

## 2. القسم العملى

## القسم العملى

يشمل القسم العملى:

- هدف الدراسة العملية ومنهجها
- مواصفات عينة البحث
- طريقة العمل
- ملاحظات العمل
- النتائج
- مناقشة النتائج
- التوصيات

## أولاً. هدف الدراسة العملية

يرتبط تواتر متلازمة الصبغي X الش مع حالات زواج الأقارب، وهو ما يرجح وجود نسبة مرتفعة من الإصابة هذه المتلازمة سورية، ولكن هذا الفرض يتم التأكد منه ث عملي، لذا كان هدف الأول ذا البحث هو الاختبار العملي هذه الفرضية. يتناول هذا البحث عينة من العوف عقلياً عمت من المعاهد والمؤسسات المختصة، وهو يعد خطوة أو باه أاث أوسع تشمل أعداداً أكبر وطيفاً أوسع من المجتمع يتس ذا البحث الوصول إليها.

كما هدف هذه الدراسة من ناحية أخرى تأسيس بروتوكولات العمل الوراثي لزيئي لعمليات التحري عن هذه المتلازمة البحث العلمي كلية الصيدلة امعة دمشق. وقد أمكن الوصول إلى مستوى جيد من روة العمل، وت أرشفته وسرد قسم كبير من تفاصيله القسم العملي هذه الرسالة، عسى أن يكون فيه فائدة لكل من أول العمل لاحقاً الخ أاث مشاة.

إن ديد نسبة الإصابة هذه المتلازمة يعطي فكرة عن مدى انتشار أحد أهم الأمراض الوراثية العا ، وهذا دد أيضاً مدى تأثر زواج الأقارب على تعداد الإصابة بالأمراض الوراثية، وبالتا مدى انتشار هذه الأمراض الموعات السكانية المغلقة. لذا كان من اتوقع الحصول على نسبة كبيرة سورية من العوف عقلياً بسبب الإصابة بمتلازمة الصبغي X الش، كما كان من اتوقع أن يتم إداد أخطاء تشخيص سبب الإصابة مراكز العوف بسبب عدم الاعتماد على طرق موثوقة وعلمية لإصدار الحكم النهائي.

لقد أجري هذا البحث الفترة الزمنية شهر نيسان 2006 وآذار 2007 افطات التالية: دمشق وريفها، حلب، ص، اه، اللاذقية.

## ثانىاً س خطة العمل

كانت خطة العمل اقترحة عند البدء با شروع هى سحب عىنات من عىات اعوف التابعة لوزارة الشؤون الاجتماعية والعمل، وهى عىات حكومية بعالبيتها، ووى أعداداً كبرة من اعوف . سعىنا إ هذه المعىات لأننا أردنا استخدام خا وأرشفىها بغرض اقارنة بالأعراض ودراسة انتشارها عند اعوف .

تألقت عملية البحث من ثلاث خطوات عملية:

1. ع الدم واستخلاص الـ DNA
2. تفاعل البولىمرز التسلسلى وتلطىخ سوترن (عند اللزوم)
3. لىل النتائج

كان من الخطط أن تستخدم ابر كلية الصيدلة جامعة دمشق لعملية استخلاص الـ DNA وتطلىق تقنية الـ PCR، والاستعانة خا الن والوراثة كلية الطب امعة دمشق لإجراء تلطىخ سوترن على بعض العىنات ال تتأكد نىجتها باستخدام الـ PCR.

## صعوبات خطة البحث

واجهت خطة العمل صعوبات عديدة منذ بداية تطلىقها. فاستغرقت اوافقات الصادرة من وزارة الشؤون الاجتماعية والعمل وقتاً طويلاً بسبب بعض ااذىر ال أثارها اسؤولون حول بعض النواحي الصحية والأخلاقية (سلامة عملية بزل الدم وموافقة الأهل)، لكن تعاوم الكبر ذلل هذه الصعوبات اية اطاق.

كما واجهت الدراسة العديد من اعوفات أثناء عملية بزل الدم وأرشفة اعوف كىن تلخىصها اىلى:

1. **معوفات أكادية:** عدم تصنىف أغلب الأطفال اعوف عقلىاً وفق طط أكادى واضح وموحد ومناسب، وعدم توفر اختبار كفاءة عقلية (مثلاً: اختبار مستوى الذكاء IQ) (الملحق "أ"). كما أن أغلب مرضى اراكز من اصاب تلازمة Down. والذى لا ىنتمون إ صفات عىنة البحث.

2. **نقص كمية الدم امكن بزا:** عا كثر من الأطفال اعوف ضعف البنية الذى قد ىكون بسبب سوء التغذية ا جعل عملية بزل الدم منتهى الصعوبة. كما أثر عنف بعض الأطفال اعوف وحركتهم الدائمة على عملية بزل الدم وكمية الدم، و إحدى ارات وصل عدد الذىن ساوا عملية البزل إ انية أشخاص.

3. عدم موافقة بعض الأهل على بزل الدم من أطفال م وخاصة بعد معرفة سبب التحلىل.

كما واجهتنا صعوبات تأم مستلزمات البحث ابتداءً من عدم توفر الأدوات البلاستيكية المناسبة انتهاءً بالكلفة المرتفعة للعتائد kits استوردة للقيام بالتحاليل. ا دفعنا إ تركيب ا اليل اللازمة للعمل بالطرق اتوفرة ا خ لتخفيض الكلفة. ولكن هذه الطريقة كانت صعبة التطبيق بوجود العديد من الصعوبات التقنية ونقص الصيانة للأجهزة. > أن مركز البحوث ا ينية روما عرض إجراء التحاليل التالية لعملية الاستخلاص. كما درس احتمال إجراء التحاليل كلى الطب ا امعة اليسوعية والأمريكية لبنان.

ضبطت طريقة الاستخلاص ونقاوة الناتج بإرسال جزء من كمية أربع عينات إ روما، حيث تطبيق ال-PCR عليها واعتمدت كشاهد داخلي التجارب الكلية (الشكل 13). أجري تفاعل ال-PCR على عينات البحث كلية الصيدلة باستخدام مواد من هيئة الطاقة الذرية، وأرسلت العينات ا شكوك بأ ا صاب تلازمة الصبغى X ا ش إ روما لإجراء تفاعل PCR تلف تليخ سوثرن إن استلزم الأمر.

## ثالثاً مواصفات عينة البحث

### 1-3- نفع عينة البحث:

ع العينات من كافة ا مراكز ا كومية السورية ا ختصة بالإعاقات العقلية (عدا مركزين)، ومن بعض ا مراكز الأهلّة ا ختصة و ع ها. حيث ضم البحث 63 عينة، لت ثلاثاً من الإناث (4.8%)، و60 معوقاً مـن الـذكور. أبدت العينات اسحوبة تشبهاً للتوزع السكا سورية (ا دول4)، حيث وى دمشق وريفها حوا نـصف سكان سورية. > أن افضة حلب وريفها تأ ا رتبة الثانية.

ا دول 4: مصدر وعدد العينات الداخلة الدراسة

| اسم ا معية                                 | عدد ا رضى |
|--------------------------------------------|-----------|
| مركز التأهيل ا ه للمعاق (دمشق)             | 6         |
| معية قدسيا لرعاية ا عاق (دمشق)             | 8         |
| معية ا زة لرعاية ا عاق (دمشق)              | 8         |
| معية نقطة حلب (دمشق)                       | 7         |
| ا معية السورية للتوحد (اللاذقية)           | 4         |
| مركز التنمية الفكرية ( ص)                  | 7         |
| مدرسة الأمل للتأهيل والتنمية الفكرية (حلب) | 16        |
| مركز الرجاء للمعاق عقلياً (دمشق-فنوات)     | 2         |
| متفرقون                                    | 5         |
| ا موع                                      | 63        |

### 2-3- شروط العينة:

بزل عينة دم من كل معوق لا يقل حجمها عن 5مل، عدا اسة مرضى كان من الصعوبة كان ا صول على وريد كا التروية عندهم، ا جعل حجم عينة الدم لديهم أقل من 5مل. استخدمت أنابيب حاوية على EDTA كمانع شر.

إجراء التحليل للذكور عموماً يكن بـ هؤلاء ا رضى صلة قرابة، كما يكن بينهم مرضى متلازمة Down. و يتم دراسة عدد أك من الإناث بسبب ضعف قدرة ليل الـPCR على كشف وجود الطفرة عند الإناث ا امل للمرض (راجع القسم النظري).

حرصنا على التعامل مع ا عوق بأك قدر من ا ذر. حيث استبعاد الأفراد الذين سببوا مشكلة أثناء عملية البزل، سواء بسبب فرط ا ركة أو الضعف ا سما الشديد أو كون الأوردة صعبة ا نال.

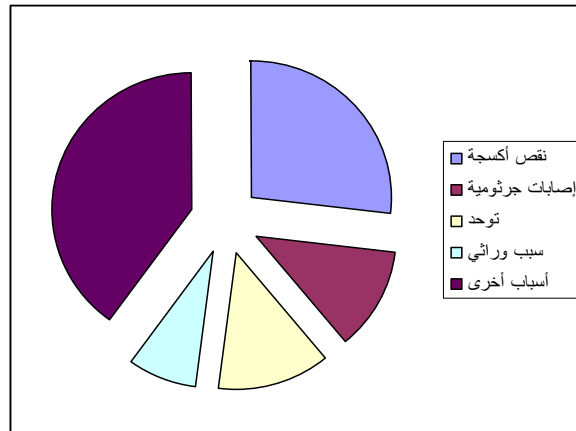
### 3-3- مواصفات عىنة البحت:

كان نظام الأرشفة اعتمد أغلب مراكز الإعاقة فاصراً عن تلبية كثر من احتياجات هذه الدراسة. كان من الضروري ا وصول على اعلومات من تقارير مستمرة عن االة الصحية والعقلية للمعوق، لكن ملف االة الصحية للمعوق افترض عادة على تقرير واحد من طبيب أطفال. و يتوفر أيضاً تقييم ذكاء ااعوف بإجراء اختبار IQ (أو اختبار مشابه) بسبب الشك تصنيف شدة حالة الإعاقة.

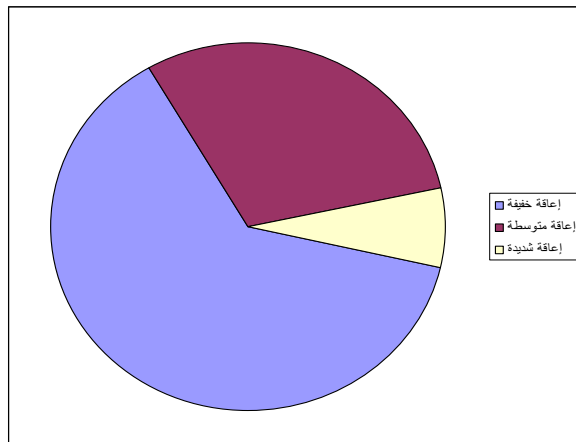
ترد أي معلومات عن سبب الإصابة أرشيف أكثر من نصف ااعوف (53%). كما ترد أي معلومات عن شدة حالة الإصابة لدى 73% من اارضى.

كان عدد ااصاب ذوي صلة القرابة عند أبويهم 24% (من كل اارضى). أن نسبة الأشخاص ذوي القصة العائلية كانت 17% (من اارضى ذوي معلومات الأرشيف). كانت ااصة الأك من الأسباب المسجلة للإعاقة هي ااشاكل ااصاحبة للولادة 27% (نقص أكسجة)، بينما كانت نسبة الإصابات اارثومية والفسية سن مبكرة 12%. وسجل حوا 8% فقط كسبب وراثى. وكانت نسبة ااصاب بالتوحد 13% من االات اادروسة.

لقد صنفنا إصابة حوا 63% من اارضى كحالة خفيفة، و30% كحالة متوسطة الشدة، وحوا 7% كحالة شديدة.



الشكل 9: توزع العىنة حسب سبب الإعاقة المسجل التقرير الرى



الشكل 10: توزع العىنة حسب شدة الإعاقة المسجل التقرير

اسنمارة البحت

رغم ا رىض:

الاسم:

العمر:

اسم الأب:

ا ركز:

العنوان:

اسم الأم:

شدة الإعاقة:

سبب الإعاقة ا سجل:

التارىخ ا رضى ا سجل:

الصفات البدنية:

السلوك النفسى:

كمية الدم ا بزول:

تارىخ الاستخلاص:

تارىخ البزل:

ملاحظات:

تارىخ لىل PCR:

النتىجة:

ملاحظات:

ا شرع ا سخدم:

تارىخ التنتىجة:

## رابعاً . طريقة العمل

بعد ع العينات أنابب الـ EDTA حفظت درجة حرارة  $+4^{\circ}\text{C}$  . إجراء عملية استخلاص للـ DNA ا وجود الكريات البىض خلال فترة لا تتجاوز 4 أيام من تاريخ بزل عينة الدم ، حفظ الـ DNA درجة حرارة  $-20^{\circ}\text{C}$  . قسمت كل عينة إ أنبوبة مرفمة . إجراء تفاعل البوليمر از التسلسلى PCR لكل عينة و ديد العينات ال فشلت إظهار نتيجة.

### 1-4 - استخلاص الـ DNA:

اعتمد استخلاص الـ DNA من العينات طريقة *Miller et al. 1988* للاستخلاص بترسيب ال و تينات ، و اعدلة من قبل *Chiurazzi* لتتناسب وظروف العمل كلية الصيدلة . طبق الاستخلاص بعد بزل العينات ا لا يتجاوز الأربعة أيام خوفاً من أن يؤدى التأخ الزائد إ نقص كب مردود الاستخلاص.

#### 1-1-4 - ض ا اليل

##### • دائرة حلّ الكريات الحمر RBC lysis buffer:

|                          |        |         |
|--------------------------|--------|---------|
| $\text{NH}_4\text{Cl}$   | 155 mM | 8.29 g  |
| $\text{KHCO}_3$          | 20 mM  | 1.00 g  |
| $\text{Na}_2\text{EDTA}$ | 0.1 mM | 0.034 g |

pH 7.4 (HCl/NaOH) up to 1 l

##### • دائرة SE (according to Maniatis, autoclaved) SE:

|                          |       |        |
|--------------------------|-------|--------|
| NaCl                     | 75 mM | 4.39 g |
| $\text{Na}_2\text{EDTA}$ | 25 mM | 8.41 g |

pH 8.0 (NaOH) up to 1 l

##### • دائرة TE (according to Maniatis, autoclaved) TE:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Tris/HCl (pH 8.0) | 10 mM |
| EDTA              | 1 mM  |

##### • دائرة SDS (sodium dedocyl sulfate) (%20):

يعقم 200مل من الماء المقطر (في الموصدة autoclave) وبيرد لدرجة حرارة الغرفة . يضاف 40غ من الـ SDS إلى 100مل ماء مقطر معقم مع التحريك حتى الذوبان التام . يكمل الحجم حتى 200مل بالماء المقطر المعقم . لا يستخدم هذا المحلول إذا وجد عكر في الأنبوب حتى يتم تنويبه بتسخينه في حمام مائي بدرجة حرارة  $25^{\circ}\text{C}$  .

##### • البروتيناز K (%10):

يحضر محلول بتركيز 10مغ/مل في الماء ثنائى التقطير والمعقم في الموصدة ، يحفظ المحلول بدرجة حرارة  $-20^{\circ}\text{C}$  من شركة Eurobio® Lot:660737/42 «Ref: GEXPRK00-6P

#### 2-1-4 - خطوات العمل:

A. تفج الكريات ا مر باستخدام لول حل الكريات ا مر (RBC lysis):

- 1- يوضع 10مل دم أنبوب 50مل، ويضاف 40مل من لول حل الكريات ا مر ا د > درجة التجمد، الانتظار من 15 إلى 30 دقيقة. يقلب الأنبوب ب فترة وأخرى أكثر من أربع مرات أثناء هذا الانتظار.
- 2- التنبيد دة 15 دقيقة بسرعة 1500rpm.
- 3- فصل الرسابة بإزالة الطاء دوء، وقلب الأنبوب على ورق ترشيع كى ف.
- 4- إضافة 20مل من لول حل الكريات ا مر، خض الأنبوب جيداً والانتظار دة 5-15 دقيقة.
- 5- التنبيد دة 15 دقيقة بسرعة 1500rpm.
- 6- فبف الرسابة بإزالة الطاء دوء، وقلب الأنبوب على ورق ترشيع.

B. تفج الكريات الببض باستخدام دائرة حل الكريات الببض (SE lysis):

- 1- حل الرسابة 5مل من دائرة SE بدرجة حرارة الغرفة.
- 2- إضافة 40 ميكرو لتر من ال و تيناز K (10%).
- 3- إضافة 250 ميكرو لتر من دائرة SDS (20%) و زج جيداً.
- 4- حضن طوال الليل ام مائي (37°C).

C. ترسيب ال و تينات

- 1- إضافة 5مل من دائرة SE و ا زج، يضاف 3مل NaCl (5M، معقم) و زج من جديد.
- 2- إضافة 5مل كلوروفورم و ا زج 10-20 دقيقة على رجاجة plate shaker. (تزيد هذه ا طوة من إزالة ال و تينات من ا لول).
- 3- تنبيذ دة 30 دقيقة بسرعة 2500rpm.
- 4- إزالة الطبقة الطافية ذر ونقلها إلى أنبوب جديد، مع الانتباه لعدم نقل أي من طبقة ال و تينات أو الكلوروفورم إلى الأنبوب. توي الطبقة الطافية على لول DNA.

D. ترسيب ال-DNA واستخلاصه

- 1- يرسب ال-DNA باستخدام حجم جم من الإيزوبروبانول (أو حجم من الإيثانول)، صل على خيوط من ال-DNA تتجمع مع الوقت لتشكل شدة بيضاء صفة. كن تسريع التجمع بقلب الأنبوب برفق.
- 2- يتم التقاط fishing الشدة البيضاء باستخدام ص باستور أو باستخدام قن ط بلاستيكي أو ص بلاستيكي يستخدم مرة واحدة. حيث تضغط على جدار الأنبوب قبل إفراغ الكحول منه.
- 3- تغسل الشدة باستخدام 5مل إيثانول 75%.
- 4- يتم التقاط الشدة مرة أخرى ووضعها أنبوب Ependroff والانتظار > ف.
- 5- يحل ال-DNA استخلص 100-200 ميكرو لتر من دائرة TE، ويترك طوال الليل بدرجة حرارة الغرفة ليذوب (كن استخدام ماء ثنائي التقط و معقم).
- 6- فط العينة درجة حرارة 20°C-.

E. قياس نقاوة ال-DNA

- تقاس نقاوة ال-DNA على مقياس UV، وذلك بأخذ نسبة الامتصاصية لأطوال اوجة ب OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> وال ب أن تقع ب 1.7-1.9. ب أن يكون التركيز على الأقل 1 µg/µl.
- جرى ترحيل 20µl على أغاروز ص ي من شركة Promega® بتركيز 1% بغرض كشف نقاوة عملية الاستخلاص.

## 2-4 - طريقة PCR (Polymerase Chain Reaction)

يعتمد هذا التفاعل على استخدام إنزيم البوليميراز لنسخ جزء من الـ DNA الموجود في العينة وتكثيفه بتطبيق دورات حرارية متتالية. يتمديد طرفي الحمض النووي باستخدام زوج من قليل نوكلوتيد oligonucleotide يتراوح طول كل منهما بين 16-30 نوكلوتيد (كل منهما يدعى بالـ primer). يكون تركيب متواليته الخاصة بالـ تسلسل ديداً يراً للمنطقة المدروسة.<sup>[62]</sup>

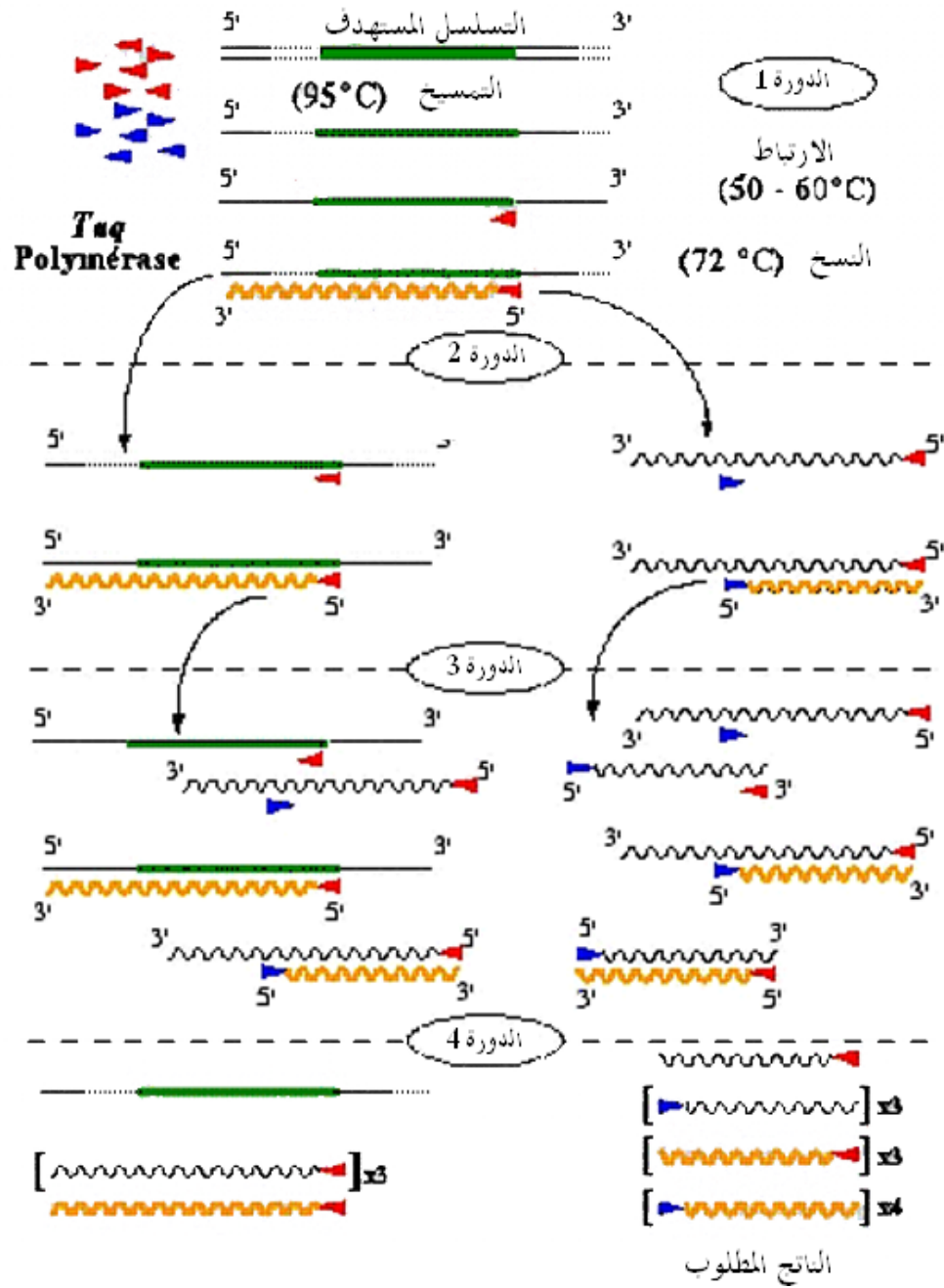
يستخدم جهاز thermal cycler لتغيير درجات الحرارة لمول التفاعل. فعند درجات حرارة مرتفعة (92°C) تفصل سلاسل الـ DNA المضاعفة الطاق double stranded DNA إلى سلاسل مفردة الطاق single stranded DNA. تدعى درجة الحرارة بهذه الحرارة التسخين denaturation temperature. قص درجة الحرارة إلى درجة يرتبط فيها كل من التسلسل الـ DNA المفرد، وتدعى بدرجة الحرارة الارتباط annealing temperature (درجة حرارة التطبيع)، وتكون حوا 60°C، حسب متواليته بنية التسلسل. ترفع درجة الحرارة إلى حوا 72°C، وتدعى درجة حرارة الإطالة (النسخ) elongation temperature، وفيها يعمل إنزيم البوليميراز taq polymerase على نسخ سلسلة متممة مبدئياً بالتسلسل كحجر أساس. يعاد بعدها نسخ الـ DNA الناتج إلى سلاسل مفردة وارتباط التسلسل، والنسخ من جديد (الشكل 10).

إن تطبيق 30 دورة من هذا النوع تنتج نظرياً مليار نسخة من كل سلسلة مفردة من الـ DNA، يثبت على كمية كافية من الـ DNA للعمل عليها.

تكون درجة الحرارة اللازمة لارتباط التسلسل مرتفعة عند البحث على موقع متلازمة الصبغي X | ش. يعود ذلك إلى التسلسل بتكرارات CG، حيث تكون درجة حرارة الارتباط تتراوح بين 62°C و 65°C.

إن الماذير الأساسية لهذه التقنية هي إمكانية تلوث العينة بنتائج التحاليل السابقة وأصول على نتائج تكثيف كاذب، لأن قطرات البخار من العينات القديمة كافية لنقل ملايين النسخ من الناتج إلى كامل جو الغرفة، لذا يعتمد على الفصل الفيزيائي مكان العمل والاستخلاص والتكثيف والتحليل اللاحقة.<sup>[63]</sup>

كن الوصول على نتائج متوقعة عند عدم تطبيق هذه الدرجة للحرارة بدقة، فارتفاع درجة الحرارة يمنع من ظهور أي تفاعل (لا يوجد ارتباط)، كما أن إغاضها يؤدي إلى ارتباط نوعي للتسلسل وظهور عصابات غير نوعية بدل ظهور عصابة واحدة واضحة.



**الشكل 11:** مبدأ طريقة ال-PCR: توالي دورات متعددة من ثلاث درجات حرارة مختلفة، الأولى هي درجة حرارة التسخين والثانية درجة حرارة الارتباط والثالثة درجة حرارة التضاعف. يزداد الناتج أسياً مع تكرار الدورات.

#### 4-2-1 - خطوات العمل:

تقع متواليات CGG ب النوكليوتيدات 13833 و13892 على الصبغي X ا ش. بالنسبة ذا التحليل فمـن ا مكن استخدام أنواع تلفة من ا بشرء حسب طريقة العمل. وأشهر الطرق هي: [62]

| الطريقة    | متوالية ا بشرء                                                              | مكان ارتباطهما             |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Fu et al   | 5'-GCTCAGCTCCGTTTCGTTTCACTTCCGGT-3'<br>5'-AGCCCCGCACTTCCACCACAGCTCCTCCA-3'  | 13712-13723<br>13992-13963 |
| Wang et al | 5'-TGACGGAGGCGCCGCTGCCAGGGGCGTGC-3'<br>5'-GAGAGGTGGGCTGCGGGCGCTCGAGGCCCA-3' | 13796-13825<br>13923-13897 |

CTG CAG AAA TGG GCG TTC TGG CCC TCG CGA GGC AGT GCG ACC TGT CAC CGC CCT TCA GCC

61 TTC CCG CCC TCC ACC AAG CCC GCG CAC GCC CGG CCC GCG CGT CTG TCT TTC GAC CCG GCA

121 CCC CGG CCG GTT CCC AGC AGC GCG CAT GCG CGC GCT CCC AGG CCA CTT GAA GAG AGA GGG

181 CGG GGC CGA GGG GCT GAG CCC GCG GGG GGA GGG AAC AGC GTT GAT CAC GTG ACG TGG TTT

241 CAG TGT TTA CAC CCG CAG CGG GCC GGG GGT TCG GCC TCA GTC AGG CGC TCA GCT CCG TTT  
primer c

301 CGG TTT CAC TTC CGG TGG AGG GCC GCC TCT GAG CGG GCG GGC CGA CGG CGA GCG CGG  
↓ 5' end of the FMR-1

361 GCG GCG GCG GTG ACG GAG GCG CCG CTG CCA GGG GGC GTG CGG CAG CGC GGC GGC GGC GGC

421 GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC TGG GCC TCG AGC GCC CGC AGC CCA

481 CCT CTC GGG GGC GGG CTC CCG GCG CTA GCA GGG CTG AAG AGA AGA TGG AGG AGC TGG TGG  
↓ exon boundary primer f

541 TGG AAG TGC GGG GCT CCA ATG GCG CTT TCT ACA AGG TAC TTG GCT CTA GGG CAG GCC CCA

601 TCT TCG CCC TTC CTT CCC TCC CTT TTC TTG GTG TCG GCG GGA GGC AGG CCC GGG GCC

661 CTC TTC CCG AGC ACC GCG CCT GGG TGC CAG GGC ACG CTC GGC GGG ATG TTG TTG GGA GGG

721 AAG GAC TGG ACT TGG GGC CTG TTG GAA GCC CCT CTC CGA CTC CGA GAG GCC CTA GCG CCT

781 ATC GAA ATG AGA GAC CAG CGA GGA GAG GGT TCT CTT TCG GCG CCG AGC CCC GCC GGG GTG

841 AGC TGG GGA TGG GCG AGG GCC GGC GGC AGG TAC TAG AGC CGG GCG GGA AGG GCC GAA ATC

901 GGC GCT AAG TGA CGG CGA TGG CTT ATT CCC CCT TTC CTA AAC ATC ATC TCC CAG CGG GAT

961 CCG GGC CTG TCG TGT GGG TAG TTG TGG AGG AGC GGG GGC CGC TTC AGC CGG GCC GCC TCC

1021 TGC AG

Adapted from Fu et al. 1991(Cell 67:1047-1058)

**الشكل 12: ا نطقة ا ستهدة بالـ PCR :** يظهر هذا الشكل جزءاً من التسلسل النوكليوتيدي للمنطقة الـ يرتبط ـا ا بشرعان ا استخدام ثنا. صر ب ا بشرء متوالية طوا 209bp عندما يكون عدد تكرارات الـ CGG هـ و 16 كما الشكل. تزداد طول القطعة ا صورة مع زيادة عدد التكرارات. [4]

#### 4-2-2- لول التفاعل

اعتمدت طريقة *Fu et al* (1991) لكو ا الأكثر شىوعاً الدراسات ا شاة لدراستنا<sup>[3,5,23]</sup>. ضر لول التفاعل بإضافة 2 µl من عىنة الـ DNA و 3µM من كل من ا شرء . يضاف 8 µl من الدارئة (1x) ا كونة من 10% مـن ثنائى مىنل سولفوكسىد DMSO (di-methyl sulfoxide)، و 200µM من كل نوع من الـ (deoxy Nucleotide Tri Phosphate) dNTP، و 75% من 7-deaza-dGTP (deoxy Guanine Tri Phosphate)، و 0.5 وحدة مـن Taq polymerase، جم 10µl. يضاف للأنبوب 15µl من الزيت ا عد نع تبخر لول التفاعل.<sup>[4]</sup>

#### 4-2-3- بر ة ا هاز

ت بر ة ا هاز كالتا :

- 1- temperature 95
- 2- time 5 min
- 3- temperature 95
- 4- time 1 min
- 5- temperature 65
- 6- time 45 sec
- 7- temperature 75
- 8- time 3 min
- 9- cycle to step 3 for 35 rounds
- 10- temperature 75
- 11- time 7 min

#### 4-3- اليل إضاىة

إجراء بعض التحاليل إىطاليا على العىنات الـ تبد أى عصابة عند تطلىق الـ PCR ـ ابر كلىـة الصيدلة. حىث درست نقاوة العىنات أجرى تفاعل PCR إضا للتأكد من أطوال التكرارات. استخدام مشرء تلف ا:

5'>ccg ttt cgg ttt cac ttc cg :3F

5'>ctt gta gaa agc gcc att gg :4R

كما استخدم مزىج خاص بالتفاعل ذو التركىب: بإضافة 2 µl من عىنة الـ DNA و 0.8µl من كل من ا شرء ذوى التركىز 10mM. مع تغى نوع الإنز إ *Pfu polymerase* مزىج أساسى عىتدة kit صصة ذا التفاعل. كان برنامج التفاعل يتضمن 30 دورة حرارىة من ثلاث مراحل (95°C دة دقىة، 57°C دة دقىة، 72°C دة دقىة).

ىتم إجراء تلطىخ سوثرن بسبب انتفاء ا اجة له، بعد التأكد من أن كل العىنات سلمىة من الإصـابة تلازمـة الصبغى X | ش.

## خامساً تفاصيل العمل : ا خ :

### 5-1 - اختيار هلامات الرحلان وتصويرها:

ربة العديد من ا واد والتراكيز اختلفة مراحل العمل بغرض ا ا ا أفضل طريقة كن تطبيقها ابر كلية الصيدلة للحصول على نتيجة PCR واضحة. استخدمت عدة أنواع من هلامة الأغاروز بوجود الإيتيديوم بروميد. و تصوير النتائج الظاهرة عند تألق العصابات ت الأشعة فوق البنفسجية باستخدام كام ا Panasonic من نوع Lumix DMC LZ-2 عالية الدقة. كما نسخ كل طط للعصابات على ورقة منفصلة احتياطاً. يتم استخدام مرشح أشعة فوق بنفـسجية (UV filter) مـع الكام ا ا المستخدمة بسبب عدم توفر مرشح كهذا سورية. لكن لا ننصح باستخدام أي كام ا بدون مرشح لأن أشعة UV تتسبب بتخرب لشرة فيلم التصوير أو الشرة ا ساسة للضوء CCD. استخدام ثلاثة أنواع من هلامة الأغاروز من ثلاث شـركات هـي Promega و BioRad و EuroBio. كـان الأغاروز من شركة Promega صصاً لشدة الـ DNA قصدة الطول بنقاوة ليلية. وقد أعطى عكـراً turbidity خفيفاً جداً. وكان البحث البصري عن العصابات سهلاً نسبياً، و يكن امكن صنع أي هلامة يقل تركيزها عن 2%، حيث كانت الامة ضعيفة القوام، كما أا كانت شفافة جداً لدرجة أن تقنية التركيزـ الز الـ Auto-focus كانت ترگز على مصباح UV ا وجود أسفل الامة متجاهلاً وجود الامة الشفافة. عند استخدام أغاروز من شركـة BioRad و EuroBio، حيث كان الأول كثيف البنية سهل التصلب على عكس أغاروز Promega. كما أمكن صـ هلامة بتركيز أقل من 1%، وكان أغاروز شركة BioRad أشد عكراً، لكن هذا نع مشاهدة عصابات DNA بوضوح. وكانت زيادة العكـر مفضلة عند التصوير بالكام ا حيث أمكن تركيز الصورة على العصابات وعكـر الامة، كانت هلامة EuroBio حلاً وسطاً بـ الامة السابقة لكنـها أؤـرب الامة BioRad.

### 5-2 - استخلاص الـ DNA:

تتمكن من قياس تركيز كل عينات الـ DNA بواسطة جهاز DNA/RNA calculator لعدم إمكانية تشغيل اهاز الكلية. لكن ضبط نقاوة الاستخلاص عدد من العينات بالاستعانة اهاز قياس UV ثنائي الشعاع (Jasco). اعتمد تفاعل PCR على إضافة 2µl من لول الـ DNA بغض النظر عن تركيزه. تتوافر السوق السورية أنابيب 50مل ملائمة لاحتواء الكلوروفورم دون أن تنفجر عند التنبيد بسرعة مرتفعة (2500rpm). لذا أنا ا استخدام أنابيب زجاجية للتنبيد، وهي تستطع أن تتحمل أكثر من 6مل من السوائل دون الانفجار نتيجة لوزن السائل الكبـر عند سرعة التنبيد العالية. لذا قُسمت كل عينة ا أنبوب وغطيت بالبارافيلم.

تقيم الأنابيب الزجاجية بالغسيل جيداً باء الإيتانول (70%)، وكخطوة أخـة قلب الأنابيب رأساً على عقب ووضعتها ببشركـة، تقيمها فرن بدرجة حرارة 220°C مدة 12 سـاعة. حيث أن الـ DNA يتخرب بدرجة حرارة 120°C. اضمن لنا التخلص من كل ا واد العضوية الـ قد تؤثر على نظافة الأنابيب والـ نتخلص منها بالغسل والـ قد تؤثر حسن سـ العمل.

### 5-3- تطبيق تفاعل البوليم از التسلسلى:

تطبيق التفاعل باسخدام جهازين موجودين الكلىة اأءا من شركة *Pharmacia*®، والآخر من *BOECO*®. كان ا هاز الأء أسرع وأءق ا فاط على ءرءة ا رارة، كما اءوى على عطاء يؤمن تسخىناً للعبناء مـن الأعلى. لكنء كان عا من مشكلاء عءزه تطبيق ءقنىة HotStart ا انءراء جهاز *Pharmacia*® بتطبلقها. كلا ا هازين ا ا العمل بصورة مرضىة.

إءراء ما ىزىء عن 150 ربة ءلفء لضبط تفاعل البوليم از التسلسلى، واسءءءمء العءىء من اقارباء ءـ. أمكن الوصول لطرىقة مناسبة للعمل اءـ. بءاءة اءءارب اسءءءام مزىء أساسى master mix مـن إءاء هبئة الطاءة ءءرىة وآءر مشابه اءركىب من شركة BioRad لكنهما فشلا إعطاء أى ءءبءة، وكان كل ما ءصلنا علبه هو عصاباء عءىءة ءـ نوعىة، ءـ مع اسءءءام مءروء من قىم الـ DNA واـ شرء وءـى لءرءاء ا رارة. ععود السبب ءلك إ ءون اءر الأساسى صص لءفاعلاء PCR العاءىة، ومع أـمـا ءوى هامش ءب لءفاعلاء اءءلفءة إلا أن ءـ القءعة بءكرراءاء CGG منع إام اءفاعل بءءاء، لـ ءا ءوـبـ اسءءءام مزىء صص ءا اءفاعل. ىسءءم عاءة إءر *Pfu polymerase* ءو ءءقة اءءفءة نسخ الـ DNA، لكن بسبب صعبوة ا صول علبه سورىة اسءءءام *Taq polymerase* وءراكىزـ ءـ DSMO مءءفءة ءـ ءـا (10) أضعاف القىم العاءىة) وءغى ءراكىز ا واء الأءرى، وءلك طبقاً لطرىقة اعءمءا ءرأسة أسـ ءرالىةـ أءءونىةـ سبىة مشاة [4].

عءء اسءءءام اءىء الأء طُبء مءروء لءراكىز اشرء وءراكىز الـ DNA وءغى ءرءاء ا رارة وزمن ءباـا ءـ ءصلنا على قىمة واءءة ءكن العمل معها. كان عءء ءوراء اءفاعل ءءة (35 ءورة) لءرءة أن ءغى زمن البقاء ءرءاء ا رارة يؤءر ءءياً على اءاءء.

اسءءءمنا نوء ءلف من اشرء، و نءء ءضءم اءءها وهو اءوء مـن ءرأسة Wang et al 1996، وءلك بسبب أن تطبلق اءفاعل ءاء إ ءقنىة Hotstart اء ءعءمء بءء اءفاعل عءء ءرءة 95°C، [44] ءا ءولة تطبلق هءه الطرىقة الكلىة باءءافة البوليم اء بعء وصول ءرءة ا رارة إ 95°C وبقاءها ءءة 5 ءائق لـ ضمان سىء كامل DNA. [64] فشلا اءءارب بسبب اءلوء وسوء اـ واء اءـ واءرة، ءىءا أن رؤوس اـمـ صاء البلاسىءىءىة كانت ءءوب عءء هءه ا رارة. لءا كان الاضطرار إ اسءءءام اشرء من ءرأسة fu et al. 1991 فقط.

ءءول5: مقارئة بىن نوعى المشرعىن المسءءءمىن

| Wang et al.      | Fu et al.            |                                         |
|------------------|----------------------|-----------------------------------------|
| 30+30            | 30+30                | طول اشرء                                |
| BioMol           | هبئة الطاءة + BioMol | مصدر الشراء                             |
| 1                | 160                  | طول القءعة ا صورة (بءون اءكرراءاء) bp   |
| 200              | 120                  | أقصى عءء اءكرراءاء ءكن ءشفء هءه الطرىقة |
| ءراكىز ءرءة      | ءراكىز ءرءة          | شروط اءفاعل ا صة                        |
| ءرءاء ءرارة ءرءة | ءرءاء ءرارة ءرءة     |                                         |
| لا ىوءء          | ءبءة                 | اىءاء                                   |

## سادساً. النتائج اآية

تطبيق تفاعل البوليم از التسلسلي على عينة من 63 معوقاً (60 من الذكور وثلاث من الإناث). عند العمل كلية الصيدلة - جامعة دمشق، ج منها على 55 عينة مأخوذة من الذكور فأعطى عصابة واحدة واضحة ال الطبيعي عند مقارنتها مع الشاهد ومع مقياس أطوال ال-DNA (marker). > تظهر أي نتيجة م-س عينات من الذكور. كما ج تطبيق ال-PCR ديد أطوال التكرارات عند عينات الإناث يعاً، حيث كن متغيرات الزوت بالنسبة للقطعة FRAXA.

إن أطوال التكرارات عند الإناث المذكورة ا دول8، حيث تشاهد عند كل معوقة عصبان للقطعة FRAXA ا يدل على انتفاء الإصابة بمتلازمة ا دروسة. كان توزع أطوال التكرارات عند الذكور يل إ التوزع -و-والطول 30 تكراراً. (جدول 7 والشكل 14)

أرسلت عينات الذكور امسة إ مركز البحوث ا ينية بروما، حيث استخدام فحص نق-اوة ال-DNA، أجري تفاعل PCR خاص خابر مركز البحوث ا ينية بروما (prof. Chiurazzi) حيث أعطى تقريراً ب-سلبية الإصابة العينات امس ا دروسة. (الشكلان 21و22)

جدول 7: عدد التكرارات وطولها للمرضى غير الحاملين لطفرة متلازمة الصبغي X الهش

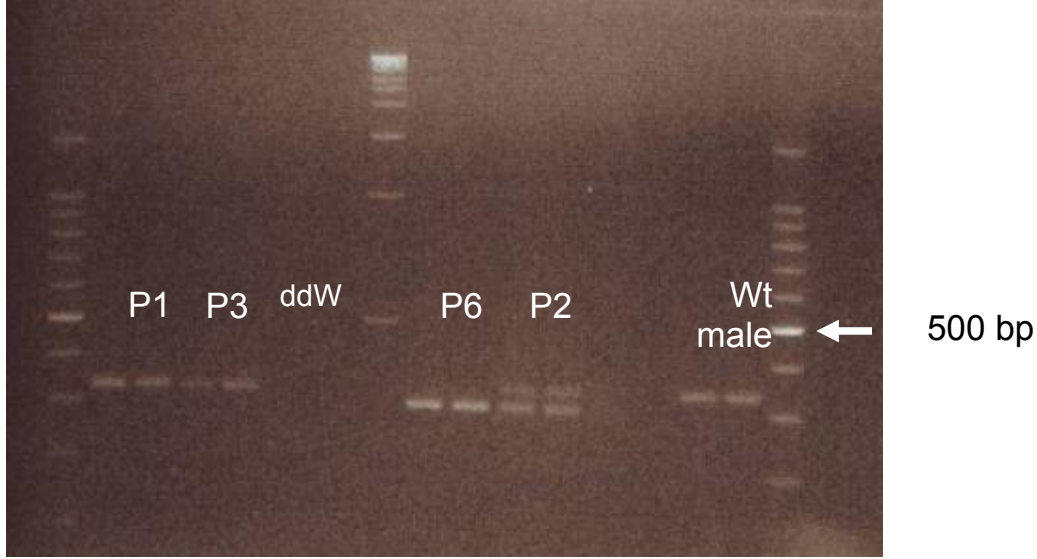
| عدد التكرارات repeats | عدد المرضى Frequency |
|-----------------------|----------------------|
| 10                    | 1                    |
| 20                    | 3                    |
| 21                    | 1                    |
| 23                    | 2                    |
| 24                    | 1                    |
| 25                    | 5                    |
| 26                    | 4                    |
| 27                    | 8                    |
| 28                    | 2                    |
| 29                    | 7                    |
| 30                    | 12                   |
| 31                    | 5                    |
| 32                    | 2                    |
| 33                    | 4                    |
| 34                    | 1                    |
| 35                    | 1                    |
| 36                    | 1                    |

جدول 8: طول التكرارات عند المعوقات (غير حاملات لطفرة متلازمة الصبغي X الهش)

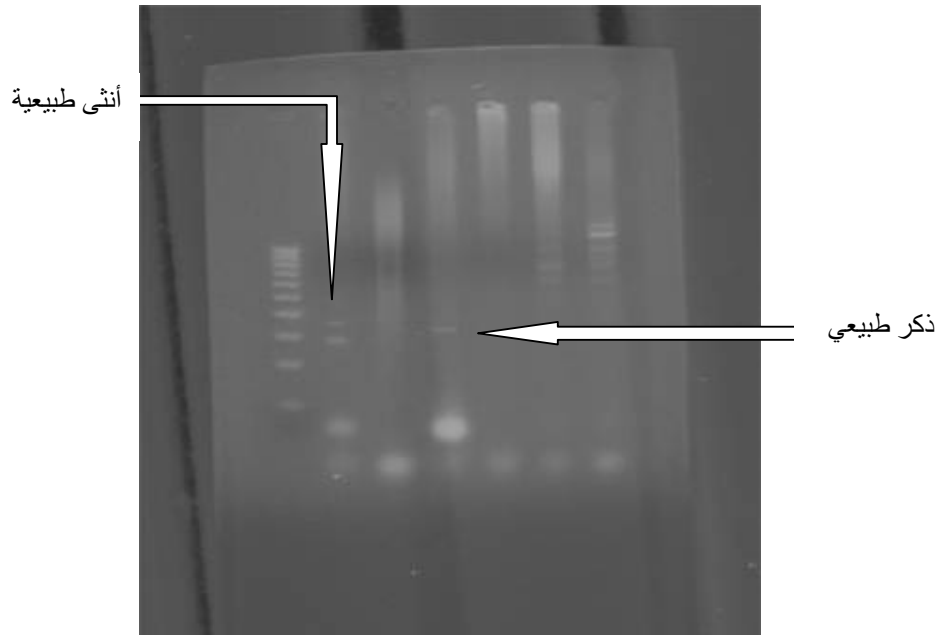
| رقم المعوقة (No.) | أطوال التكرارات (عصابة) fragment length |
|-------------------|-----------------------------------------|
| 24                | 38-28                                   |
| 29                | 32-26                                   |
| 30                | 34-29                                   |

### صور النتائج:

أو النتائج كانت تلك الـ بعثها مركز الدراسات الوراثية بروما وا عرضة الشكل 13، و هذه الصورة تظهر نتائج ثلاث عينات سليمة وماء مقطر كشاهد، بالإضافة لعينة من أنثى معوقة، مع ذكر شاهد من إيطاليا. 31 تكراراً. تكرار كل عينة مرة لزيادة موثوقية التفاعل.

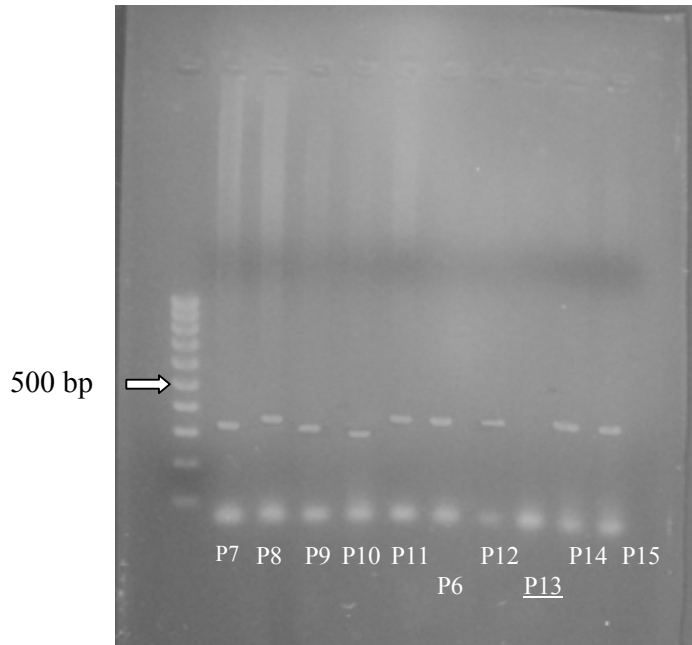


**الشكل 13:** أول نتائج PCR (ضبط الجودة) من مركز الدراسات الجينية بروما. تظهر الصورة نتائج ثلاثة ذكور سليمين (P1, P3, P6) ونتائج أنثى متغايرة الزيجوت (P2)، وماء مقطر كشاهد (ddW)، و نتائج ذكر شاهد ذو 31 تكراراً (Wt male)، بالإضافة إلى ثلاث مدروجات بأطوال قطع الـ DNA.



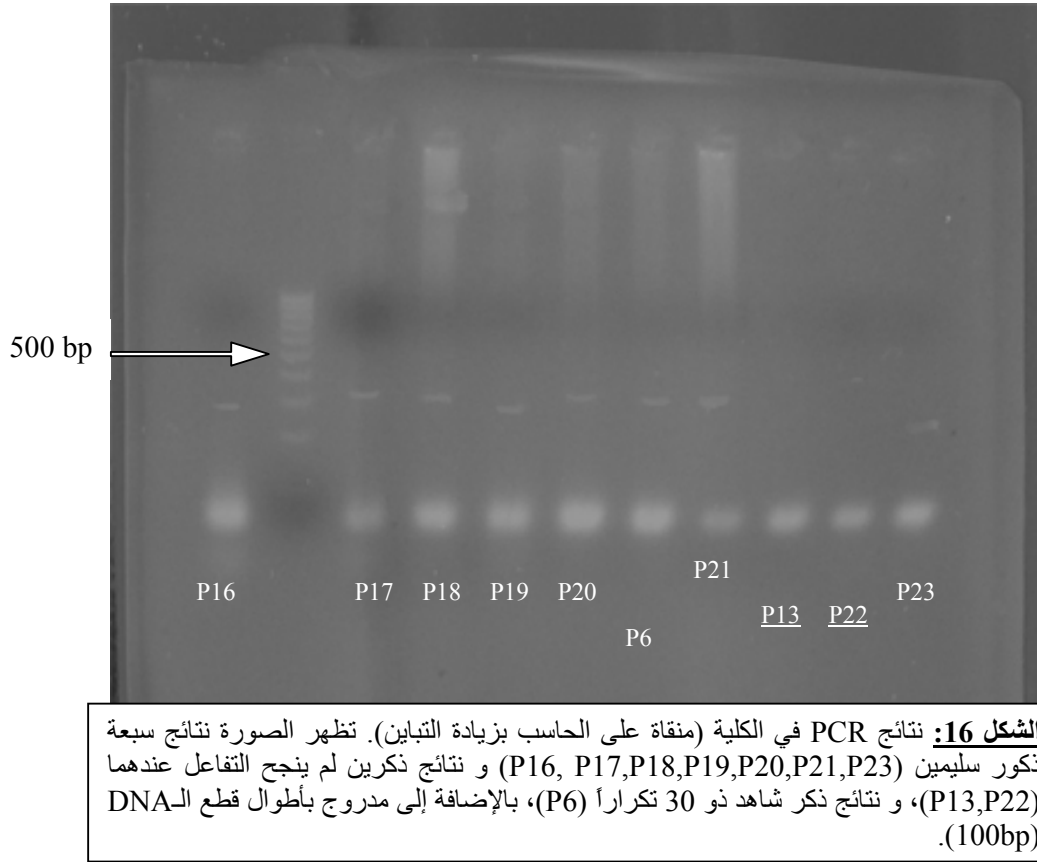
**الشكل 14:** أول نتائج PCR (منقاة على الحاسب بزيادة التباين)، تظهر في هذه الصورة أول نتيجتين لتفاعل PCR ناجح بعد استخدام مدروج من التراكيز المختلفة للمشرعين وبطرق مختلفة. العصابة الواحدة ناتجة من تفاعل عادي لذكر معوق عقلياً على جهاز BOECO، والعصابتان من أنثى طبيعية باستخدام تقنية HotStart (جهاز Pharmacia).

نشاهد الشكل 14 أول نئىجة ناجحة لضبط تراكىز التفاعل المناسبة، استخدام مدرج من تركىز متزائد للمشرء تتراوح من 0.5µl و 5µl لكل أنبوب. كما استخدمت طريقة HotStart للمقارنة مع الطريقة الاعتيادية وظهر ناتج متشابه اماً الطريقة اأدى إ عدم استخدام طريقة HotStart بسبب تعقيدا. نلاحظ وجود لطاخة smears أسفل الصورة اال ذى الطول الأقل من 100bp، و ا تعودان إ نواتج التفاعل ا اكتمل (اللطة الأعلى) والبقايا ا تفاعلة للمشرء (اللطة الأدنى): بطول حوا 30bp، للتخلص من بقايا اشرء أنا إ زيادة عدد دورات التفاعل من 27 دورة إ 35 دورة، اأدى لاختفاء العصابة السفلى التفاعلات اللاحقة. استخدم مدرج بأطوال قطع الـDNA من عشر عصابات تتراوح أطوالا من 100bp إ 1000bp بفارق 100bp، كل منها يدعى 100bp marker أو مدرج 100bp.



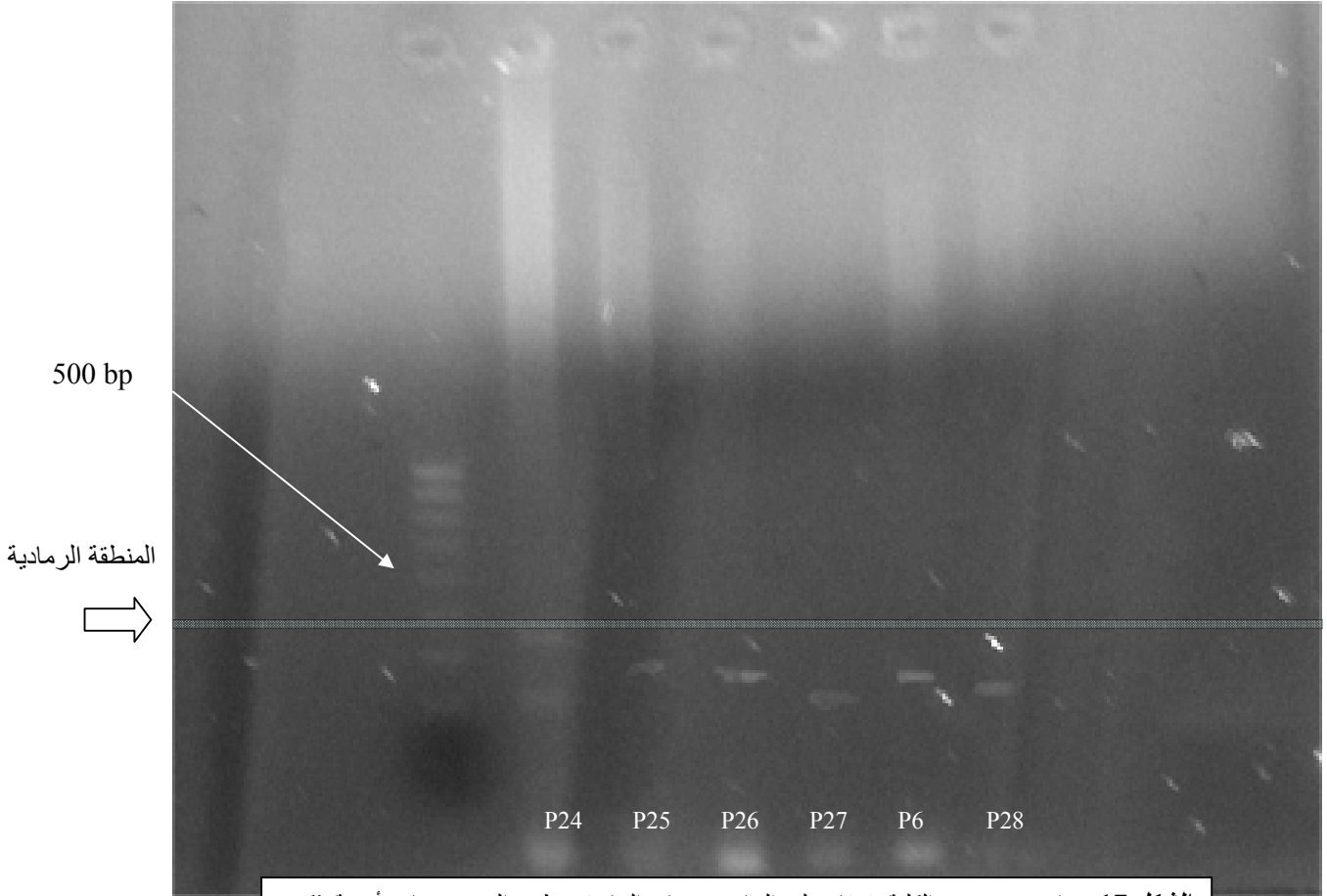
**الشكل 15:** أول صور نتائج PCR فى الكلية (منقاة على الحاسب بزيادة التباىن). تظهر الصورة نتائج ثمانية ذكور سلوىمىن (P7, P8, P9, P10, P11, P12, P14, P15) و نتائج ذكر فشل التفاعل عنده (P13)، ونتائج ذكر شاهد ذو 30 تكراراً (P6)، بالإضافة إ مدرج بأطوال قطع الـDNA (100bp).

نشاهد الشكل 15 تسع عىنات جدىة أحدها فشل التضخم (P13)، كما نشاهد منتصف الرحلان عىنة شاهد (P6) وهى أحد العىنات اللى لها إىطاليا (الشكل 14) وأثبتت أا سلمىة وهى بطول 30 تكراراً. هذه الصورة ا أيضاً لطة وذجىة لكل لىل من التحالىل ا راة البحت العلمى لاأىة تشصىة. تقع هذه اللطة انطقة ذات الطول أقل من 100bp ا ىرجع كوا نواتج تفاعل ا مكتمل، قد تكون نئىجة عدم استخدام الإنز Pfu polymerase بل استخدام الإنز العادى standard Taq polymerase.

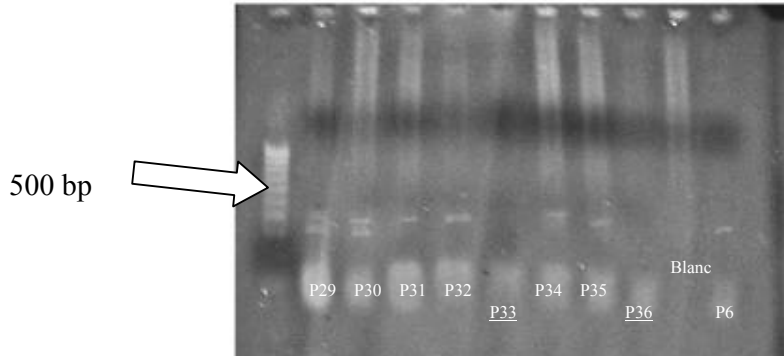


الشكل 16 نشاهد تفاعلاً مكرراً إجراؤه كلية الصيدلة للعينه P13 بغرض التأكد من عدم وجود خطأ شروط التفاعل. وقد افترض حينها أن صاحب العينه مصاب بمتلازمة الصبغي X | ش. الشكل 17 تظهر حدود المنطقة الرمادية بمتلازمة الصبغي X | ش (45-50 تكراراً)، وهذه المنطقة تقع تقريباً | ال (360-375bp). كما كن أن نلاحظ فشلاً إظهار صورة واضحة للعصابات العينه P25 > مع استخدام تقنيات التنقية على | اسب (استخدام فلتر Sharpen و contrast على برنامج PhotoShop). لذا كان من الضروري وضع نسخة ورقية من النتائج كلية الصيدلة، و ذلك بنسخ العصابات | رئية | الامة على ورقة (باستخدام مسطرة) يث أمكن | صول على مستند داعم لنتائج التنقية.

استخدام معادلة لوغاريتمية بسيطة على برنامج MS Excel سبب عدد التكرارات اعتماداً على | سافة النسبية | قطعها العصابة، حيث يتناسب طول شدة الـDNA عكساً مع لوغاريتم | سافة | مقطوعة. يطرح طول الـDNA خارج التكرارات من طول القطعة الكلي (الطول | أطروح هو 221bp: 60bp طول | بشرء 161bp طول قطعة الـDNA | لا | وي تكرارات). وبعد حساب طول قطعة التكرارات، تقسم النتيجة على 3 للحصول على عدد التكرارات. | ثال على ذلك هو عينه الذكر P20 الشكل 16 الذي يقابل الطول 314bp والتكرار 31. ويقاس التكرار مرة ، | الأو من الورق والثانية من الصورة الرقمية.

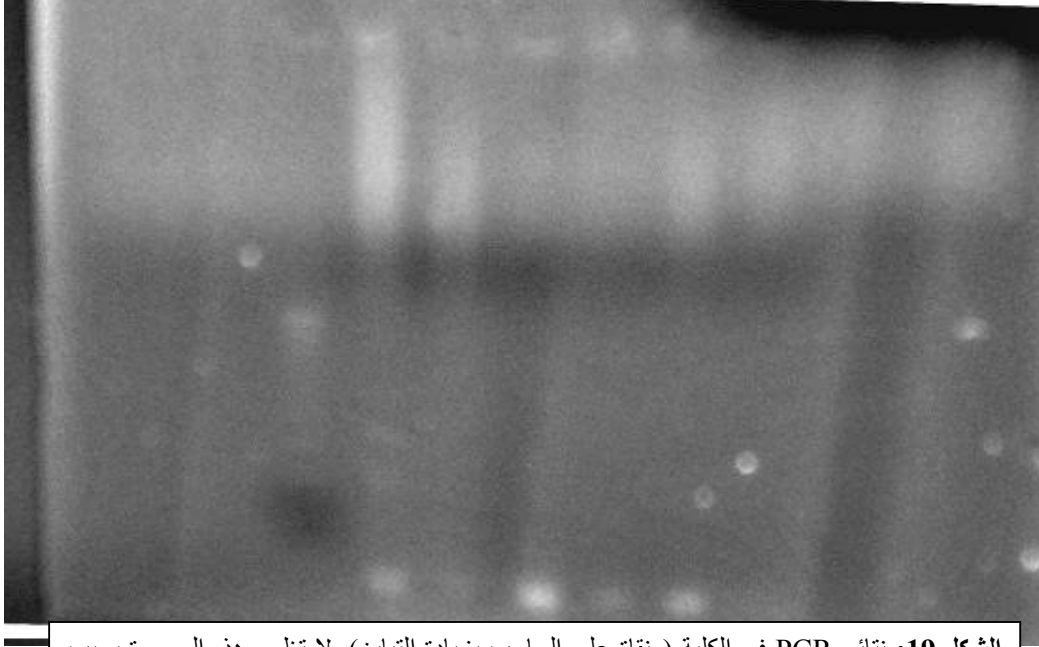


**الشكل 17:** نتائج PCR فى الكلية (منقاة على الحاسب بزيادة التباين). تظهر الصورة نتائج أربعة ذكور سليمين (P25, P26, P27, P28) و نتائج أنثى سليمة (P24)، و نتائج ذكر شاهد ذو 30 تكراراً (P6)، بالإضافة إلى مدرّج بأطوال قطع الـDNA (100bp). تظهر على الشكل المنطقة الرمادية حيث تعد العصابات التي توجد أسفلها طبيعية، في حين أن العصابات التي تعلوها هي حالات ما قبل طفرة (لا توجد في هذا الشكل)، لا تعطي حالات الطفرة الكاملة أي عصابات عند استخدام هذه الطريقة.



**الشكل 18:** نتائج PCR فى الكلية (منقاة على الحاسب بزيادة التباين). تظهر الصورة نتائج أربعة ذكور سليمين (P31, P32, P34, P35) و نتائج اثنتان من الإناث (P29, P30)، و نتائج ذكر شاهد ذو 30 تكراراً (P6)، وحقل فارغ النتيجة (Blank) (ماء مقطر للضبط الدوري للجودة والتعقيم). بالإضافة إلى مدرّج بأطوال قطع الـDNA (100bp).

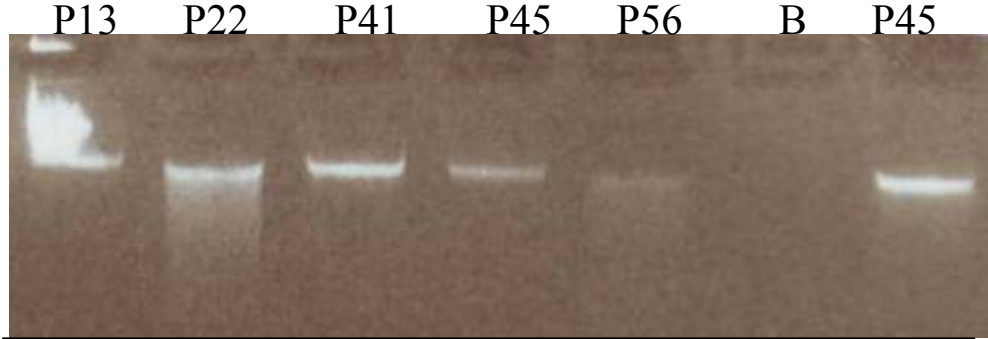
الشكل 18 نشاهد بدء احتراق صفيحة التحسس CCD الكام | | استخدمت للتصوير بسبب تعرضها الطويل لأشعة UV. وتزداد سوء نقاوة الصورة الاختبارات التالية | جعلنا نعتمد بشكل أساسي على نسخ العصابات | ورقة بشكل يدوي والقيام با سابات | مطلوبة.



**الشكل 19:** نتائج PCR في الكلية (منقاة على الحاسب بزيادة التباين). لا تظهر هذه الصورة بسبب عطب الكاميرا. في الصورة نتائج أربعة ذكور سليمين (P37, P38, P39, P40) ونتيجة لعينة ذكر لم يتم التفاعل عنده (P41) ونتائج ذكر شاهد ذو 30 تكراراً (P6). بالإضافة إلى مدروج بأطوال قطع الـ DNA (100bp). وتم تسجيل النتائج على الورق فقط.

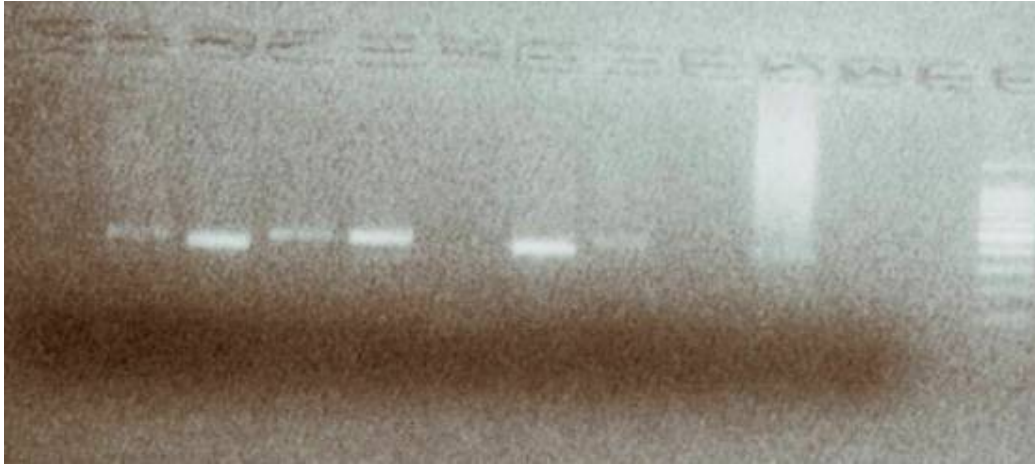
الشكل 19 تتمكن من توضيح الصورة لإظهار أي عصابة، وكان النتائج مسجلة على الورق فقط. وتعذر تصوير العينات (من 40 | 65) بسبب التلف الشديد الذي أصاب كام | التصوير، وكان الاعتماد الوحيد على الأرشفة اليدوية.

الشكل 20 نشاهد فحص نقاوة العينات الـ بعثت إـ إيطاليا. وهذه العينات كـن تضخيمها كلية الصيدلة، وهي ذات نوعية متوسطة وكمية قليلة نسبياً من الـ DNA. و الشكل 21 نشاهد نتائج PCR هذه العينات، الـ على عدد النتائج الإيجابية الـه متلازمة الصبغي X | ش | ثنا هو صفر. د عينة واحدة لا توي أي DNA وذلك بسبب النقص حجم عينة الدم المسحوبة (أقل من 1 مل)، الـ جعل طريقة الاستخلاص المستخدمة غـ مناسبة. و تدخل هذه العينة الأخـة الدراسة.



**الشكل 20:** نتائج نقاوة العينات من المخبر في روما. تظهر الصورة DNA خمس عينات ذكور وعينة مكررة، بالإضافة إلى عينة سابعة لا تحوي DNA.

H<sub>2</sub>O P13 P22 P41 P45 B P56 P45 B wt full H<sub>2</sub>O



**الشكل 21:** نتائج PCR في المخبر في روما. تظهر الصورة DNA ست عينات ذكور (P13, P22, P41, P45, P56) وعينة مكررة (P45)، بالإضافة إلى عينة سابعة لا تحوي DNA (B). بالإضافة إلى DNA شاهد (wt). وعينتان من الماء المقطر وعينة من محلول التضخيم فقط، ومدرج بأطوال قطع الـ DNA.

## سادساً. مناقشة النتائج:

### 1-6 - انتشار متلازمة الصبغي X الش

ب ملاحظة الفرق ب انتشار prevalence والوقوع incidence. فالانتشار يع فياس تواجد صفة مـا أي وقت. بينما يدل مصطلح الوقوع على الات يتم تشخيصها سنوياً أو عدد الإصابات ا ديدة. لذا فإننا نقول أن مرضاً قص الأمد مثل الأنفلونزا لديه معدل وقوع مرتفع > أن معدل انتشاره منخفض، وعلى العكس مرض مثل الداء السكري ذو الانتشار العا والوقوع السنوي ا انخفاض. كانت توقعاتنا لنسبة انتشار ا عوف ا صاب متلازمة الصبغي X الش هي حوا 8% من الذكور، وهي تأ من الدراسات ا شاة منطقة ا توسط. كن مشاهدة مقارنة مع العديد من الدراسات العاية مناطق تلفة من العا ا دول التا :

جدول 9: مقارنة بين نسب انتشار متلازمة الصبغي X الش بين المعوقين عقلياً في الدراسات العالمية

| الدولة                     | الدراسة                                    | عدد الذكور | عدد الإناث | العدد الكلي | نسبة الإصابة | ملاحظات                  |
|----------------------------|--------------------------------------------|------------|------------|-------------|--------------|--------------------------|
| أندونيسيا                  | Hussein et al 1998 <sup>[4]</sup>          | -          | -          | 331         | 8.46%        |                          |
| أسيانيا (الأندلس)          | Diego et al 2002 <sup>[3]</sup>            | 280        | 42         | 322         | 6.5%         |                          |
| فرنسا                      | Elbaz et al 1998 <sup>[65]</sup>           | 163        | 85         | 248         | 6.7%         | النسبة للذكور، الإناث 0% |
| أانيا                      | Froster-Iskenius et al 1983 <sup>[1]</sup> | -          | -          | 242         | 6%           |                          |
| فنلندا                     | Kahonen et al 1987 <sup>[66]</sup>         | -          | -          | 111         | 5.4%         |                          |
| صقلية                      | Neri et al 1988 <sup>[1]</sup>             | -          | -          | 155         | 8%           |                          |
| بلجيكا                     | Fryns et al 1984 <sup>[1]</sup>            | -          | -          | 354         | 16%          |                          |
| املكة ا تحدة               | Primrose et al 1986                        | -          | -          | 100         | 7%           |                          |
| الولايات ا تحدة (كولورادو) | Hagerman et al 1988 <sup>[1]</sup>         | -          | -          | 267         | 3%           |                          |
| الولايات ا تحدة (بوسطن)    | Paika et al 1984                           | -          | -          | 44          | 14%          |                          |
| الولايات ا تحدة (نيينسي)   | Butler&Singh 1993 <sup>[1]</sup>           | -          | -          | 201         | 2%           |                          |
| اليابان                    | Arinami et al 1994 <sup>[67]</sup>         | 152        | 91         | 243         | 8.6%         | النسبة للذكور، الإناث 0% |
| بولندا                     | Mazurczak et al 1996 <sup>[1]</sup>        | -          | -          | 201         | 3%           |                          |
| الازيل                     | Christofolini et al 2006 <sup>[64]</sup>   | 51         | -          | 51          | 13.7%        | ذكور فقط                 |

كان نسبة ا صاب متلازمة الصبغي X الش هذه الدراسة هي 0%، حيث أمكن الكـ شف ٤ـ٦ـ٩2% مـنـا الات الطبيعية عينة البحث باستخدام الطرق ا توافرة كلية الصيدلة. إجراء PCR أكثر كلفة روما بكث على باقي العينات ال فشل تطبيق PCR عليها. قد يعود هذا الفشل إ كميـة الـ DNA القليلة ونوعيتها الأقل جودة، ا تطلب تطبيق تفاعل أكثر نوعية ا توفر لنا البحث العلمي.

## 2-6 - الدراسة الإحصائية

كان مدى توزع العصابات عند اعوف غ ا صا ب تلازمة الصبغي X | ش هو الفرق ب قيمة اك عدد من التكرارات وأقلها

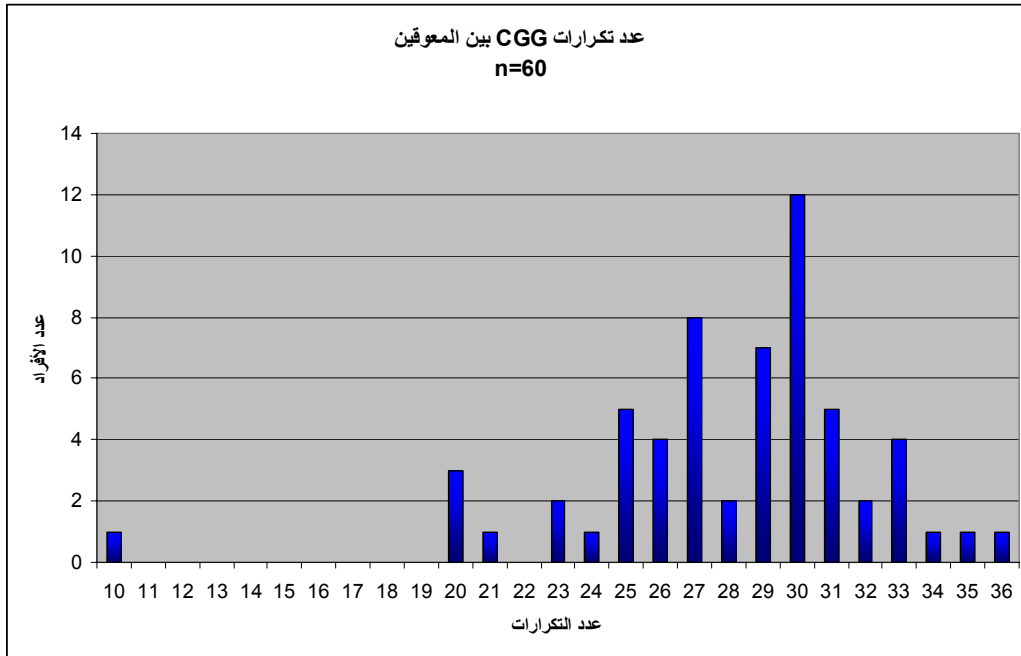
$$R = FL_{\max} - FL_{\min}$$

$$R = 36 - 10 = 26$$

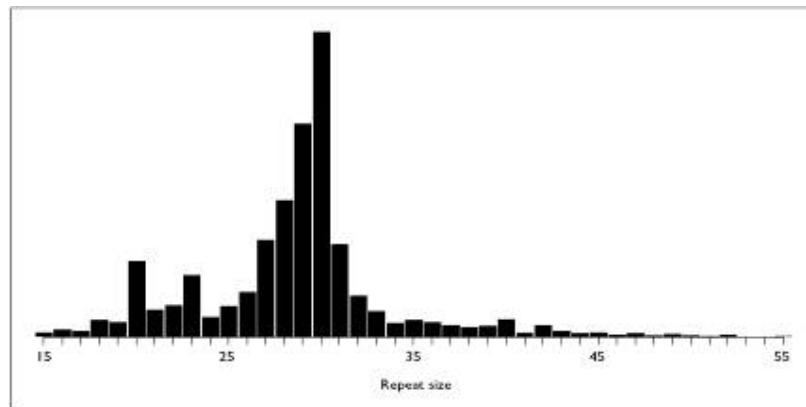
> أن متوسط طول العصابة عند الذكور غ ا صا ب كان  $\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} = 30.56$

كان الا راف ا عياري عند الذكور غ ا صا ب  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} = 7.6$

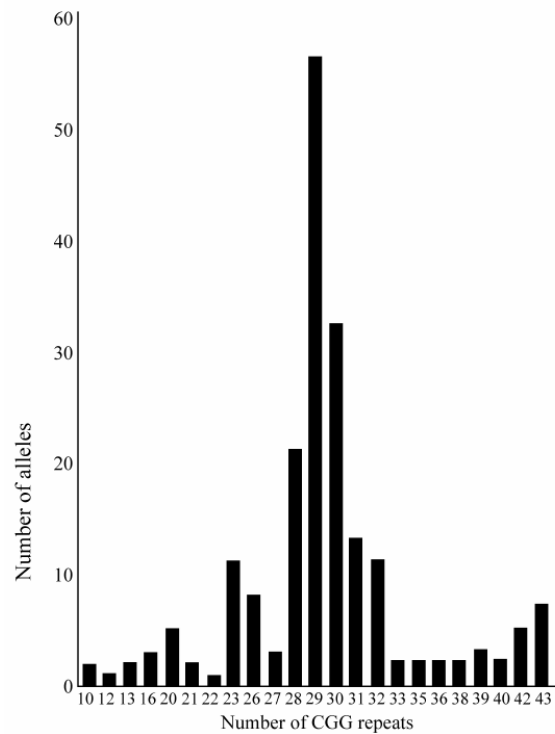
كما وجد فرق ضئيل ب توزع أطوال التكرارات عند السكان الطبيعي با مقارنة مع أفراد العينة (الشكل 14 والشكل 5 مكرر والشكل 15). حيث صل قمة طط التكرارات عند التكرار 30، رغم أن الشكل دراستنا أقل انسجاماً من ا خططات الأخرى، إلا أن هذا الاختلاف يعود إ النمط العرقي بالإضافة إ اختلاف العينة (أفراد سليم با مقارنة مع اعوف عقلياً).



**الشكل 14: توزع أطوال التكرارات عينة البحث.** تتوزع التكرارات بشكل تصاعدي وببطء > تصل لقمة عند التكرار 30. تبدأ ا داراً سريعاً. يشاهد هذا النمط عند الدراسات الأخرى (شكل 5 مكرر وشكل 15).



الشكل 5 (مكرر): نوزع اطوال التكرارات الطبيعية السكان.<sup>[1]</sup>



الشكل 15: نوزع اطوال التكرارات عينة معوزة عقلياً (ع ا ح ا ب ا با تلازمة) - إسبانيا.<sup>[3]</sup>

### 6-3- الانتشار ا ننع:

#### 6-3-1- الإعاقة سورفة:

قامت وزارة الشؤون الاجتماعية والعمل/ا كنب ا ركزى للإحصاء بالتعاون مع UNICEF بدراسة على عينة م-ن ا عوف عام 1998. حث لت 134.740 طفلاً. واستخدمت استبياناً لأهل الأطفال عن الإعاقة بشكل عام. [68] تقدر الدراسة نسبة ا عوف بـ (0.83%) من مل عدد الأطفال، وهى نسبة منخفضة جداً مقارنة بالأرقام العالفة. وبعث أن هذا الرقم أقل من الرقم ا ققى بكث ، حث أن الأهل يلون إ إفاء الإعاقات لأسباب اجتماعفة. وكانت نسبة ا عوف اسجل ا دراس ورفاض الأطفال لا تتجاوز 21%. وفقط 4.3% من ا عوف ترددوا على اراكز ا ختصة بالإعاقات ("استفاد" منهم نسبة 34%). [68]

تشكل موعة "ا عوف عقلياً واثوحن" نسبة 19% من الإعاقات. منهم 31.5% م-صافون تلازمة Down (يشخص اعتماداً على الشكل). بفنا شكل مرضى التوحد نسبة 1.2% من الإعاقات العقلفة. [68] صنف "البلاهة" ت فئة "إعاقات أخرى" وشكلت نسبة 1.2% منها، > تصنيف الصرع فئة منفصلة، و تذكر أى معلومات سوى كون نسبته تشكل 2.5% من الإعاقات. وضعت إعاقات صغرا مجمفة وك ه-ا ت فئة "إعاقات شكلفة". [68]

اهتمت الدراسة بذكر أسباب الإعافة، وكان تناول الأدوية أثناء ا مل ففسر 8% من الإعاقات الإلفة، و 3.2% من إعاقات الصرع، و 13.3% من الإعاقات العقلفة والتوحد. [68]

كان عدد ا عوف اسجل اراكز ا كومية والأهلفة لى وزارة الشؤون الاجتماعية والعمل > و 1000 معوق عقلف فقط. حثنا نج مساعدة شهرفة لكل معوق، ا يشكل دافعاً لأها الأطفال لت-سجلهم وزارة الشؤون الاجتماعية والعمل، وفد فسهل هذا الوضع ا ففد عمل الإحصاءات والدراسات اسقبلفة وتلا العفد من ا مشاكل ال صادفت هذه الدراسة.

#### 6-3-2- الإعاقة عربياً

عند مقارنة أرقام الإصابة بالإعاقة الدول العربفة نذكر بعض الأرقام والاحظااا تقدمها الأمم ا تحدة: [69] "إن عدم توافر مفهوم إحصائى متفق علىه للإعاقة فعبثر من المشكلااا اا تحول دون جمع بفاناا منسقة عن هذه الظاهرة. وبالنالى الأرقام تعتمد على المصادر الوطنفة. وكل دولة قد تكون درجة انسجامها مع المفاهفم الأخرى متبافنة. وعلى أية حال، وباعتماد المفاهفم الوطنفة فإن الأرقام تشير إلى تبافن درجة انتشار الإعاقات فى دول المنطقة. فبفن كل 10000 موافن فوفد حوالى 25 موافن فعانون من نوع من الإعافة فى كل من عُمان ولبنان وفلسطفن. وبُعد هذا المستوى الأعلى فى دول المنطقة. أما فى باقى الدول فإن النسبة تتراوح بفن 10 و 16 لكل 10000 من الرجال باسثناء الفمن حث كانت النسبة أقل من ذلك.

وعلى صعفد النساء جاءت نسبة الإعاقات أقل إجمالاً من الرجال. وكانت الأكثر ارتفاعاً فى عمان والإماراا العربفة والبحرفن وفلسطفن، ففجب أن تؤخذ هذه المعدلااا بنوع من الحذر ننتفة القصور فى الحصر النافج بفوره عن إحصام الموافنفن عن الإبلاغ عن حالات معينة من الإعاقات لأسباب اجتماعفة."

**جدول 10:** مقارنة انتشار الإعاقة بين الرجال والنساء حسب العمر بالسنوات فى بعض البلدان العربىة (فرد بين كل 10000)<sup>[69]</sup>

| البلد    | العمر | 14-0 |      | 59-15 |      | 60+   |      | الكل |      |
|----------|-------|------|------|-------|------|-------|------|------|------|
|          |       | رجال | نساء | رجال  | نساء | رجال  | نساء | رجال | نساء |
| لبنان    |       | 6.3  | 4.6  | 34.2  | 10.9 | 29.0  | 21.3 | 25.3 | 10.2 |
| عمان     |       | 12.2 | 10.7 | 24.1  | 21.3 | 149.7 | 76.7 | 25.4 | 23.0 |
| فلسط     |       | 12.2 | 9.7  | 24.5  | 12.6 | 70.6  | 48.0 | 24.5 | 23.0 |
| قطر      |       | 10.8 | 7.0  | 11.8  | 8.3  | 35.5  | 25.9 | 12.2 | 8.6  |
| السعودىة |       | 12.3 | 10.0 | 13.1  | 8.8  | 36.0  | 23.6 | 14.3 | 9.9  |
| سورىة    |       | 6.8  | 5.3  | 12.2  | 6.7  | 21.9  | 16.9 | 10.3 | 6.4  |
| الإمارات |       | 10.0 | 9.0  | 8.3   | 5.0  | 53.0  | 59.0 | 13.0 | 19.3 |
| الىمن    |       | 1.6  | 1.2  | 7.6   | 5.9  | 25.4  | 35.6 | 5.6  | 5.2  |

ىذكر تقرير الأمم ا المتحدة أن "... التلخف العلقى والشلل ىشكلان ا جزء الأك من الإعاقات غالىبة الدول ولكل من الرجال والنساء....". وهذا مدعاة على الاهتمام ذه الظاهرة وأمر ىث على القىام بدراسات وخطوات عملىة لاحتوائها. خاصة أن الدراسات ا دىدة شبه معدومة هذا ال العا العربىة .

**جدول 11:** مقارنة انتشار الإعاقة العلقىة بين الرجال والنساء فى بعض البلدان العربىة (فرد بين كل 10000)<sup>[69]</sup>

| البلد    | نساء (الإعاقة العلقىة) | رجال (الإعاقة العلقىة) | سنة الدراسة |
|----------|------------------------|------------------------|-------------|
| البحرىن  | 20.8                   | 31.5                   | 1995        |
| مصر      | 15.3                   | 17.5                   | 1996        |
| الأردن   | 12.2                   | 12.0                   | 1994        |
| الكوىت   | 28.3                   | 22.0                   | 1996        |
| لبنان    | 26.0                   | 23.4                   | 1994        |
| عمان     | 15.6                   | 14.8                   | 1993        |
| فلسط     | 14.5                   | 15.0                   | 1997        |
| قطر      | 20.4                   | 30.2                   | 1998        |
| السعودىة | 15.3                   | 25.0                   | 1996        |
| سورىة    | 13.4                   | 17.9                   | 1993        |
| الإمارات | 19.1                   | 22.4                   | 1995        |
| الىمن    | 23.7                   | 13.8                   | 1994        |

#### 6-4 - | الاصبة:

حاولت هذه الدراسة البحث عن مدى انتشار متلازمة الصبغي X | ش لتقد | مساعدة والنصح الط | للمصاب |، وإلقاء الضوء على هكذا إعاقات. | يمكن البحث من تقد | مساعدة النوعية للمرضى، لكن م- | ي- دعونا للتفاؤل | ذر أن نسب الإصابة بمتلازمة الصبغي X | ش تبدو أقل بكثير من النسب | توقعة، دون أن ننسى أن هذا الأمر لا يعفي من | اجة لدراسة الأسباب الأخرى للإعاقات | تمتع.

تدعو النتائج | | توصل إليها البحث للتعلم | مزيد من البحوث | زئية حول الأمراض الوراثية - س- ورية، ودراسة توزع أسباب الإعاقات | | مجموعات السكانية | مختلفة، ومن العمل على | قيق | هدف الأساسي لكل | الدراسات الطبية ألا وهو | س- نوعية | ياة.

قد يل العائلات ذات الإعاقاة الوراثية | | عدم | وافقة على إجراء التحليل، > أن باقي العائلات لا تب- دي | مشكلة نفسها، لذا | يكن مستغرباً | حصول على 0% كنسبة إصابة بمتلازمة الصبغي X | ش | أفراد العينة، خاصة بعد رفض التحليل من العديد من الأهـ | (الأمهات بالتحديد). قد تكون هذه الدراسة ذات خطأ تحي- | زي Bias النتيجة بـ | اه نقص للعدد النهائي للمصاب | بـ متلازمة. كما تواجه هذه الدراسة مشكلة الع- | دد ال- ضئيل نسبياً، لذا قد تكون الدراسات | مستقبلية ذات العينات الأكـ | ذات نتيجة | تلفة.

نرجو أن تساهم هذه الدراسة | | جهود العلمي | استقبلي | كلية الصيدلة | امعة دمشق، وأن ت- | سهم النفاص- | يل | سرودة على تلا | الكـ | من الأخطاء | مستقبلية، وعلى تشجيع دراسات أ | ل وأكثر تفصيلاً.

## سابعا. التوصيات والدراسات اىستقبلية

- القيام بدراسة ذات عدد أك من العينات، بالإضافة لدراسة أسباب أخرى للإعاقة. و اى -ساعدا على إجراء هكذا دراسة هى القوانى اى ديدة اى اعتمدا وزارة الشؤون الاجتماعية والعمل لى لتسجيل اى عوق . ومن اى هم هذه الدراسة العمل مع اى هات الإرشادية الاجتماعية على إنشاء آلىة موحدة لتصنيف اى عوق حسب درجات الإعاقة وحسب الأسباب، اى يسهل من التعامل معهم وتأهيلهم وتقييم تطورهم ورعايتهم الصحية.
- إعادة تأهيل البحث العلمى، وإاد آلىة لتسبى اى خ بأقل قدر من التلوث، و س الصيانة ومراقبة الأجهزة والأدوات، وذلك بغرض العمل على طرح اللىل الكىمىاء اى زىئة - البحث العلمى للعموم، على أن تساعد عائدا اى وىل الدراسات اى مناسبة.
- إطلاق برنامج وط لتحدىد العائلات اى مل هذه اى تلازمة بغرض اى مساعدة على التعامل مع اى عوق بشكل مبكر.
- دراسة تأثر وفوائدا الأدوية اى ديدة اى تقدم لتدبى حالات الإعاقة العقلية وخاصة حالة مِتلازمة الصبغى X | ش.