الارتقاء بالبحوث العلمية طريقنا لخدمة المجتمع

تقدير فعالية أنزيم كلوكوز – 6 – فوسفيت دي هايدروجينيز G6PD وعلاقته بطفرة C/T 563 في جين G6PD في دم الاطفال المصابين بفقر الدم التحللي

احمد شاكر احمد الدوري[1] ، وسن نزهان حسين العاصي[1] ، عدنان فاضل العزاوي[2]

[1]قسم الكيمياء ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2]قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

معلومات البحث

الكلمات المفتاحية:

أنزيم G6PD ، فقر الدم الانحلالي، جين انزيم G6PD

الاسم: احمد شاكر احمد الدوري

البريد الاليكتروني:

Ahmed.aldoorii@gmail.com

رقم الهاتف:

الملخص

هدف الدراسة تقدير مستوى فعالية انزيم G6PD كمياً والكشف عن طفرة الاستبدال *C/T 563* في جين G6PD للاطفال المصابين بفقر الدم التحللي في محافظة كركوك.

شملت الدراسة (60) طفل مصاب بداء الباقلاء Favism بأعمار تتراوح بين (3ـ 10) سنة بواقع (39) ذكر و(21) انثى، اضافة الى (30) طفل اصحاء من نفس الفئة العمرية كمجموعة سيطرة بواقع (21) ذكر و(9) انثى.

اظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي في فعالية انزيم G6PD لدى الاطفال المصابين بفقر الدم التحللي للذكور والاناث مقارنة بالأصحاء حيث بلغت الفعالية (2.75 ± 5.04) وحدة دولية / غم عند مستوى احتمالية ($P\leq0.01$)، اما الاصحاء فبلغت (1.5 ± 12.49) وحدة دولية/غم، كما بينت النتائج ان النمط الوراثي (NN) الطبيعي كان بنسبة 19.05%، النمط الوراثي الهجين NM كان بنسبة 66.66% والنمط الوراثي الطافر MM كان بنسبة 14.29% في مجموعة المرضى لعينة الاناث الذي بلغ عددهن (21 انثى)، اما في عينة الذكور كانت نسبة النمط الوراثي الطافر MM كان بنسبة 58.97% والنمط الوراثي الغير طافر كان بنسبة 41.03% ، وهذا يفسر بعدم وجود النمط الوراثي الهجين NM في عينة الذكور لأن الذكر يحتوي على كروموسوم X واحد، فأما يكون طافراً او غير طافر.

يمكن ان نستنتج وجود علاقة بين الطفرة C/T 563 لجين G6PD ومرض فقر الدم التحللي وان نسبة اصابة الذكور اعلى من الاناث، من ناحية اخرى ارتفاع تركيز انزيم G6PD لمجموعة مرضى التركيب الوراثي الطافر للذكور بالمقارنة مع الطبيعي بينما لم يكن هناك اختلاف في تركيز انزيم G6PD في الاطفال الاناث المرضى.

المقدمة

تم توصيف انزيم G6PD،Oxidoreductas EC 1.1.1. 49: لأول مرة من قبل Warburg and Christion عام 1931[1]، وهو من الأنزيمات السايتوبلازمية الذي ينتشر في جميع خلايا الجسم ولاسيما في كريات الدم الحمر[2] ، ويعد من اهم أنزيمات الايض كونه المفتاح الاول والرئيس لدورة السكريات السداسية (Hexose Monophosphate Shunt HMPS). جين أنزيم G6PD من الجينات المستمرة التعبير الجيني housekeeping gene يتألف من Exon 13 و 12 Intron يقع على الكروموسوم X على الذراع الطويل (q) المنطقة (2) الحيز 8 (Xq28) [3] مع تسلسل قاعدي يتضمن 1545 زوج قاعدي على طول السلسلة، ان نقص أنزيم G6pd يعتبر مرضاً وراثياً يحصل بسبب وجود طفرة على الجين المنتج لهذا الأنزيم والموجود على الذراع الطويل للكروموسوم X [4]، هناك أنواع كثيرة من الطفرات المؤدية لنقص أو ضعف انتاج أنزيم G6PD، ويُعتقد أنه يوجد فوق 400 نوع يختلف من الطفرات وأن اختلاف أنواع الطفرات يفسر إلى حد ما الاختلاف في الأعراض، اذ إن هناك بعض الطفرات التي تتميز بأحداث تكسر تلقائي لكريات الدم

الحمر للمواليد وهناك أنواع اخرى تتميز بحدوث تكسر تلقائي مستمر للدم حتى من دون التعرض للمواد المؤكسدة [5]، توجد ثلاث متماثلات للأنزيم منها النظير G6PD:A[6]، وكذلك النظير G6PD: Mountsinai والنظير G6PD:Santamaria [7]. يوجد في هذا النوع من المتناظر يتم استبدال واحلال اثنين من الأحماض الأمينية وتم وصف هذه المتغيرات في كل مرة على انها من النوعA: G6PD. في دراسة قام بها عدد من الباحثين تم تسجيل استبدال ثلاثة احماض امينية في النظير من النوع G6PD:Vancouver ونادراً ما يحصل النقص الأنزيمي عن طريق الغاء حامض اميني، وقد سجل الغاء حامضين امينيين متجاورين في الموقع وانتج النظير G6PD:Stony brook [8]. وفي دراسة اخرى وجد عدد من الباحثين نقص ثمانية احماض امينية في احد النظائر وانتج النظير G6PD:Nara [9]، هذه الطفرات التي تحدث في الجين تؤدي الى حدوث تباين في مستويات الفعالية الأنزيمية فبعض الطفرات لا تؤدي الى حدوث خلل في تركيب الأنزيم او موقعه الفعال لذلك فان الأنزيم يبقى محافظاً على فعاليته التحفيزية، وهناك طفرات بإمكانها احداث خلل في تركيب والموقع الفعال للأنزيم والتي تؤدي الى زيادة او نقصان الفعالية التحفيزية، او في الحالات الشديدة تؤدي الى تدمير الأنزيم فمثلاً طفرة هيكتون G6PD Hektoen تزيد من فعالية الأنزيم فهي تؤدي الى استبدال الهستادين بدل التايروسين [10]، وطفرة كوسينزا G6PD-Cosenza المتباينة تحدث خفض في فعالية الأنزيم اقل من 10% وسبب ذلك استبدال في الموقع 459 من الارجنين الى البرولين[11]. لذلك فأن نقصه يسبب استنفاد NADPH في كريات الدم الحمر[12]، ونقص هذا الأنزيم قد يسبب الوفاة اذا كان في كريات الدم الحمر، فضلاً عن أن نقصه يمكن ان يسبب الموت نتيجة حصول فشل كلوي حاد نتيجة اعاقة النبيبات الكلوية بوساطة الهيموكلوبين المتحرر عن تحلل كريات الدم الحمر[13].

يؤدي نقص هذا الأنزيم الى حالة فقر دم تحللي Hemolytic Anemia ناتج عن تكسر كريات الدم الحمر ونسبة التكسر هذه ترتفع لدى الافراد المصابين بنقص الأنزيم عند تعرضهم لأي مادة مؤكسدة سواء كانت خارجية (Exogenous Substances) مثل حبوب الباقلاء (*Vicia faba*)، وذلك لاحتوائها على مركبين هما Convieine و Vieine، وكلا المركبين مرتبطين باصرة من نوع بيتا – كلايكوسيد Glycosides -β، وتتحول بفعل أنزيم -β Glycosidase الى الكلايكونات المقابلة التي تعمل على اكسدة الكلوتاثيون المختزل (GSH) وتحوله الى الشكل المؤكسد (GSSG)[14]، او تعاطي بعض العقاقير المؤكسدة، او مواد مؤكسدة داخلية المنشأ Endogenous oxidand Substances متكونة داخل جسم الانسان نتيجة للعمليات الايضية او بسبب بعض الاصابات ومنها الاصابات الفيروسية مثل التهاب الكبد الفيروسي الحاد والمزمن Acute and Chronic Viral hepatitis [15].

هدف هذه الدراسة تقدير فعالية انزيم (G6PD) كمياً وتحديد طفرة الاستبدال C/T 563 في جين G6PD والعلاقة بينها وبين نقص انزيم (G6PD) لمجموعة من الاطفال المصابين بفقر الدم التحللي بالمقارنة مع الاطفال الاصحاء في مدينة كركوك.

المواد وطرق العمل

جمع العينات :

تضمنت نماذج الدراسة اطفال بعمر (3 ـ 10) سنة من مستشفى الاطفال في كركوك من الأطفال المصابين بمرض فقر الدم التحللي، بلغ مجموع النماذج الكلية للأطفال (90) نموذجا بواقع (60) عينة مصابين بفقر الدم التحللي (39) ذكر و (21) انثى، و(30) عينة من مجموعة السيطرة بواقع (21) ذكر و(9) انثى. سحب (3 ـ 5) مليلتر دم من الوريد العضدي بدون ربط التورنيكا من الاشخاص الطبيعيين والمرضى ثم حفظت عينات الدم اثناء الجمع في صندوق مبرد(Cold Box) وتم تجزئة العينة الى جزئيين:

الجزء الاول : وضع حوالي (1) مليلتر من الدم في انابيب بلاستكية ذات اغطية حاوية على مادة مانعة للتخثر(EDTA) ،وذلك لأجراء قياس مستوى فعالية الانزيم مباشرة من كريات الدم الحمر بنفس الوقت او حفظ العينة في الثلاجة بدرجة C^0 (2 ـ 8)، لمدة تتراوح من (3 . 7) ايام. **الجزء الثاني:** عزل الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين من الدم. تم عزل (DNA) من جميع عينات الدم المحفوظة في انابيب EDTA للمرضى المصابين بفقر الدم الانحلالي والاصحاء، باستخدام طريقة عزل (DNA) من الدم الكلي. باستخدام طريقة العمل التي ذكرها (Roulston and Bartlatt) (16)، والمحورة من قبل (Al – Azaawie 2012)[17] .

فعالية انزيم (G6PD) :

تم تقدير فعالية الانزيم كمياً باستخدام العدة التشخيصية المجهزة من قبل شركة BIOLABO FRANCE الفرنسية، حيث تعتمد الطريقة على حساب الزيادة في معدل تركيز NADPH في الطول الموجي المحدد nm (340) هي نسبة فعالية G-6-PDH في عينة الدم[18][19].

الكشف عن طفرة C/T 563 في جين G6PD بتقنية ARMS

استخدام البادئات المبينة في الجدول رقم (1) مع طريق تقنية الـARMS-PCR حيث ان (**563C**) هي قاعدة الارتباط في شريط الDNA الطبيعي وان الطفرة تحدث في ارتباط **T** بدل ال **C** في النهاية 3' (C/T).

جدول (1): يمثل البادئات المستخدمة الخاصة بجين (*563 C/T G6PD*) المسؤول عن الانزيم G6PD

البادئ	تتابعه	الجين
Common Reverse Primer	5'-CCAGCCTCCCAGGAGAGA-3'	563 C/T G6PD
Forward N Primer	5'-CCGGCTGTCCAACCACATATC-3'	
Forward M Primer	5'-CCGGCTGTCCAACCACATATT-3'	

اجريت بعض التجارب الاولية للوصول الى التركيز الامثل للبادئات المستخدمة والدنا القالب الذي يعطي افضل نتيجة للتضاعف لكل عينة من عينات الدراسة، نأخذ (Eppendroffe tube) عدد (2) الحاوي على المزيج الجاهز (PreMix) لكل نماذج الدراسة والبالغ حجمه (2µL) ويتم اضافة كميه من الماء المقطر المعقم بحجم (12 µL)، ثم بعدها يضاف البادئ الاول (Primer) المتخصص (Common Reverse Primer)[20] بجين (*563 C/T G6PD*) والبالغ تركيزه (10pmol) بحجم (0.5µL) لكل العينات، ثم بعدها يتم تجزئة كل عينة والتي تحتوي على (Eppendroffe tube) عدد(2) حيث يتم اضافة حجم (µ0.5L) من البادئ الثاني (Forward N)على Eppendroffe tube الاول ويسجل عليه الرمز (N) ،ويضاف حجم (0.5µL) من البادئ الثالث (Forward M) على Eppendroffe tube الثاني الخاص بالعينة الواحدة ويسجل عليه الرمز (M) ، ثم اخيراً يتم اضافة (2µL) من الـ DNA المجيني المخفف البالغ تركيزه (20ng) لكل العينات ،حيث يتم العمل على بقية النماذج بهذا الشكل وبذلك يصبح مزيج التفاعل الرئيسي للـ PCR-Specific بحجم (µ20L) لكل عينة، ثم يتم نبذ المزيج في جهاز (Micro centrifuge) لفترة من (3–5) ثانية لإتمام مزج مكونات التفاعل، ويجب مراعات ان يكون العمل تحت ظروف معقمة لتجنب حدوث التلوث وان توضع الانابيب في الثلج اثناء العمل، أدخلت الانابيب الحاوية على العينات الى جهاز المبلمر الحراري (Thermo cycler) لأجراء التفاعل التضاعفي وتم تطبيق البرنامج المناسب للتضاعف وتم تطبيقه على التفاعلات اللاحقة جميعها كما مبين في الجدول (2) الاتي:

جدول (2): برنامج التضاعف للدنا المجيني

Steps	Temperature	Time	Number of cycles
Initial denaturation	94 °C	5 min	1
Denaturation	94 °C	45 sec	30
Annealing	61 °C	45 sec	
Extension	72 °C	1 min	
Final extension	72 °C	10 min	1

بعد انتهاء وقت التفاعل ترفع الانابيب من جهاز المبلمر الحراري وتم سحب (µ5L) من كل عينة ، وتم تحميلها في حفر هلام الاكاروز المحضر مسبقا وبتركيز (2%) مع الدليل الحجمي M DNA ، رحلت العينات بتشغيل جهاز الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) بخطوتين:- الاولى (10min+ 60 ma+45V) ، الثانية (120V + 65min + 200ma) ، يتم بعدها صبغ الهلام بغمره بصبغة بروميد الاثيديوم لمدة (30min) مع التحريك ، وبعد انتهاء وقت التصبيغ يتم تصوير الهلام بوساطة جهاز E-Graph الموصل بجهاز الحاسوب.

التحليل الاحصائي

تم تحليل النتائج باستخدام برنامج (SPSS) باستخدام اختبار (T-test) لتحليل التباين بين مجموعتين عند مستوى احتمالية (P≤0.01)، حسب تكرار الاليلات والتراكيب الوراثية لمجموعة المرضى والاصحاء كما تم تقدير متوسط تركيز انزيم G6PD ضمن مجموعة المرضى حسب التركيب الوراثي ثم تمت المقارنة بينهم باستخدام اختبار (X^2) Chi-squared[21].

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج المبينة في الجدول (3) وجود انخفاض معنوي عالي عند مستوى احتمالية (p≤0.01) لفعالية انزيم G6PD لدى الاطفال المصابين بفقر الدم التحللي حيث بلغت قيمتها (2.75 ± 5.04) وحدة دولية /غم مقارنة بالأصحاء التي بلغت قيمتها(1.5 ± 12.49) وحدة دولية / غم وهذا يتفق مع دراسة اجراها الجنابي[22].

جدول (3) يبين متوسط قيم فعالية انزيم G6PD الدموية للأطفال المصابين بفقر الدم التحللي ومجموعة السيطرة لكلا الجنسين

Parameters	Patients Group Mean ±S.D	Control Group Mean ±S.D	P value
G6PD IU/g	5.04 ± 2.75	12.49 ± 1.5	P≤0.01

وجدت الدراسة الحالية ان النقص في فعالية هذا الانزيم يؤثر على خلايا الجسم جميعا ومن ضمنها كرية الدم الحمراء حيث انها اكثر تأثرا بالنقص الحاصل بالأنزيم والسبب يعود الى إن عمل الأنزيم G6PD الرئيس هو حماية الكلوتاثيون المختزل في الكرية الحمراء عن طريق تكوين ناقل الطاقة المختزل NADPH وفي حالة غياب الكلوتاثيون أو نقصان تركيزه في الكرية الحمراء فإن ذلك يؤدي إلى زيادة ضغط الأكسدة على غشاء الكرية وينتج عن ذلك حالة من تحلل الدم [23].

بعد ترحيل ناتج الـ ARMS – PCR لـ (60) عينة دنا من الاطفال المشخصين سريرياً بإصابتهم بمرض فقر الدم التحللي و (30) عينة DNA من الاطفال الاصحاء كمجموعة سيطرة على هلام الاكاروز بتركيز 2% ظهرت الحزم الناتجة من التضاعف بحجم (442bp) كما في الشكل (1)، بلغت نسبة وجود الطفرة في الاطفال المصابين

(43.3%) ناتجة من 26 عينة مصاب (23 ذكور مصابين و 3 اناث مصابات) من مجموع 60 عينة مصابين، هذا يؤكد ان ليس كل الاطفال المشخصين سريرياً على انهم مصابين بالمرض هم من الناحية الوراثية يحملون الجين الوراثي للمرض.

شكل (1) يوضح نواتج تقنية ARMS – PCR المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 2% لبعض عينات الأطفال المصابين بفقر الدم التحللي.
M الدليل الحجمي ، و N تركيب وراثي اعتيادي طبيعي ، و NM تركيب وراثي هجين ، و M تركيب وراثي طافر

ظهور حزمة ARMS-N بحجم 442bp مع عدم ظهور حزمة ARMS-M وهذا يدل على ان التركيب وراثي اعتيادي (اصيل). ظهور حزمة ARMS-M بحجم 442bp وعدم ظهور حزمة ARMS-N دلالة ان التركيب وراثي طافر. ظهور حزمتين بحجم 442bp لكل من ARMS-N و ARMS-M وهذا يدل على ان التركيب وراثي هجين.

التركيب وراثي الهجين يمكن الحصول عليه لعينات الاناث حصراً لان الاناث يمكن ان تكون حاملة للمرض وغير مصابة لان تركيبها الوراثي هو XX [20]. وعلى هذا الاساس تم تشخيص جميع العينات ووجد ان عينة الاصحاء والبالغة 30 عينة (21 ذكر و 9 اناث) كان التركيب الوراثي لجميع افراد العينة اعتيادي اصيل كما في الشكل(2).

شكل (2): يوضح نواتج تقنية ARMS – PCR المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 2% لبعض عينات الدنا المجيني للأطفال الاصحاء المستخلص من الدم . N تركيب وراثي اعتيادي اصيل ، و NM تركيب وراثي هجين ، و M تركيب وراثي طافر

اما بالنسبة للمصابين فكان التشخيص الوراثي لها كما موضح في الجداول ادناه :

جدول (4) يوضح الجدول الانماط الوراثية وتكرار الاليلات لجين انزيم G6PD للإناث المصابين بمرض فقر الدم التحللي

الاناث	NN	NM	MM	Total
Qi الافراد المشاهدة	4	14	3	21
Ei الافراد المتوقعة	5.766	10.476	4.758	21
النسبة المئوية	%19.05	%66.66	%14.29	
التكرار الاليلي	F(N) = 0.524		F(M) = 0.476	
χ^2 المحسوبة = 2.374		χ^2 الجدولية = 3.84		

نلاحظ ان قيمة χ^2 المحسوبة اقل من قيمة χ^2 الجدولية لذا فان العينة المحسوبة متطابقة للمجتمع متوازن حسب قانون هاردي – واتيريك وان التكرار الاليلي للأصحاء والطفرات متطابقة من الناحية الوراثية، ويلاحظ ان عينة الاناث المصابين بالمرض من الناحية الوراثية تظهر نسبة 19.05% كانت اعتيادي، و66.66% اعتيادي هجين مما يشكل نسبة (85.71%) هم شخصوا بالمرض بينما هم من الناحية الوراثية اعتيادي اصيل او خليط وهذا ما يرجع الى اما ان الجين الوراثي في هذه المشاهدات غير قادر على التعبير عن نفسه Gene Expression وذلك بسبب ما يسمى بالجين الصامت Gene Silent او الى وجود بعض الهورمونات او المنظمات قد تؤدي الى قلة نواتج الانزيم G6PD في هذه الافراد[24].

بينما كانت نسبة 14.29% من عينة الاناث المصابات بالمرض كانت تحمل الطفرة الوراثية 563 C/T وكانت متطابقة في تشخيصها سريرياً ووراثياً.

جدول (5) يوضح الجدول الانماط الوراثية وتكرار الاليلات لجين انزيم G6PD للذكور المصابين بمرض فقر الدم التحللي

الذكور	NN	MM	Total
Qi الافراد المشاهدة	16	23	39
النسبة المئوية	%41.03	%58.97	
التكرار الاليلي	F(N) = 0.411	F(M) = 0.589	

بينما في عينة الذكور المصابين يلاحظ ان نسبة التكرار الاليلي للاليل السائد والمتنحي متطابقة تقريباً بالنسبة الوراثية 1 : 1 الا انه يلاحظ ان نسبة 41.03% من الذكور اظهرت النتائج من الناحية الوراثية هم اعتيادي بينما تم تشخيصهم على انهم مصابون بالمرض وهذا يفسر اما ان الجين الوراثي غير قادر على التعبير عن نفسه لظروف معينة او انهم تم تشخيصهم سريرياً غير متطابق مع حالتهم الوراثية وقد يكون تأثروا بالأدوية المسببة لتكسر كريات الدم الحمر، او من خلال التغذية الغير صحيحة.

وعند مقارنة عينة الذكور والاناث في عينة المصابين والبالغة 60 فرداً يلاحظ ان نسبة الذكور المصابين الى الاناث تقريبا 4 : 1 وهذا يتفق مع ما جاء به Arnaout[20] ،على اطفال المجتمع المصري ، كذلك توافقت مع دراسة اخرى قام بها العلوي واخرون[131]، على نسبة الاصابة بالطفرة في العراق في المجتمع الكردي بانها نسبة عالية تصل الى 87.8% ، وتوافقت النتائج مع دراسة اجراها الاحمر[26]، على المجتمع الليبي حيث قام بتشخيص نوعين من الطفرات عند الحالات المصابة بنقص G6PD وهي طفرة البحر المتوسط (563C–T) وهي التي تعد الاكثر انتشاراً ايضا في العراق ، وطفرة النمط الافريقي (G6PD A – Matera).

فسرت الدراسة الحالية ان هذا المرض ينجم عن طفرة في جين انزيم G6PD والموجودة على الكروموسوم X وبذلك ينخفض مقدار الفعالية الانزيمية في الدم او يحدث تغيير في تركيبه ، حيث يرث الذكور نسخة واحدة من الكروموسوم X ونسخة واحدة من الكروموسوم Y من الابوين وبما ان هذا المرض ينجم عن حدوث الطفرات التي تصيب الكروموسوم X فأن وجود خلل في نسخة واحدة من الجين بإمكانه اظهار المرض لدى الذكور مما يفسر نسبة الاصابة للذكور اعلى من الاناث ، اما الاناث فهي ترث نسختين من الكروموسوم X(نسخة واحدة من كل الابوين) وفي هذه الحالة يتم تعويض الخلل الحادث في احدى هاتين النسختين عن طريق وجود نسخة ثانية سليمة من الجين الامر الذي يترتب عليه حمل كثير من الاناث لصفة المرض دون ظهور اية اعراض سريرية وهذا يتطابق مع دراسة درويش [27]، مع ذلك يمكن ان يظهر المرض لدى الاناث في حالات نادرة نتيجة خلل في نسختي الجين مما يؤدي التكسر شديد في كريات الدم الحمر [28].

وقد تم مقارنة متوسط تركيز انزيم G6PD حسب التراكيب الوراثية لمجموعة المرضى الذكور البالغ عددهم (39) مصاب والاناث البالغ عددها (21) مصابة بفقر الدم التحللي كما في الجداول ادناه :-

حيث اشارت النتائج في الجدول (6) الى وجود اختلافات معنوية في الاطفال الذكور المصابين عند قيمة احتمالية (0.006) متوسط تركيز انزيم G6PD حسب التراكيب الوراثية .

جدول (6): مقارنة متوسط تركيز انزيم G6PD لمجموعة المرضى الذكور المصابين بفقر الدم التحللي حسب التركيب الوراثي

المتغير	الطراز الوراثي		P≤
	طبيعي NN NO.=16 Mean ±S.D	طافر MM NO.=23 Mean ±S.D	
G6PD	3.65±0.64	6.15±0.55	P≤0.006

اذ نلاحظ ارتفاع تركيز انزيم G6PD لمجموعة مرضى التركيب الوراثي MM (6.15±0.55)، مقارنة مع مجموعة المرضى ذو التركيب الوراثي NN (3.65±0.64) .

جدول (7): مقارنة متوسط تركيز انزيم G6PD لمجموعة المرضى الإناث المصابات بفقر الدم التحللي حسب التركيب الوراثي

المتغير	الطراز الوراثي		P≤
	طبيعي NN NO.=4 Mean ±S.D	طافر MM NO.=3 Mean ±S.D	
G6PD	3.17±0.67	4.52±1.62	P≤0.5

اظهرت النتائج المبينة في الجدول (7) عدم وجود اختلافات معنوية في تركيز انزيم G6PD في الاطفال الاناث المرضى بفقر الدم التحللي ذات التركيب الوراثي NN مع الاناث المرضى ذات التركيب الوراثي MM .

جدول (8): مقارنة متوسط تركيز انزيم G6PD لمجموعة المرضى الإناث المصابات بفقر الدم التحللي حسب التركيب الوراثي

المتغير	الطراز الوراثي		P≤
	طبيعي NN NO.=4 Mean ±S.D	طافر NM NO.=14 Mean ±S.D	
G6PD	3.17±0.67	5.46±0.73	P≤0.04

واظهرت النتائج المبينة في الجدول (8) وجود اختلافات معنوية عند قيمة احتمالية (0.04) لتركيز انزيم G6PD في الاناث المصابات، اذ نلاحظ ارتفاع تركيز انزيم G6PD لمرضى التركيب الوراثي الهجين NM (5.46±0.73) مقارنة مع مرضى التركيب الوراثيNN (3.17±0.67).

جدول (9): مقارنة متوسط تركيز انزيم G6PD لمجموعة المرضى الإناث المصابات بفقر الدم التحللي حسب التركيب الوراثي

المتغير	الطراز الوراثي		P≤
	طبيعي NM NO.=14 Mean ±S.D	طافر MM NO.=3 Mean ±S.D	
G6PD	5.46±0.73	4.52±1.62	P≤0.6

ثم اظهرت النتائج في الجدول (9) كذلك الى عدم وجود اختلافات معنوية في تركيز انزيم G6PD في الاطفال الاناث المرضى بفقر الدم التحللي ذات التركيب الوراثي الهجين NM مع الاناث المرضى ذات التركيب الوراثي MM.

بينت الدراسة الحالية هنالك (16) عينة للذكور من اصل (39) عينة مصاب و(18) عينة للإناث من اصل (21) عينة مصابة ظهر لديهم انخفاض في فعالية انزيم G6PD دون المؤشر الى وجود طفرة لذا يمكن ان يعزى سبب الانخفاض في الفعالية الانزيمية الى الكثير من الاسباب الممكنة لحدوث فقر الدم التحللي دون حصول الطفرة ومن هذه الاسباب يمكن ان تتأكسد مكونات الكرية الحمراء عن طريق اتحاد تساهمي بين بعض المركبات الفينولية وجزء الهيم من الخضاب مما يؤدي الى تحلل الهيموكلوبين، كذلك اكسدة الحامض الاميني β – Cysteine 93 في سلسلة الكلوبين مما يؤدي الى انفراط التركيب المنطوي للهيموكلوبين ومن ثم سهولة اكسدة المجموعات الهيدروكبريتية التي تكون محمية داخل طيات الهيموكلوبين [29] ، او يمكن ان هذه الطفرات التي تحدث في الجين تؤدي الى حدوث تباين في مستويات الفعالية الانزيمية فبعض الطفرات لا تؤدي الى حدوث خلل في تركيب الانزيم او موقعه الفعال لذلك فأن الانزيم يبقى محافظاً على فعاليته التحفيزية، وهناك طفرات بإمكانها احداث خلل في التركيب والموقع الفعال للأنزيم والتي تؤدي الى زيادة او نقصان الفعالية التحفيزية، او في الحالات الشديدة تؤدي الى تدمير الانزيم[30].

يمكن ان نستنتج وجود علاقة بين الطفرة ومرض فقر الدم التحللي وان نسبة اصابة الذكور اعلى من الاناث، من ناحية اخرى ارتفاع تركيز انزيم G6PD لمجموعة مرضى التركيب الوراثي الطافر للذكور بالمقارنة مع الطبيعي بينما لم يكن هناك اختلاف في تركيز انزيم G6PD في الاطفال الاناث المرضى.

المصادر

1. Campo, S . M Del. and R. Pation (2001), Kinetic and thermodynamic Study of the Reaction Catalyzed by glucose – 6 – phosphate dehydrogenase With nicotinamide adenine di neuleotide , *Thermochemical Acta* ,517, No, 1 – 2, PP . 40 – 44.

2. Francis, R, J, hang J, H, J . Zimring J . Hod E. (2012) Frequency of glucose – 6 – phosphate dehydrogenase deficient red blood Cell units in a metropolitan transfusion service . *Transfusion* .

3. Nadira, Akter, Noorzahan Begum , Sultana Ferdous (2016) : Glucose – 6 – phosphate (G6PD) Status in female Type 2 Diabetes Mellitus and its Relation Ship with HbAIC,.*University of Tehran , Iran* : 73-79.

4. Moiz, B. N., A. Moatter T. Naqvi, Z. A. and Khurshid, (2011). M. Molecular Chavacterization of Glucose -6- phosphate dehydrogenase deficiency in Pakistani Popalation . *International Journal of Laboratory Hematology* .

5. AL-Jaouni, S. K. Jarullah, J. Azhar, E. Moradkhani, K. (2011) Molecular characterization of G6PD deficiency in Jeddah . *Kingdom of Saudia Arabia* . BMC Research notes. 4 (436).

6. Hirono, K. and Bentler, E., (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human G6PD variant A(-). proc. *Natl. Acad. Sci. USA*. 3951 – 3954.

7. Luzzatto, L. and Metha, A., (1995). G6PD deficiency In : The metabolic and molecular bases of inherited diseases, 7th ed. Vol III. scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S. and Valle, D. (Editors) Mc Graw – Hill, Inc. *New York* . chap III. P. 3367 – 3397.

8. Xu, W. W., B. Bartsocas, C.S. Malcorra – Azpiazu, J.J. Indark ,K. and Beutler, (1995) E., G6PD Mutations and haplotypes in various ethnic groups . *Blood 85 (1)*: 257 – 263.\

9. Hirono, A., F., H., and Miwa, S.(1993). Molecular abnormality of G6PD konan and G6PD ube, the most common G6PD variants in Japan. Hum. Genet., 91 507–508.

10. Minucci, A. Morad K., K. Hwang MJ, Zuppic, Clardina B, Capoluongo E. (2012) The Old and update of the new mutations Blood Cells Mol Dis.; 48 : 54-65.

11. Calabro, V., Mason, P.J., Filosa, S.D., Civitelli, R., Cittadella, R., Tagarelli (1993) A., Martini, G. ,Am. J. Hum. Genet. 52, 527 536.

12. Nuray, N . Ulusu , (2012) Kintetic mechanism and some properties of glucose – 6 – phosphate dehydrogenase from sheep brain cortex Turk J Biochem . :37 (4) :340-347 .

13. Tandogan B, Ulusu NN. (2005) Characterization of glucose – 6 – phosphate dehydrogenase Purified From lamp Kidney Cortex. Turk J. Bio Chem; 30 (2) 178 – 182 .

14. Lai SW, Chen JH, Kao WY. (2013) Acnte hemolytic anemia in glucose – 6 – phosphate dehydrogenase deficiency Complicated by Ginkgo biloba . *Acte Haematol*; 130: 288 – 90.

15. Pardhe, B .D; Joshi M; Pandoy R; Sharma P. D; Singh J and Paudyal P. (2015). Glucose – 6 – phosphate Dehydrogenase Deficiency and Its co Relation Pharmaceutical sciences , (6) 937-945 .

16. Roulston, J. E. Bartlett, J.M. (2004). Molecular Diagnosis of Cancer, *Method and Protocols Human Press Inc* .

17. Al- azawy , F.N. (2012) A Rapid and non-enzymatic method for gentic DNA Extraction from whole Blood and some other Mammalian Tissues. *J. Tikrit Univ. For Agri .Sci*: 12 No. (4) : 165 – 169.

18. www. (2012). Biolabo. fr Lyophilised G6-PDH U. V. Kinetic Method.

19. (2006) Clinical Guide to Laboratory Test, 4th Ed., N.W. TIETZ p. 458-457.

20. Arnaout, Hanaa, (2011) (Incidence and Association of 563 C/T Mediterranean and the Silent

1311C/T G6PD Mutations in G6PD deficient Egyptian Children). *Cairo. Egypt* .
21. Snustad1 D.; and Simmons1 M. J. (2012). Genetics. 6th ed. *John Wiley & Sons1 Inc.*
22. AL-Janabi Mustafa S. I., Studying the Level of Oxidation Stress and Some Hematological Parameters in Male Children Suffering from Enzyme G6PD Deficiency at Ramady City, M.A Thesis in Biochemistry (M.Sc). *Faculty of Science. Al-Anbar University*. Arese, P., Gallo V., Pantaleo A., Turrini F . Life and death of G6PD deficient Erythrocytes – role of redox stress and band 3 modification . Transfus med hemother . 12 (39) : 38 – 334 .\
23. EZZEI – Deen Z.M; Hussin N. F; Abdel Hamid Y.A and Abedel Migeed O.R. G6PD (Mediterranean and Silent) Polymorphisms in Eggtian Infants with Neonatal Hyper bilirubinemia. Lab Medicine. (2013). 44 (3).
24. Al-Allawi, N. Essa, A.A, Jubrael JM, *etal*. (2010) Prevalence and Molecular Characterization of Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficient variants among the Kurdish Population of Northern Iraq. *BMC Blood Disord*.;10:6.
25. الاحمر، اسامة احمد الاحمر. الكشف عن طفرة البحر المتوسط في المرضى الليبيين بمركز طرابلس الطبي ومستشفى الجلاء بمدينة طرابلس. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة طرابلس. (2015).
26. درويش . شهد محمود فيصل. دراسة انتشار نقص انزيم G6PD في عينة من النساء في مدينة بغداد في العراق. رسالة ماجستير. (2016).
27. Duangao, N. Rick, P. Attakorn, P. Nicholas, P. Nicholas, J.W. and Mallika, I . (2013) Evaluation of the phenotypic test and genetic analysis in the delection of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency . *Malaria Journal* 289. 12 .
28. Yanola, J. Kongpan, C. Pornpra sert S. (2014) Prevalence of anemia, Iron deficiency. Thalassemia and Glucose –6–phosphate dehydrogenase deficiency among hill – tribe school children in omkol District, chiang Mai Provinee, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public health* . 45 : 920 – 5 .
29. Mahdavi M. R; Kosaryan M; Roshan P; Karami H. (2013) Prevalence of three common Glucose – 6 – phosphate dehydrogenase Gene Mutation in Neonates in province of Mazandaran, *North of Iran . Int. J. Hum. Genet*,. 13 (3) – 128 .

Determination of the efficacy of glucose-6-phosphatase dehydrogenase G6PD and its relationship to 563 C/T in the G6PD gene In the blood of children infected with Hemolysis Anemia

Ahmed Sh. A. Al-Doori[1] , Wasan N. H. Al-Assie[1] , Adnan F. AL-Azaawie[2]
[1] *Department of Chemistry, College of Education for pure Science, University of Tikrit , Tikrit, Iraq*
[2] *Biology Department, College of Science, Tikrit University , Tikrit , Iraq*

Abstract
The aim of the study was to determine the activity level of G6PD enzyme and detection of the 563 C/T replacement mutation in the G6PD gene in children with hemolysis anemia of Kirkuk governorate.
The study included 60 children with Favism, aged between 3 and 10 years, with 39 male and 21 females, in addition to 30 healthy children of the same age group as control group with 21 males and 9 females.
The results showed a significant decrease in the activity of G6PD in children with hemolysis anemia for both men and women compared with healthy. Where the activity was 2.75 ± 5.04 IU /g at the probability level ($P \leq 0.01$), while the healthy reached (1.5 ± 12.49) IU /g
The results showed that the normal genotype NN was 19.05%, the heterozygote genotype NM was 66.66%, and the mutant genotype MM was 14.29% in the female patients group (21 patients). In the male sample, the rate of mutant genotype was 58.97% and the normal genotype was 41.03%.This explains why there is no heterozygote genotype in the male sample because the male has one X chromosome, either mutant or no mutant.
We can conclude that there is a relationship between mutation 563 C/T of G6PD gene and hemolysis anemia, the percentage of male infection is higher than that of females. On the other hand, the concentration of G6PD was higher for the mutant genotype group than for the normal group, while the concentration of G6PD was not significantly different in the female children.