41 ng/ul
- العينة رقم 5 مشفى المواساة الجامعي: 81 ng/ul
- العينة رقم 6 مشفى المواساة الجامعي: 705 ng/ul
- العينة رقم 7 مشفى المواساة الجامعي: 1332 ng/ul

2-2- مرحلة التأكد من تواجد المورثات البشرية في العينة وتضخيم مورثة عامل التخثر التاسع البشري:

أجري تفاعل البلمرة التسلسلي على الدنا الحلقي لعينات الكبد وذلك بهدف تضخيم مورثة عامل التخثر التاسع البشري المتواجدة ضمنها على افتراض تواجدها.

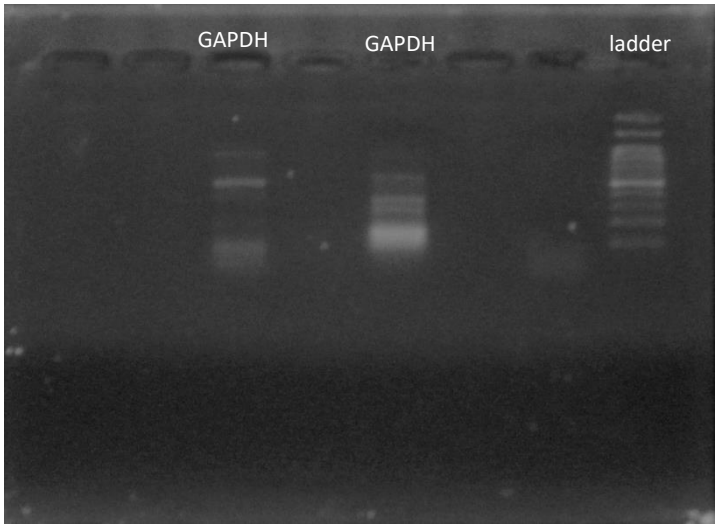
أولا أجريّنا التفاعل مع بادئات المورثة البشرية GABDH للتأكد من أن العينة حاوية على المورثات البشرية و عدم تخرب العينة من مرحلة الخزعة الكبدية لمرحلة الوصول إلى الدنا الحلقي.

ثانياً بعد التأكد من تواجد المورثات البشرية في العينة وضمان السلامة الأولية للعينات، أجرينا تفاعل البلمرة التسلسلي مع البادئات الخاصة بمورثة عامل التخثر التاسع البشري للتضخيم مورثة عامل التخثر التاسع البشري وتأكيد وجودها ضمن كل عينة.

2-3- مرحلة ترحيل نواتج الـ PCR على هلامة الأغاروز :

2-3-1- ترحيل ناتج الـ PCR للعينات الحاوية على بادئات خاصة بالمورثات البشرية:

يهدف الترحيل للتأكد من تواجد المورثات البشرية ضمن العينات ولتأكيد سلامة الدنا المتمم cDNA، (الشكل 23). طبقت عدة بروتوكولات ترحيل للعينات مع مراعاة التعديل في زمن وشدة التيار الكهربائي وفي تركيز الهلامة للوصول إلى بروتوكول الترحيل الأمثل.



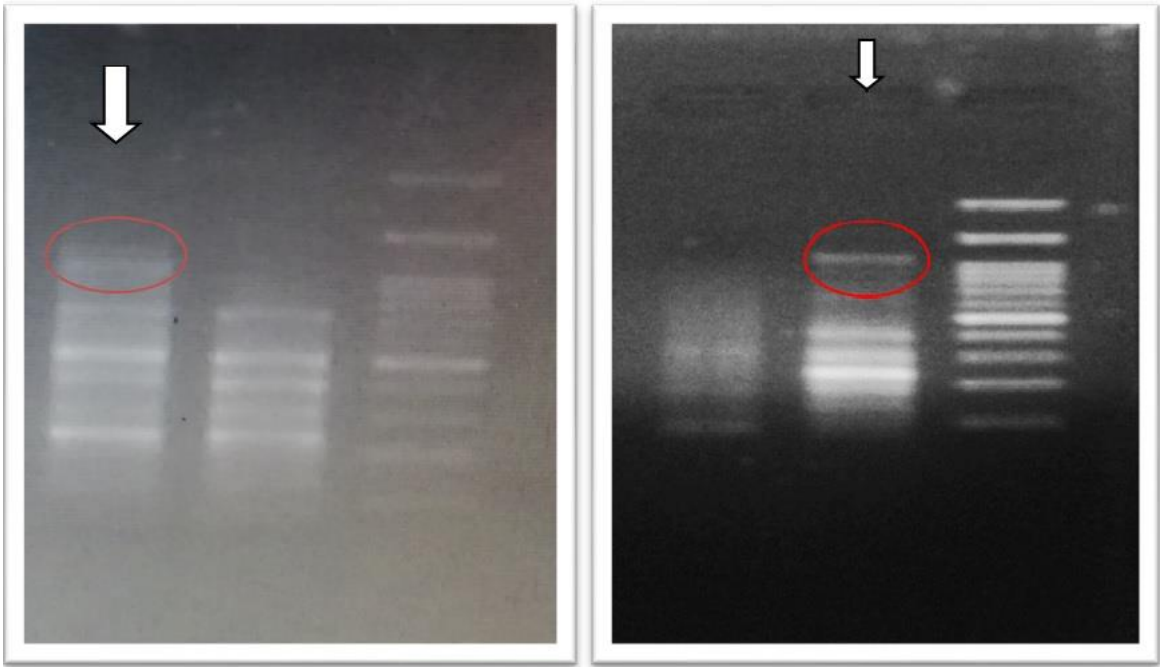
الشكل 23، رحلان عينات كبدية حاوية على بادئات للكشف عن المورثة البشرية GAPDH

2-3-2- ترحيل ناتج الـ PCR للعينات الحاوية على بادئات لمورثة عامل التخثر التاسع البشري:

تبين من خلال إجراء جميع التفاعلات السابقة على كل الخزعات الكبدية المأخوذة من المرضى على وجود عصابة طولها مطابق لطول المورثة المطلوبة في الخزعة الكبدية الخامسة.

أجريت عدة تفاعلات من الـ PCR ضمن الشروط المعتمدة مع التغير بشروط الـ PCR حتى الوصول إلى البرنامج الذي تم اعتماده لاحقا وتبين ظهور عصابة يتراوح طولها بين 1000-1500 BP بعد تعديل زمن تشفع البادئ من 30 ثانية إلى 1.30 دقيقة، الشكل 24.

مع تعديل زمن تشفع البادئ إلى الـ 1.30 دقيقة وزمن التطاول إلى الـ 1.30 دقيقة تم الحصول أيضاً على حزمة مطابقة لطول المورثة المطلوب،الشكل 24.



الشكل رقم 24، عصابة يتراوح طولها بين 1000و ال1500 bp لنفس العينة مع التعديل في شروط التفاعل .

قطعت العصابتين من الهلامة بإستخدام المشرط الطبي المعقم وبوجود الأشعة فوق البنفسجية والنظارات الواقية للأشعة لحماية العينين وتم نقل العصابتين الى أنبوبين عقيمين.

2-4- مرحلة تنقية العصابتين من هلامة الأغاروز و إرسال العينتين إلى السلسلة:

نقيت العينتان من الهلامة بإستخدام بروتوكول التنقية وأرسلت العينتان إلى السلسة للتأكد ومطابقة التسلسل النكليوتيدي للعينتين مع التسلسل النكليوتيدي لمورثة عامل التخثر التاسع البشري.

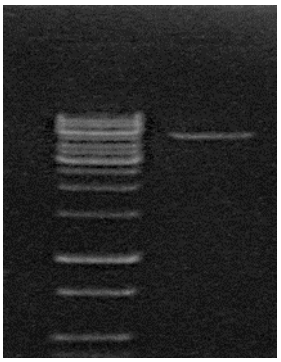
أجريّ تفاعل السلسلة بطريقتين مختلفتين لكل عينة ولكن في الناتج لم نحصل على تسلسل نكليوتيدي مكتمل لكلا العينتين وذلك بسبب التركيز القليل جداً منع من تعرف جهاز السلسلة على التسلسل النكليوتيدي للعينتين.

2-5- مرحلة قطع المورثة والبلازميد وإلتحام المورثة مع البلازميد:

أجريّ تفاعل القطع للمورثة وللبلازميد بإستخدام بروتوكول القطع للمورثة وبروتوكول القطع للبلازميد ثم تم إجراء تفاعل إلتحام المورثة المقطوعة مع البلازميد المقطوع بإستخدام بروتوكول الإلتحام المناسب.

تم إجراء عدة تجارب مخبرية لتحديد البروتوكول الأنسب لعمل إنزيمات القطع والقطع الكامل للبلازميد أو المورثة كما تم إجراء قطع لكل إنزيم قطع على حدة للتأكد من سلامة عمل إنزيمات القطع ومن الزمن الملائم للحضن لاتمام عملية القطع الصحيحة.

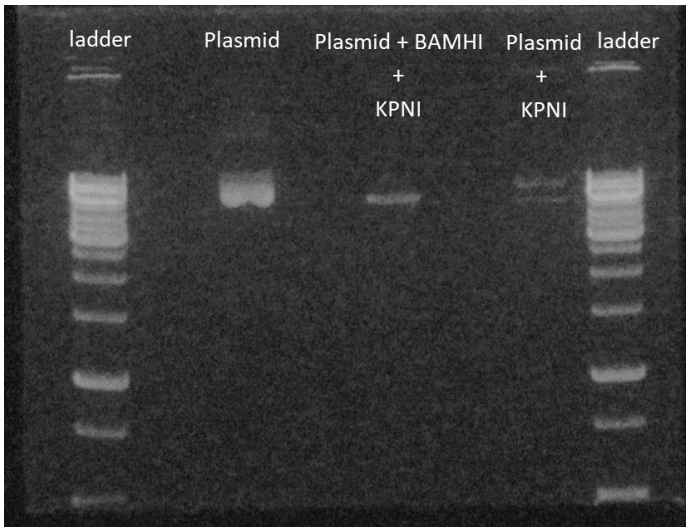
قطع البلازميد بإنزيم القطع BAMHI (FastDigest BamHI):



الشكل 25: ترحيل البلازميد المقطوع للتأكد من سلامة القطع

نلاحظ قطع كامل للبلازميد بواسطة إنزيم القطع BamHI بالمقارنة مع البلازميد غير المقطوع، (الشكل 25).

- قطع البلازميد بإنزيم القطع KpnI (FastDigest KpnI , n.d.):



الشكل رقم 26، مقارنة بين البلازميد الغير مقطوع والبلازميد المقطوع بإنزيم القطع KPNI والبلازميد المقطوع بإنزيمي القطع BAMHI و KPNI

نلاحظ قطع كامل للبلازميد بواسطة إنزيم القطع KpnI بالمقارنة مع البلازميد غير المقطوع، (الشكل 26).

2-6- مرحلة تهيئة وتحوير الجراثيم :

أعيدت عملية التهيئة والتحوير مراراً وتكراراً ولعدة أشهر حتى تمكنا من إنماء الجراثيم بالشكل الصحيح وبمراحل صعبة ومحدودة حالت دون الإمكانية لزيادة فرص النجاح والوصول إلى نتائج مرغوبة.

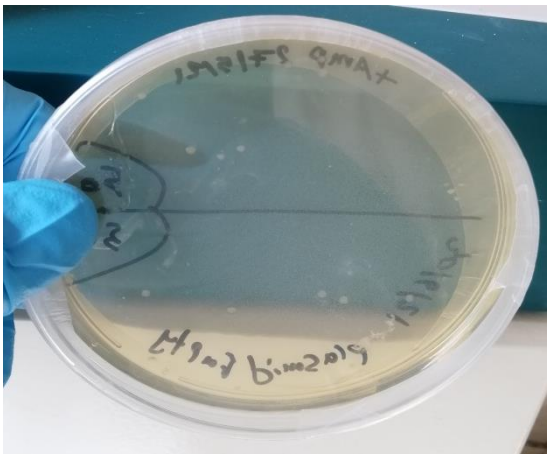
بعد محاولات عديدة تم التوصل إلى نمو جرثومي على أطباق بيتري للجراثيم محورة بالبلازميد الفارغ والجراثيم محورة بالبلازميد المحور (الشكل 27)، كما نلاحظ عدم نمو أي جراثيم على طبق البيتري الفارغ دليل عدم تلوث عملية النمو الجرثومي، (الشكل 28).

نلاحظ نمو مستعمرات جرثومية باللون الأبيض على أطباق البيتري المزروعة وبتركيز كثيف في القسم ذو التركيز الأعلى 90% مقارنة بالقسم الثاني من كل طبق 10%، (الشكل 29).

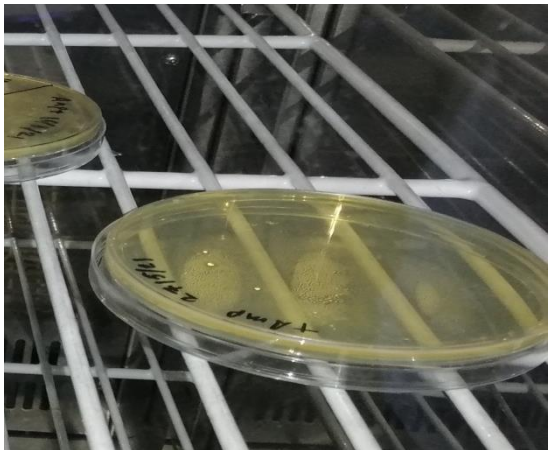
نلاحظ نمو مستعمرات جرثومية مختلفة شكليا لطبق البيتري الحاوي على الجراثيم المحورة بالبلازميد الفارغ مقارنة مع الأطباق البيتري الحاوية على جراثيم محورة بالبلازميد المحور، (الشكل 30).

أحكم إغلاق الأطباق الإيجابية وحفظها ضمن البراد 4° س لإجراء تفاعلات تأكيد تواجد مورثة عامل التخثر التاسع البشري ضمن المستعمرات الجرثومية المحورة.

الشكل 30، نمو المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلازميد المحور



الشكل 29، نمو المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلازميد الفارغ



الشكل 28، طبق البيتري الفارغ بعد حضن 18 ساعة

الشكل 27 ، أطباق البيتري بعد حضن 18 ساعة

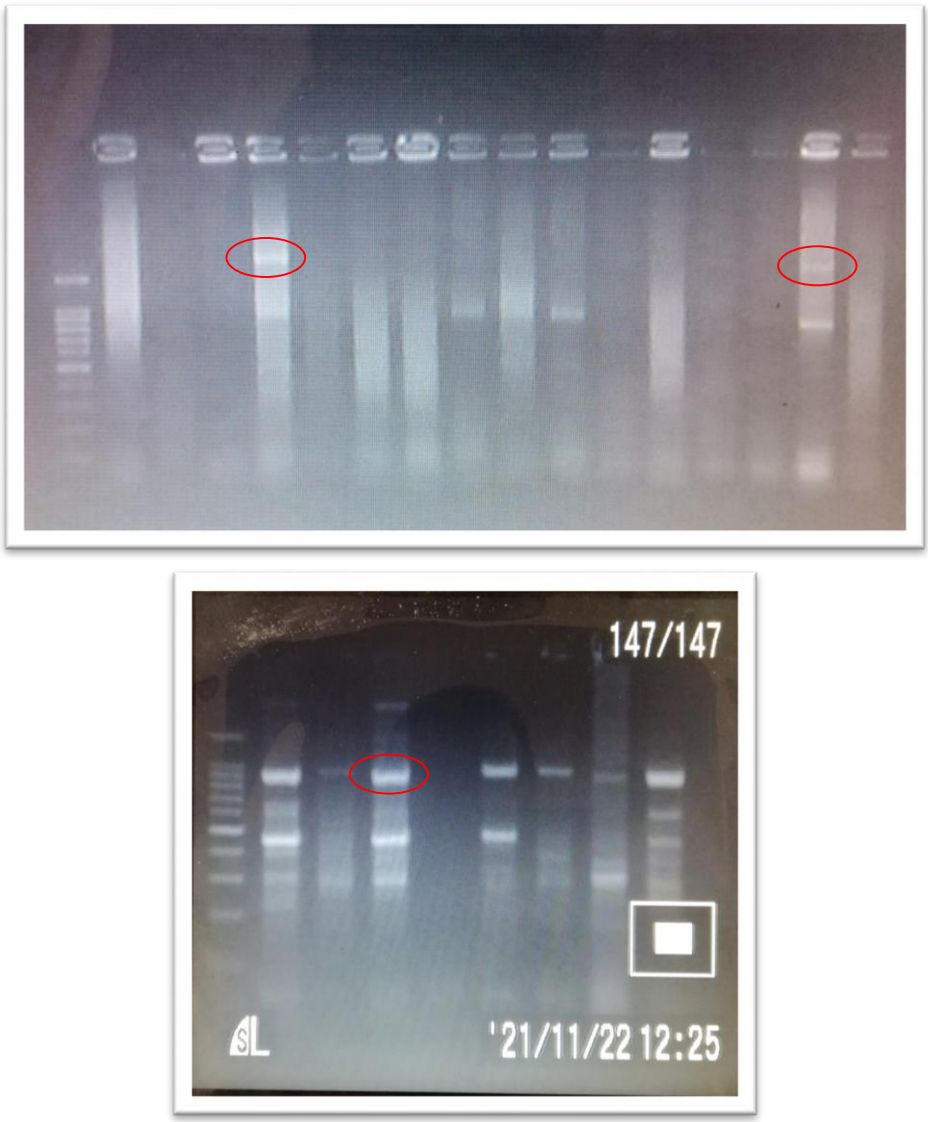
2-7- مرحلة عزل الجراثيم المحورة والتأكد من تواجد مورثة عامل التخثر التاسع البشري ضمنها:

أُخذت مستعمرات عشوائية من كل طبق بيتري وأجريّ تفاعل البلمرة التسلسلي للتضخيم مورثة عامل التخثر التاسع البشري والتأكد من تواجدها ضمن مورثات الجراثيم المحورة.

بعد إجراء تجارب عديدة تم زراعة العديد من أطباق البيتري بتراكيز مختلفة من المورثة مع البلازميد وبشروط إلتحام مختلفة وضمن مراحل مثالية بالتهيئة والتحوير وحصلنا على 18 طبق بيتري يحوي على جراثيم محورة نامية بشكل صحيح، تم عزل 16 مستعمرة جرثومية عشوائية من كل طبق بيتري وأجريً تفاعل البلمرة التسلسلي عليها مع تعديل البادئات المستخدمة في التفاعل، حصلنا على ثلاث عصابات فقط مطابقة بالوزن الجزيئي للمورثة المطلوبة، الشكل 31 .

نلاحظ ظهور عصابات مطابقة لطول مورثة عامل التخثر التاسع البشري دليلا على نجاح عملية التحوير الجرثومي و دخول البلازميد المحور ضمنها، ولكن من شكل العصابات الغير مضائة بوضوح على أشعة الـ UV يمكننا توقع التركيز القليل للمورثة رغم نجاح عملية التحوير.

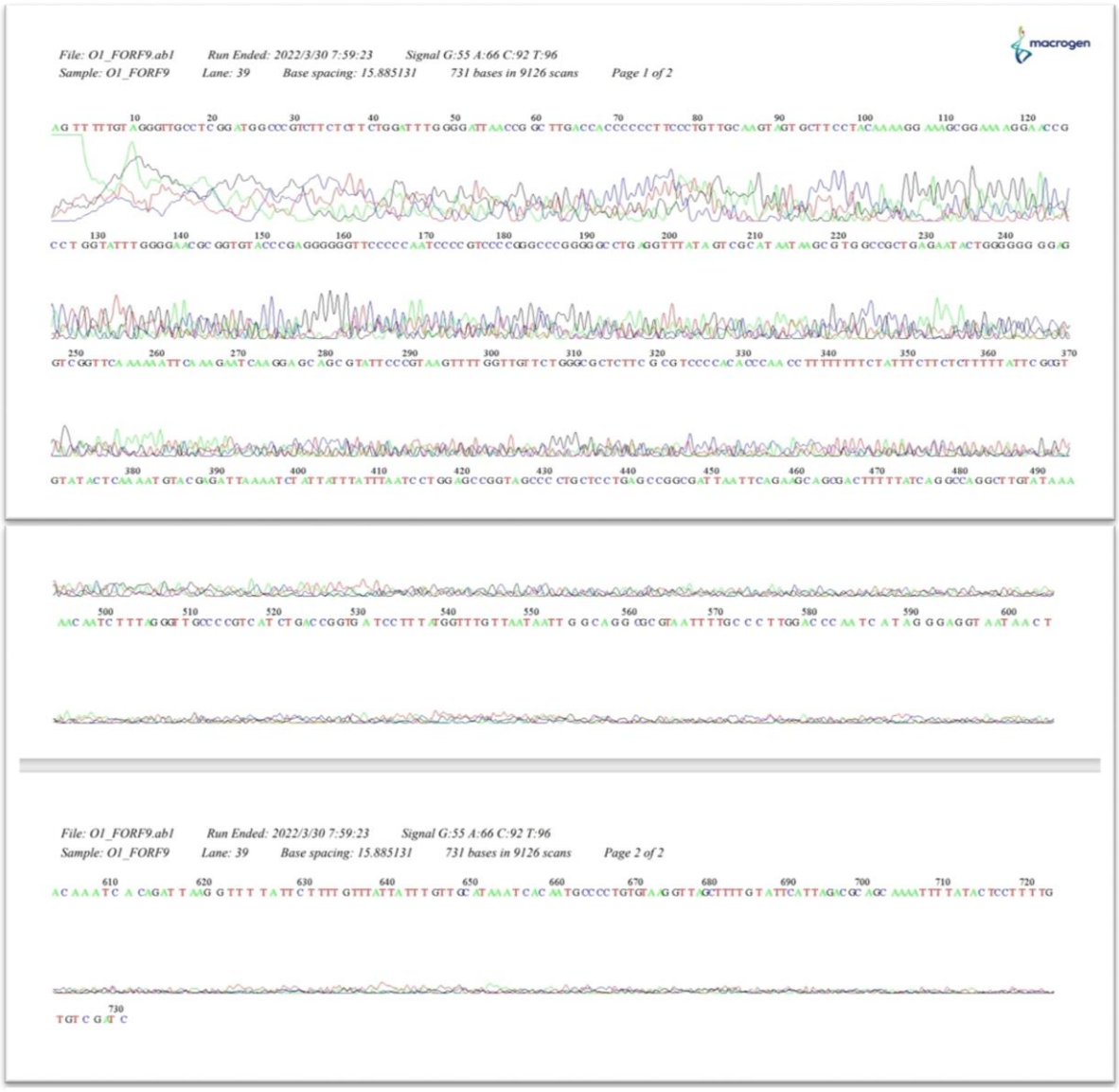
قُطعت العصابات الثلاثة ونُقيت من هلامة الأغاروز، ثم أجريّ تفاعل البلمرة التسلسلي الـ PCR للعصابات المنقاة مرة ثانية بغرض زيادة تركيز العصابات.



الشكل 31، ظهور عصابات مطابقة لطول المورثة ضمن العينات العشوائية المأخوذة من أطباق البيتري للجراثيم المحورة وراثياً

2-7-1- إرسال نواتج الـ PCR إلى السلسلة للتأكد من تواجد التسلسل النكليوتيدي لمورثة عامل التخثر التاسع البشري ضمنها

نلاحظ عدم الحصول على نتائج سلسلة قابلة للقراءة (الشكل 32).



الشكل رقم 32، نتائج السلسلة لإحدى العينات المرسلة موضحا عدم نجاح تفاعل السلسلة

3- المناقشة:

كانت مرحلة الاعتيان والحصول على عينات الخزعات الكبدية من أطول وأصعب المراحل خلال البحث لعدة أسباب؛ الخزعات الكبدية نادرة جداً وهي حصرا من مرضى يُشكّ بإصاباتهم الكبدية، ولا توجد إمكانية للحصول على عينات من متبرعين أصحاء، أضف إلى ذلك جائحة كورونا التي لا شك حالت دون إمكانية الحصول على خزعات لفترة طويلة جدا بسبب توقف معظم المشافي عن إجراء العمليات الجراحية الصغرى والكبرى، بما فيها الخزعات الكبدية التي توقفت لمدة عام تقريباً. زيادة على ذلك، وحتى بالنسبة للخزعات التي حصلنا عليها، تعذّر تحديد مكان الخزعة الكبدية تشريحياً. في النهاية، وبسبب عدم توفر خط خلوي كبدي والصعوبة البالغة في الحصول عليه من مصادر خارجية بسبب الحظر التقاني المفروض على سورية، كان علينا التعامل مع العدد القليل من عينات الخزعات التي حصلنا عليها طيلة ثلاثة أعوام، وعددها سبع خزعات كبدية فقط. كان تركيز الرنا المستخلص من جميع العينات ضعيفاً جداً، خاصة في العينة رقم 3 حيث كان التركيز شبه معدوم. في الواقع، انطلقت أغلب الأبحاث التي أجريت عالمياً لتأشيب مورثة عامل التخثر التاسع البشرية من خطوط خلوية كبدية وليس من خلايا كبدية أولية أو خزعات. وتمكن المقارنة هنا بين الخزعات الكبدية المأخوذة من مرضانا والعينات المأخوذة من خط خلوي كبدي، (الجدول 10) أو من كتلة كبدية (الجدول 11).

الجدول رقم 10 ، مقارنة بين العينات المأخوذة من خزعة كبدية لمرضى متطوعيين وبين خط خلوي كبدي

	خزعة كبدية	خط خلوي كبدي
تركيز العينة المأخوذة	تركيز قليل 50 ملغ/مل	تركيز عالٍ
حجم العينة	خزعة إبرية حجمها قليل	خزعة نسيجية حجمها كبير
نقاوة العينة	لايمكن تحديد نقاوة العينة وخاصة أن معظم المتطوعين هم مرضى يعانون من أمراض كبدية مزمنة أو أورام وقد يكونو معرضين للمواد المشعة والأدوية الكيميائية	نقاوة عالية وخلايا كبدية سليمة
إحتمال تواجد المورثة المطلوبة	قليلة جدا لعدم سلامة كبد المتطوع	نسبة عالية جداً

الجدول رقم 11 ، مقارنة بين العينات المأخوذة من خزعة كبدية لمرضى متطوعيين وبين كتلة كبدية لمتطوع

	خزعة كبدية	**كتلة كبدية**
تركيز العينة المأخوذة	تركيز قليل 50 ملغ/مل	تركيزها أكبر لأن الحجم أكبر
حجم العينة	خزعة إبرية حجمها قليل	يمكننا التحكم بالحجم
إحتمال تواجد المورثة المطلوبة	قليلة جدا لعدم سلامة كبد المتطوع	أكبر نسبياً لاحتمالية سلامة جزء من العينة الأكبر

من خلال المقارنة قد نستقرئ أن الخزعات الكبدية التي حصلنا عليها من المرضى المتطوعين ربما لم تحتوِ على الرنا المرسال الخاص بالعامل التاسع، أو أنها احتوت على تراكيز ضعيفة جداً منه لم تمكنّا من تضخيمه حتى بطريقة حساسة جداً كتفاعل الـ PCR. كما يبقى احتمال تضرر عينات الرنا لدى اعتيان الخزعات الكبدية أو نقلها من المشفى إلى المختبر قائماً. وهنا تجدر الإشارة إلى بحث أجريّ في مشفى الأسد الجامعي في اللاذقية بين عامي 2002–2003 على 40 خزعة كبدية، حيث وجد أن جميع الخزعات الكبدية كانت أحجامها قليلة جدا، إضافة إلى إصابة معظم الحالات بإلتهاب كبد مزمن مما قد يقلل من التعبير الجيني عن الجينات المستهدفة في تلك العينات (زيزفون وزملاؤه 2004).

أجرينا عدة تفاعلات على كافة العينات الكبدية المستحصل عليها متضمنة عدداً من التعديلات الخاصة بأمثلة شروط التضخيم، من تغيير زمن مرحلة التفكك وزمن تشفع البادئ وزمن التطاول ودرجة حرارة التفاعل وتغيير عدد دورات التفاعل، بالإضافة إلى تعديلات في تركيز الدنا المتمم في التفاعل. وتجدر الإشارة هنا إلى تعديل تم ذكره في المرجع (Paridar et al, 2014)، حيث اضطر الباحثون إلى إطالة زمن تشافع البادئات من 30 إلى 60 ثانية، وهو ما قمنا به أيضاً ضمن سلسلة التعديلات التي أجريناها. وفي كل تفاعل بوليميراز متسلسل كنا نقوم بتفاعل تضخيم لجين GAPDH وكانت تظهر منتجات التضخيم بشكل واضح. إلا أن هذه المورثة الأخيرة تعدّ من مورثات الخدمة Housekeeping genes والتي يتم التعبير عنها بشكل مرتفع جداً في جميع الخلايا نسبة إلى المورثات النوعية (Heemskerk et al, 2002)، كمورثة العامل التاسع موضوع بحثنا. تمكنّا أخيراً من الوصول

إلى بروتوكول تضخيم أظهر إيجابيةً بالرحلان الكهربائي لواحدة من العصابات التي تقارب الوزن الجزيئي المتوقع لمنتج التضخيم (الشكل 24)، وتوافق ذلك مع نتائج باحثين آخرين (Paridar et al, 2014). مع ذلك، يوضح الشكل 24 وجود العديد من العصابات الأخرى ذات أوزان جزيئية أصغر من الطول المتوقع. ومن مراجعة الأدبيات العالمية، يتضح أن باحثين كوريين قد اضطروا إلى إجراء بعض التعديلات في بروتوكولات التضخيم، وذلك بالقيام بذلك على عدة مراحل وباستخدام عدد من البادئات (Lee et al, 1991).

ظهرت العصابة المتوافقة مع الوزن الجزيئي المتوقع لدى تضخيم الدنا المتمم للرنا المستخلص من عينتين فقط من العينات السبع قيد الدراسة. ولاحقاً لذلك، تم قطع العصابة من هلامة الرحلان وتنقية الدنا، إلا أن تركيزه كان ضعيفاً. مع ذلك، تم إجراء تفاعل القطع الإنزيمي ومن ثم ربط التسلسل المقطوع ببلازميد PCDNA 3.1+ المقطوع بنفس الإنزيمين ضمن الشروط المعيارية لذلك. تمت عملية إعداء الخلايا الجرثومية المحضّرة لاستقبال البلازميد المأشوب افتراضياً، ومن ثم زرع الجراثيم على ضمن علب بيتري تم تحضيرها مع إضافة الصاد الحيوي لانتقاء الجراثيم التي نجحت لديها عملية الإعداء، على اعتبار الجراثيم التي لم تنجح فيها لا تنمو على وسط يحتوي الصاد الحيوي، بينما تنجح الجراثيم المحورة بالبلازميد لوجود جين مقاومة الصاد الحيوي ضمن البلازميد PCDNA 3.1 + ذاته. وتم إكمال باقي التجارب أملاً بالحصول على تضخيم لمورثة العامل التاسع ضمن البلازميد الذي يتم تضخيمه ضمن الخلايا الجرثومية أثناء تضاعفها.

وتجدر الإشارة إلى أنه في مراحل العمل هنالك عدة عوامل تتعلق بنجاح عملية تهيئة الجراثيم وتحويرها ومنه الوصول إلى مستعمرات جرثومية نامية تحتوي ضمن مورثاتها على مورثة عامل التخثر التاسع البشري. نذكر من هذه العوامل:

- **عوامل تتعلق بنجاح عملية التهيئة للجراثيم:** كتحضير المحاليل الخاصة بعملية التهيئة وتعقيمها بواسطة الأوتوكلاف لضمان خلوها من أي جراثيم تعيق عمل الجراثيم المهيئة. كما أن جميع مراحل عملية التهيئة تتم في وسط الثلج وجميع مراحل التثفيل تتم عند درجة حرارة 4° س. ويجب أن تتم عملية تنمية الجراثيم المراد تهيئتها وعملية التهيئة بشكل متتالي وتحتاج تقريباً من 4 – 5 ساعات، الأمر الذي فشلنا به عدة مرات بسبب ظروف العمل المتعلقة بانقطاع التيار الكهربائي.
- **عوامل تتعلق بنجاح عملية التحوير للجراثيم:** يجب توفر الثلج والحمام المائي لإحداث الصدمة الحرارية ونقل الأنبوب من الثلج للحرارة ومنه إلى الثلج خلال زمن دقيق ومحكم، أيضاً يجب نقل المعلق الجرثومي إلى أطباق البيتري ضمن حجرة عقيمة مخلاة من الهواء وبأدوات معقمة بشكل دوري، لضمان عدم تلوث الأطباق بجراثيم أخرى.
- **عوامل تتعلق بنجاح نمو الجراثيم المحورة:** يجب أن تتم جميع عمليات زراعة الخلايا الجرثومية على أطباق بيتري ضمن وسط عقيم وضمن حجرة عقيمة مخلاة من الهواء. يجب أن يتم الحضن لمدة 18 ساعة عند درجة حرارة 37° س، بينما يمكن أن يؤدي الحضن لمدة أطول إلى ظهور طفرات بالخلايا الجرثومية تعيق النتيجة النهائية ودرجة الحرارة أقل من 37° س تمنع من نمو الجراثيم بشكل كافٍ. وهنا يمكن القول أن عدم توفر الكهرباء بشكل مستمر لا شك وأنه يشكل عائقاً لنمو الجراثيم بالشكل الصحيح. إن حدوث أي خطأ أو عائق في مراحل التهيئة والتحوير الجرثومي أو في مراحل النمو يؤدي إلى فشل في نمو الجراثيم المحورة وإعادة جميع الخطوات السابقة، مما يجعل مراحل التهيئة والتحوير معقدة وصعبة تحتاج لعمل دقيق وبشروط خاصة للوصول إلى النتيجة المطلوبة.
- **عوامل تتعلق بنجاح عملية عزل المستعمرات الجرثومية من أطباق البيتري وتضخيمها:** إن إستخدام بادئ من البلازميد وبادئ من المورثة في تفاعل البوليميراز التسلسلي يعطي نتائج أدق وإنتقاء أفضل للمورثة المطلوبة، وتنقية البلازميد المأشوب من الخلايا الجرثومية المحورة قبل إجراء تفاعل البلمرة قد يعطي نتائج أكثر نقاوة، لكن عدم وفرة المواد الخاصة بالتنقية وغلاء ثمنها أدى إلى إستخدام

المستعمرة الجرثومية كما هي في تفاعل البلمرة التسلسلي مما قد يحد من نجاح عملية تضخيم المورثة والكشف عنها بالرحلان الكهربائي، بالإضافة إلى عدم ضمان نمو الجراثيم بشكل صحيح ضمن الشروط المثالية.

بعد الانتهاء من كافة المراحل السابقة، تم توضيب البلازميد المأشوب وإرساله لإجراء تفاعل السلسلة لكن النتائج كانت مخيبة للآمال، فكانت نتيجة السلسلة غير مقروءة وبالتالي لم نتمكن من البحث في قواعد البيانات باستخدام التسلسل النكليوتيدي الناتج عن السلسلة، مع العلم أن النتيجة السلبية ذاتها ظهرت في عينتين اثنتين، هما العينتان اللتان ظهرت فيهما عصابة مقاربة للطول المتوقع للدنا المتمم الخاص بمورثة العامل التاسع. إن تفسير هذه النتيجة السلبية يأخذ بكافة التحديات السابقة التي ذكرت آنفاً، إضافة إلى احتمالية تلوث العصابة لدى قطعها من هلامة الرحلان بعصابات أخرى قد يكون لها نفس الوزن الجزيئي، وهو الأمر الذي يثبط عملية السلسلة ذاتها ويعيق ظهور نتائج مقروءة.

في الخلاصة، كان الهدف من دراستنا هو الحصول على عامل التخثر التاسع المأشوب، مروراً بتوطين التقانات اللازمة لذلك من عزل الرنا الخاص بعامل التخثر وتحويله إلى دنا متمم، وتنسيل الأخير في بلازميد يمكننا من التعبير عن البروتين في خلايا الجراثيم ومن ثم في خلايا حقيقيات النوى، إلا أن النتيجة كانت سلبية، فلم نتمكن من تحقيق الغاية المرجوة غالباً بسبب عدم مناسبة عينات الخزعات الكبدية التي حصلنا على عدد قليل منها فقط خلال فترة إجراء البحث وضمن ظروف العمل المعقدة والبنية التحتية سواء في المشافي أم في المختبر. وننصح أن يتم عزل الرنا للعامل التاسع وعموم عوامل التخثر من خطوط خلوية في حال كان الحصول عليها ممكنا.

الخـــاتـــمـــــة

1- أهم النتائج التي توصل إليها البحث:

1. تمكنّا من الحصول على سبع عينات من الخزعات الكبدية لمرضى من مشفيين بعد أخذ الموافقات اللازمة.
2. أجريت تجارب عديدة لعزل الرنا الكلي من عينات الخزعات الكبدية البشرية وتحويله إلى الدنا المتمم، مع الإشارة إلى التراكيز الضعيفة التي حصلنا عليها.
3. تم العمل على أمثلة شروط تضخيم الدنا المتمم النوعي للعامل التاسع بتفاعل البوليميراز التسلسلي.
4. حصلنا على عصابة ضعيفة في الرحلان الكهربائي لنواتج تضخيم الدنا المتمم ببادئات نوعية لعامل التخثر التاسع البشري بطول يقارب الوزن الجزيئي المتوقع.
5. حصلنا على جراثيم محورة بالبلازميد المأشوب، دلّ على ذلك نمو تلك الجراثيم بوجود الصاد الحيوي النوعي للبلازميد الحاوي على مورثة المقاومة للصاد الحيوي.
6. لم نتمكن من الحصول على تسلسل نوعي للعامل التاسع مما يدل على تضخيم غير نوعي لهذا العامل، وقد يشير إلى عدم مواءمة عينات الخزعات الكبدية كمصدر للخلايا المعبرة عن العامل التاسع البشري.

2- المقترحات والتوصيات:

1. لا بد من ضمان توفر مصدر جيد ومستمر من العينات الخلوية المعبرة عن العامل التاسع قبل البدء بأية تجارب لاحقة.
2. من المنصوح به أن تستخدم خطوط خلوية نوعية لتضخيم مورثة العامل التاسع البشري، كبديل أفضل من الخلايا الكبدية الأولية.
3. على الرغم من النتائج السلبية لهذا البحث، نقترح استمرار العمل مستقبلاً على محاولات إنتاج الأدوية البيولوجية، بما في ذلك من توطين التقانات اللازمة وتوفير مادة دوائية أولية نستعيض بها عن الأدوية المستوردة غالية الثمن، والتي لا تسمح بتوفير هذه الأدوية لكافة من يحتاجها.

المراجع العلمية

المراجع العربية :

الجمعية السورية لمرضى الناعور (2006)، خدمات الجمعية . استرجع من http://syrian-hemophila-society.com

زيزفون، الشهابي، باليه.(2004). *خزعة الكبد (الاستطبابات . الاختلاطات . النتائج) خبرة مشفى الأسد الجامعي باللاذقية*. مجلة جامعة تشرين- العلوم الصحية،26،(1)،159-171.

المراجع الإنكليزية:

Achneck HE, Sileshi B, Parikh A, Milano CA, Welsby IJ and Lawson JH. (2010) Pathophysiology of bleeding and clotting in the cardiac surgery patient: from vascular endothelium to circulatory assist device surface. Circulation Journal, 122 (20): 2068-2077.

Ali T, and Schved JF. (2012) Registry of hemophilia and other bleeding disorders in Syria. Hemophilia Journal, 18(6), 851-584.

Amy D Shapiro et al. (2012). Study of recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIXFc) in subjects with hemophilia B. Retrieved from http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01027364. Annual Review of Physiology,73: 515-525.

Ashby B, Daniel JL and Smith JB. (1990) Mechanisms of platelet activation and inhibition.Hematology/Oncology Clincs of North America, 4, (1): 1-26.

Azzi A, Ciappi S, Zakvrewska K, et al. (1992) Human parvovirus B19 infection in hemophiliacs first infused with two high-purity, virally attenuated, factor VIII concentrates. American Journal of Hematology, 39,(3): 228-230.

Barash PG, Cullen BF and Stoelting RK. (2006) Williams and Wilkins. Philadelphia: Lippincott co.

Basic Methods in Cellular and Molecular Biology. Gel Purification (2014). Retrieved from https://www.socmucimm.org/news-media/gel-purification/

BeneFIX. (n.d.). Retrieved from https://www.mims.com/thailand/drug/info/benefix

Berntorp E and Shapiro AD.(2012).Modern haemophilia care. The Lancet, 379, (9824): 1447-1456.

Bertamino M, Riccardi F, Banov L, et al. (2017) Hemophilia Care in the Pediatric Age.Journal of Clinical Medicine, 6, (5): 54.

Biogen's Alprolix nod is just the first tremor in a hemophilia market shake-up.(2014). Retrieved from https://www.fiercepharma.com/regulatory/updated-biogen-s-alprolix-nod-just-first-tremor-a-hemophilia-market-shake-up

Bombeli T and Spahn DR. (2004) Updates in perioperative coagulation: Physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. British journal of anaethesia , 93, (2), 275-287.

Castaman G, and Matino D. (2019) Hemophilia A and B: molecular and clinical similarities and differences. Hematologica Journal, 104 (9), 1702-1709.

Cesarman-Maus G and Hajjar KA. (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis.British journal of haematology, 129, (3): 307-321.
Chan JCN and Chan AT. (2017) Biologics and biosimilars: what, why and how? ESMO open Journal, 2(1), 180.
Chang A, Angela Y., et al. (2017) Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, 1, 22-25.
Chavali S, Mahajan A, Ghosh S, et al. (2011).Protein molecular function influences mutation rates in human genetic diseases with allelic heterogeneity.Biochemical and Biophysical Research Communications,412: 716-722.
Chomczynski P and Sacchi N. (2020).RNA Extraction without a Kit. Retrieved from https://www.addgene.org/protocols/kit-free-rna-extraction/
Choo KH, Gould KG, Rees DJ and Brownlee GG. (1982).Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX.Nature journal, 299, (5879):178-180.
Cines DB, et al.(1998).Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.blood journal, 91, (10), 3527-3561.
Coagulation Factor IX. (n.d.). Retrieved from https://www.goprolytix.com/ product-category/human-proteins/human-zymogens/coagulation-factor-ix/
Colvin BT.(2004) Physiology of haemostasis.vox sanguinis journal,1,43-46.
Coppola R, Mari D, Lattuada A and Franceschi C. (2003) Von Willebrand factor in Italian centenarians.Hematologica journal, 88, (1), 39-43.
Doolittle RF, Spraggon G and Everse SJ. (1998) Three-dimensional structural studies on fragments of fibrinogen and fibrin.current opinion in structural biology, 8, (6): 792-798.
Ejiofor JA. (2013) Anticlotting mechanisms I: Physiology and pathology.journal article, 13, (3): 87-92.
Elm T, Ostergaard H and Tranholm M. (2009).Dose response and prolonged effect of 40K PEG-FIX on bleeding in hemophilia B mice. Thrombo Haemostasis journal, 7, (2): 84.
Eveline P. Mauser-Bunschoten, et al. (2021) Managing women-specific bleeding in inherited bleeding disorders: A multidisciplinary approach. Haemophilia, (27), 463-469.
FastDigest BamHI.(n.d.). Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012418_FastDigest_BamHI_UG.pdf
FastDigest KpnI.(n.d.) Retrieved from https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012466_FastDigest_KpnI_UG.pdf
Franchini M, Frattini F, Crestani S and Bonfanti C. (2012). Haemophilia B: current pharmacotherapy and future directions. Expert Opinion on Pharmacotheraby Journal 13, (14): 2053-2063.
Franchini M, Frattini F, Crestani S, et al. (2013) Treatment of hemophilia B: focus on recombinant factor IX.2013, (7), 33-38.
Franchini M. (2006) Hemostasis and aging. Critical Reviews on Oncology hematology, 60, (2): 144-151.
Green PM, Bentley DR, Mibashan RS, Nilsson IM, Giannelli F. (1989) Molecular pathology of haemophilia B. EMBO J. Apr;8(4):1067–1072.
GScript First-Strand Synthesis Kit. (n.d.). Retrieved from. https://www.genedirex.com/Protocol/MB305-0050
Hall JE. (2010) Medical Physiology. Canada: Elsevier.
Heemskerk JW, Bevers EM and Lindhout T. (2002). Platelet activation and blood coagulation. Thromb Haemost; 88(2):186-93.
High Efficient Plasmid purification Kit. (n.d.). Retrieved from https://www.toyobousa.com/lifescience-magextractor-plasmid.html

Howard EL, Becker KC, Rusconi CP, Becker RC. (2007) Factor IXa inhibitors as novel anticoagulants. Arterioscler Thromb Vasc Biol.; 27: 722–727.

Ivens IA, Baumann A, McDonald TA, Humphries T, Michaels LA and Mathew P.(2013).PEGylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers. Haemophelia journal, 19, (1), 11-20.

Kamath S and Lip GY. (2003). Fibrinogen: Biochemistry, epidemiology and determinants. Monthly journal of The Association of Physicians, 96, (10): 711-729.

Koirala S. (2018).Components of polymerase chain reaction. Retrieved from https://overallscience.com/components-of-polymerase-chain-reaction/

Kruse-Jarres R, Kempton CL, Baudo F, Collins PW, Knoebl P, Leissinger CA, Tiede A and Kessler CM. (2017).Acquired hemophilia A: Updated review of evidence and treatment guidance.American Journal of Hematology, 92, (7), 695-705.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N and Aster JC.(2010).Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.Jordan: Saunders.

Kurachi K and Davie EW. (1982). Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 79, (21), 6461-6464.

Kurachi K, Kurachi S, Furukawa M and Yao SN. (1993).Biology of factor IX.Blood Coagulation and Fibrinolysis journal, 4, (6), 953-973.

Lasne D, Jude B and Susen S. (2006).From normal to pathological hemostasis. Canadian Journal of Anaethesia, 53, (6), 2-11.

Lee YW, Hur HS and Kim MH. (1996).Cloning and Expression of Human Clotting Factor 9 cDNA in Escherichia Coli. Korean Journal,2,(2),231-240.

Ligation Protocol Utilizing T4 DNA Ligase.(2018). Retrieved from https://goldbio.com/documents/3886/Ligation%20Protocol%20using%20T4%20DNA%20Ligase.pdf

Llinás A. (2010) Haemophilic arthropathy. Hemophilia Journal, 16, (5), 121.

Ludlam CA and Turner ML. (2006).Managing the risk of transmission of variant Creutzfeldt Jakob disease by blood products. Britich Journal of Hematology, 132, (1): 13-24.

Mackman N, Tilley RE and Key NS. (2007).Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology Journal, 27, (8): 1687-1693.

Manly DA, Boles J and Mackman N. (2011).Role of tissue factor in venous thrombosis.

Mann KG.(1999).Biochemistry and physiology of blood coagulation.Thrombosis and Haemostasis Journal,82,(2): 165-174.

Mannucci PM.(2003).Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. Thrombosis and Haemostasis Journal, 1, (7), 1349-1355.

Mannucci PM.(2008).Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. Haemophilia Journal, 14, (3), 10-18.

Martinowitz U and Lubetsky A. (2013) A safety and efficacy study of a recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in patients with hemophilia B. Retrieved from http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01496274.

Martlew VJ. (2000). Peri-operative management of patients with coagulation disorders. British Journal of Anaethesia, 85, (3), 446-455.

Messori A and Trippoli S. (2017) The price of enhanced half-life factor IX. Blood Trnafusion Journal. 15(4), 378.

Michael M. Phillips and David Zieve. (2021). liver biopsy. Retrieved from https://www.mountsinai.org/health-library/tests/liver-biopsy

Monahan PE and Di Paola J. (2010).Recombinant factor IX for clinical and research use. Seminares in Thrombosis and Haemostasis Journal, 36, (5), 498-509.
Monroe DM, Hoffman M and Roberts HR. (2010).Williams Hematology.New York:McGraw-Hill.
Naddafia F, Davamib F, Tabarzadc M, et al. (2019) Construction of a Mammalian IRES-based Expression Vector to Amplify a Bispecific Antibody; Blinatumomab.Iranian Journal of Pharmaceutical Research,18,(4): 2117-2123.
Oldenburg J and Schwaab R. (2001).Molecular biology of blood coagulation. Seminares in Thrombosis and Haemostasis Journal, 27, (4), 313-324.
Opal SM, Kessler CM, Roemisch J and Knaub S. (2002).Antithrombin, heparin, and heparan sulfate. Critical Care Medicine, 30, (5), 325-331.
Owens AP and Mackman N. (2010).Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. Thrombosis and Haemostasis Journal, 104, (3), 432-439.
Palta S, Saroa R and Palta A. (2014).Overview of the coagulation system. Indian J Anaesth, 58, (5), 515-523.
Paridar M, Amirizadeh N, Roudkenar M, et al. (2014). Expression of Recombinant Coagulation Factor IX in Human Amniotic Membrane-derived Mesenchymal Stem Cells: A New Strategy to Gene Therapy of Hemophilia B. Iranian Journal of Blood and Cancer, 6, (3): 133-141.
Peters RT, Low SC, Kamphaus GD, et al. (2010).Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein. Blood Journal, 115, (10): 2057-2064.
Pinjala RK, Reddy LR, Nihar RP, Praveen GV and Sandeep M. (2012).Thrombophilia How far and how much to investigate? The Indian Journal of Surgery, 74, (2), 157-162.
Pipe SW. (2008). Recombinant clotting factors. Thrombosis and Haemostasis Journal, 99, (5): 840-850.
Polderman HK. (2012). Hypothermia and coagulation. Critical Care Journal, 16, (2),1-42.
Polymerase chain reaction (PCR) Fact Sheet.(2020).Retrieved from https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet
Polymerase Chain Reaction (PCR) Process Steps. (n.d.).Retrieved from https://www.coleparmer.com/tech-article/pcr-process-steps-explained
Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM and Martinelli I. (2011). Risk factors for venous and arterial thrombosis.Blood Transfusion Journal, 9, (2), 120-138.
Price GC, Thompson SA and Kam PC. (2004).Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. Anaesthesia Journal, 59, (5), 483-492.
Reece JB, Urry LA, Cain, ML, et al. (2011) DNA sequencing. Retrieved from https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and regulation/biotechnology/ a/dna-sequencing
Reitsma P.H., Bertina R.M., Ploos van Amstel J.K., Riemens A.and Briet E.(1998).Blood Journal,72,(3),1074-1076.
Reverse Transcription PCR. (2022). Retrieved from https://theory.labster.com/reverse-transcriptase-pcr/
Rigby AC and Grant MA. (2004).Protein S: A conduit between anticoagulation and inflammation.Critical Care Medicine Journal, 32, (5), 336-341.
Roberts HR, Stinchcombe TE and Gabriel DA. (2001). The dysfibrinogenaemias. British Journal of Hematology, 114, (2), 249-257.
Rodriguez MH, Enjolras N, Plantier J, et al. (2002) Expression of Coagulation Factor IX in a Haematopoietic Cell Line. Thrombosis and Haemostasis Journal, 87: 366-373.
Rogaev EI, Grigorenko AP, Faskhutdinova G, Kittler EL and Moliaka YK. (2009).Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease". Science Journal, 326, (5954), 817.

Saberkari H, Shamsi M, Herav H, et al. (2013). A Fast Algorithm for Exonic Regions Prediction in DNA Sequences. Journal of Medical Signals & Sensors, 3, (3), 139-149.

Sadler JE. (1998).Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. Annual Review of Biochemistry, 67, (1), 395.

Salen P and Babiker HM. (2021).Hemophilia A. Treasure Island (FL):StatPearls Publishing.

Santagostino E et al. (2012). Long-term safety and efficacy of recombinant human coagulation factor IX fusion protein (rFIXFc) in the prevention and treatment of bleeding episodes in previously treated subjects with hemophilia B. Retrieved from https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01425723

Santagostino E, Negrier C, Klamroth R, et al. (2012).Safety and pharmacokinetics of a novel recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rFIX-FP) in hemophilia B patients. Blood Journal, 120, (12), 2405-2411.

Schramm W. (2014).The history of haemophilia - a short review.Thrombosis Research Journal, 134, (1), 4-9.

Stonebraker JS, Bolton-Maggs PH, Soucie JM, et al. (2010).A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world.Hemophilia Journal, 16, (1), 20-32.

The Plasmid Cloning Cycle. (n.d.). Retrieved from https://www.snapgene.com/guides/the-plasmid-cloning-cycle

Thornton P and Douglas J. (2010). Coagulation in pregnancy. Best Practice & Research Clinical Obestetrics & Gynaecology, 24, (3), 339-352.

Tonbary YA, Elashry R and Zaki Mel S. (2010). Descriptive epidemiology of hemophilia and other coagulation disorders in mansoura, Egypt: retrospective analysis. Mediterrian Journal of Hematology and Infectious Diseases, 2, (3), e2010025.

Triplett DA. (2000).Coagulation and bleeding disorders: Review and update.clinical chemistry journal, 46, (8 pt 2), 1260-1269.

Yenicesu I, Yetgin S, Ozyürek E and Aslan D.(2002).Virus-associated immune thrombocytopenic purpura in childhood.Pediatric Hematology & Oncology,19,(6),433-437.

Zacchi, L.F., Roche-Recinos and D. Pegg.Coagulation factor IX analysis in bioreactor cell culture supernatant predicts quality of the purified product. (2021).Communication Biology, 4, (3), 390.

Zhong D., Bajaj M.S., Schmidt A.E. and Bajaj S.P. (2002). The N-terminal epidermal growth factor-like domain in factor IX and factor X represents an important recognition motif for binding to tissue factor .Biologycal Chemistry Journal, 277,(5), 3622-3631.

Zilinskiene J .(n.d.). GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012655_GeneJET_Plasmid_Miniprep_UG.pdf

Zilinskiene J. (n.d.). Silica Bead DNA Gel Extraction Kit.Retrieved from. https://assets.fishersci.com/TFS Assets/LSG/manuals/MAN0012657_Silica_Bead_DNA_Gel_Extraction_UG.pdf

Zimmerman B and Valentino LA. (2013).Hemophilia: in review.Pediatrics in Review, 34, (7), 289-294.

Abstract

Hemophilia B, is considered one of the genetic diseases of great importance that leads to disorders in blood clotting and bleeding cessation. The disease is diagnosed with a deficiency in the amount and effectiveness of human coagulation factor IX, which leads to inhibition of clot formation necessary to stop spontaneous or lesion-induced bleedings. The recent manufacturing of biologic drugs containing recombinant factor IX, rFIX, has contributed to proper management of haemophilia B patients and to the improvement of their quality of life (QoL). However, the high price of these biological drugs constitutes one of the main determinants in receiving a large number of patients the appropriate and sufficient doses to reverse their bleeding.

In this research, we aimed to clone human factor IX gene and produce it in eukaryotic gene expression systems, taking into account the post-translational modifications that occur to human factor IX in hepatocytes, which are necessary to carry out its function in inducing clot formation and bleeding cessation. However, many challenges faced us, starting from the great difficulty in obtaining suitable human liver biopsy samples, and ending with the conditions of the infrastructure in the laboratories, which prevented the achievement of the goals of this research. Despite the fact that we have carried out all the required practical steps, from isolating RNA from liver biopsy samples that we obtained, synthesizing complementary DNA, and amplifying it using specific primers for human coagulation factor IX that have been verified through bioinformatics means, its cloning in a plasmid suitable for expression, and the transformation of bacterial cells with it, the result of the final sequence of the amplification product was negative and we were unable to obtain the sequence of coagulation factor IX to move into the steps necessary for its expression. The negative results of our research indicate the necessity

of isolating the mRNA of human clotting factor IX from human liver cell lines that we could not obtain during the research period.

Syrian Arab
Republic
Damascus
University
Faculty of
Agricultural

Cloning and Expression of Coagulation Factor IX Gene In Mammalian Cells

by

Osama Mohammad Ali AL.Najjar

Thesis submitted to fulfillment of the requirements
Master degree In Agricultural Science
(Biotechnology)

Supervisors

Prof.Dr. Huda AL.Kwas

Department of Plant Protection
Faculty of Agricultural
Damascus University

Dr. Majd AL.jamali

Department of Biochemistry and Microbiology
Faculty of Pharmacy
Damascus University

2023