

بررسی خانواده های مبتلا به هموفیلی نوع A جهت تعیین ناقلین با استفاده از روش پیوستگی ژنی در استان مازندران

محمدباقر هاشمی سوته (PhD)^{۱*}، زهرا حسینی خواه (MSc)^۲، محمدعلی باقریان رستمی (GP)^۳، رحمت اله محسنی (GP)^۴، انسیه سیامی (GP)^۵، فرزانه ولی زاده (GP)^۶، رقیه زکی زاده (BSc)^۷

۱- مراکز تحقیقات تالاسمی و سلولی - مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲- مرکز تحقیقات سلولی - مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۳- دانشگاه علوم پزشکی مازندران

دریافت: ۸۷/۱۱/۲۰، اصلاح: ۸۸/۲/۲۳، پذیرش: ۸۸/۴/۲۴

خلاصه

سابقه و هدف: هموفیلی نوع A یک بیماری ارثی با وراثت وابسته به جنس مغلوب می باشد که فراوانی آن ۱ در ۵ تا ۱۰ هزار مرد گزارش شده است. استفاده از پیوستگی ژنی کاربرد گسترده ای جهت تعیین ناقلین مونث خانواده های واجد هموفیلی در دنیا دارد. سه مارکر پلی مورفیسم درون ژنی شامل پلی مورفیسم G/A در اینترون ۷، پلی مورفیسم T/A در اینترون ۱۸ و پلی مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ به عنوان گویاترین مارکر ها برای مطالعه پیوستگی در ژن فاکتور هشت می باشند، لذا این تحقیق به منظور تعیین افراد ناقل و آگاه سازی خانواده های مذکور از تولد مجدد فرزند بیمار در آن خانواده ها انجام شده است.

مواد و روشها: این مطالعه مقطعی بر روی ۲۰ خانواده واجد هموفیلی A شامل ۳۰ نفر بیمار و ۶۵ نفر از اعضای خانواده (پدر، مادر، خواهران، خاله و دختر خاله ها و فرزندان آنها و بستگان نزدیک دیگر که احتمال ناقل بودن آنها وجود داشته است) از ۵ شهرستان استان مازندران انجام شد. در ابتدا اطلاعات خانوادگی جمع آوری و شجره خانوادگی رسم گردید. از هر فرد مقدار ۵ تا ۱۰ سی سی خون محیطی تهیه و سپس DNA از آن استخراج شد. مطالعه مولکولی به روش ARMS-PCR و با کمک ۳ مارکر ذکر شده صورت پذیرفت. در نهایت با تعیین فاز پیوستگی مارکرها در افراد مبتلا و مقایسه آن با نتایج بدست آمده در افراد مونث خانواده، وضعیت افراد ناقل با توجه به کروموزوم مبتلا به ارث رسیده و یکسان در فرد بیمار و بستگان مونث تعیین گردید.

یافته ها: از ۹۵ فرد بررسی شده از ۲۰ خانواده، ۲۸ نفر از بستگان مونث بیماران هموفیلی به عنوان ناقلین "قطعی" و "احتمالی" مورد شناسایی قرار گرفتند. همچنین میزان مفید بودن و گویائی مارکرهای استفاده شده به صورت ضریب هتروزیگوتی برای هر یک از مارکرهای پلی مورف محاسبه شده و برای G/A در اینترون ۷ (۴۹/۴٪)، T/A در اینترون ۱۸ (۴۱/۱۷٪)، C/T در اینترون ۱۹ (۴۲/۳۵٪) بدست آمد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که مارکرهای پلی مورفیسم به کار گرفته شده از گویائی بالا و خوبی برخوردار بوده و می توانند مارکرهای مناسبی برای تشخیص ناقلین هموفیلی A باشند.

واژه های کلیدی: هموفیلی A، مطالعه پیوستگی، آنالیز مولکولی، شناسایی ناقلین، پلی مورفیسم، مارکرهای ژنی.

مقدمه

فاکتور ۸ انعقادی و یا نقص در تولید یا عملکرد فاکتور ۸ می باشد. ژن پروتئین فاکتور ۸ ژن بزرگی است که در انتهای بازوی بلند کروموزوم X قرار گرفته است (Xq۲۸) و حدود ۱٪ کروموزوم X را تشکیل می دهد، طول این ژن ۱۸۶ کیلو باز

هموفیلی نوع A شایع ترین اختلال خونریزی دهنده مزمن ارثی است که وابسته به کروموزوم جنس مغلوب بوده و میزان شیوع آن حدود ۱ در ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ نوزاد پسر در سراسر جهان می باشد (۱). این بیماری ناشی از کمبود

□ هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۹۸-۸۴ دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد.

* مسئول مقاله: آدرس: ساری، بلوار خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی - بیوفیزیک و ژنتیک، تلفن: ۰۱۵۱-۳۵۴۳۰۸۱-۳

e-mail: hashemisoteh@gmail.com

که احتمال ناقل بودن آنها وجود داشت) در ۵ شهرستان استان مازندران، شامل بهشهر، ساری، قائمشهر، آمل و بابلسر که عمدتاً نواحی شرقی و میانه استان به حساب می آیند، انجام شد. از ۲۰ خانواده بیماران هموفیلی A (۳۰ بیمار و ۶۵ نفر از خانواده های وابسته به آنها) مورد مطالعه قرار گرفتند. ابتدا بیماران هر شهرستان به کمک شبکه بهداشت آن شهرستان مورد شناسائی قرار گرفتند. سپس با همکاری پزشکان مشاور مراکز بهداشت هر شهرستان با خانواده بیماران تماس حاصل شد و از خانواده هایی که حاضر به همکاری بودند پرسشنامه تکمیل گردید. **روش نمونه گیری و استخراج DNA:** از بیمارانی که قبلاً با انجام آزمایشات هماتولوژی هموفیلی نوع A در آنها ثابت شده بود و عمدتاً در کانون هموفیلی پرونده داشتند جهت مطالعه تعیین ناقلین در وابستگان آنها مقدار ۱۰ سی سی خون وریدی در لوله حاوی ۳۰۰ میکرولیتر ضد انعقاد EDTA (۰/۵ مولار) از آنان تهیه و تا زمان تخلیص DNA در دمای ۲۰ - درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس DNA با استفاده از روش "Nucleon BACCII" از خون محیطی استخراج گردید و با استفاده از اسپکترومتر در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر از نظر میزان خلوص و غلظت (کمیت و کیفیت) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۲).

تعیین ژنوتیپ مارکر ها بوسیله PCR: تعیین ناقلین به روش پیوستگی ژنی (linkage study) و با استفاده از سه نقطه یا مارکر پلی مورفسم در ژن فاکتور هشت شامل، پلی مورفسم G/A در نوکلئوتید ۲۷ اینترون ۷ [AlwN1]، پلی مورفسم T/A در اینترون ۱۸ [BCI1] و پلی مورفسم C/T در اینترون ۱۹ [HindIII] صورت گرفت. برای اینکار از روش ARMS-PCR برای تعیین ژنوتیپ افراد در نقاط مورد مطالعه استفاده شد (۱۳). در این روش با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (۱۳) و به کمک ترموسایکلر (MasterCycler gradient) از کمپانی اپندروف آلمان تکثیر شدند. DNA ژنومی نمونه ها بوسیله آنزیم DNA پلیمرز Taq (شرکت سینازن) تکثیر یافت. ۲۴ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR (شرکت سینازن، ایران) در هر میکروتیوب شامل تریس ۱۰ میلی مولار (PH=۸/۳)، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی مولار، کلرید منیزیم (شرکت سینازن) ۱/۵ میلی مولار و ۲۰۰ میکرو مول از هر یک از dNTP (شرکت سینازن) و ۰/۲۵ نانوگرم در میکرو لیتر از هر یک از پرایمرهای جهش یافته یا طبیعی و پرایمر مشترک (شرکت پریم، ایتالیا) ۱، واحد از آنزیم پلی مرز Taq (شرکت سینازن) و یک و نیم میکرولیتر از DNA ژنومیک فرد بیمار ریخته شد. تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر با شرایط ۹۵ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه، انجام شد. نمونه ها به ترتیب ۹۵ درجه سانتیگراد ۶۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر برای مارکرهای BCL1, HindIII و AlwN1 به ترتیب ۶۳، ۶۵ و ۶۹ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد ۶۰ ثانیه برای ۳۵ بار تکثیر گردید و نهایتاً نمونه ها در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه قرار گرفتند.

انجام الکتروفورز: پس از انجام PCR، ۱۰ میکرولیتر از محصول تکثیر یافته بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی ۱۰ نانوگرم در هر میلی لیتر اتیدیم بروماید در ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. برای ساختن ژل آگارز ۱/۵ در صد، میزان یک و نیم گرم از آگارز را در ۱۰۰ سی سی بافر 1X TBE (تریس، بوریک اسید و EDTA) حل کرده و سپس به ظرف های مخصوص الکتروفورز منتقل گردید. به هر ۵۰ سی سی ژل، میزان ۸-۱۰ میکرولیتر اتیدیم بروماید ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر اضافه کردیم و سپس نمونه های PCR با ولتاژ ۱۰۰ به

و دارای ۲۶ آگزن می باشد. طول mRNA فاکتور ۸ حدود ۹ کیلو باز است که یک پروتئین بالغ با ۲۳۳۲ اسید آمینه را کد می نماید (۴-۲). بطور معمول مردان با دریافت یک ژن معیوب از مادر به هموفیلی مبتلا می شوند در حالیکه زنان با دریافت یک ژن معیوب از یکی از والدین ناقل خواهند بود. افراد مذکر مبتلا دارای علائم بالینی نظیر خونریزی در مفاصل، عضلات، خونریزی پس از ضربه یا جراحی، خونریزیهای گوارشی، کبود شدگی و علائم مشابه دیگر می باشند (۵). مشکل آلودگی به ویروس های ایدز و هپاتیت بدلیل دریافت فرآورده های خونی، مشکلات ناشی از خونریزی در هنگام جراحی و دندانپزشکی، مشکلات روانی ناشی از داشتن یک بیماری ارثی در خود فرد و اعضای خانواده از موارد مهمی است که این بیماران با آن مواجه می باشند. فعالیت فاکتور انعقادی موجود در پلاسما در هموفیلی شدید کمتر از یک درصد، در هموفیلی متوسط ۵-۱ درصد و در هموفیلی خفیف ۲۵-۵ درصد میزان طبیعی آن در خون (۵۰ تا ۱۵۰ میلی گرم در دسی لیتر) است (۵و۶). اگرچه درمان با فاکتور ۸ رضایت بخش می باشد، اما فشار هزینه های درمان در کشورهای در حال توسعه مسئله مهمی به شمار می رود (۹-۷). روشهای مختلفی جهت تعیین افراد ناقل بیماری هموفیلی A از جمله تعیین میزان فاکتور هشت در خون، استفاده از پیوستگی ژنی (ژن فاکتور هشت) و نهایتاً تعیین موتاسیون در افراد مبتلا و بررسی آن در دیگر افراد آن خانواده وجود دارد، در سالهای اخیر با پیشرفت تشخیص های مولکولی در ژنتیک امکان تشخیص قبل از تولد برای خانواده های در معرض خطر فراهم شده است. تعیین موتاسیون برای بیماری هموفیلی نوع A با ژنی به طول ۱۷۸۰۰۰ نوکلئوتید (۸۹) برابر ژن بتا-گلوبین، مسئول بیماری بتا-تالاسمی) که دارای هتروژنوسیتی یا ناهمگونی بالا از نظر موتاسیون های ایجاد کننده است، کار تشخیص قبل از تولد به روش تعیین موتاسیون را مشکل می سازد.

سابقه خانوادگی بیماری شاخص مناسبی برای پیگیری بیماری می باشد، تقریباً ۳۰٪ موارد هموفیلی A بدون سابقه خانوادگی هستند (۱۰). استفاده از پیوستگی ژنی (Linkage Study) بیشترین استفاده را در تعیین ناقلین مونث خانواده های واجد هموفیلی داشته است. مزیت این روش در این است که بدون انجام مراحل تعیین موتاسیون که کاری دشوارتر و با صرف هزینه های زیاد است قابل اجرا می باشد و در کشورهای در حال توسعه نسبت به تعیین موتاسیون ترجیح داده می شود (۱۱و۶). لذا این مطالعه بمنظور، تعیین ناقلین در خانواده های مبتلا به بیماری هموفیلی نوع A در استان مازندران به روش پیوستگی ژنی (linkage study) با استفاده از سه نقطه یا مارکر پلی مورفسم در ژن فاکتور هشت انجام شد. به دلیل اینکه مارکرهای پلی مورفسم G/A در نوکلئوتید ۲۷ اینترون ۷ [AlwN1]، پلی مورفسم T/A در اینترون ۱۸ [BCI1] و پلی مورفسم C/T در اینترون ۱۹ [HindIII] در داخل ژن فاکتور هشت قرار دارند و میزان نوترکیبی بین آنها بسیار کم بوده، بنابر این درصد خطا را کاهش می دهند، همچنین بررسی های انجام شده در جوامع مختلف و ایران، نیز نشانگر میزان گویائی و هتروزیگوسیتی بالای این شاخص ها می باشد، انتخاب شدند.

مواد و روشها

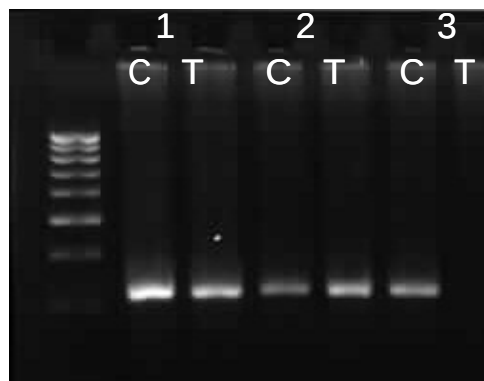
این مطالعه مقطعی بر روی ۲۰ خانواده هموفیلی نوع A و بستگان آنها (پدر، مادر، خواهران، خاله و دختر خاله ها و فرزندان آنها و بستگان نزدیک دیگر

موتاسیون جدید اتفاق افتاده و احتمال ناقل بودن و انتقال ژن جهش یافته از مادر به فرزندان دیگر محتمل نیست، لذا در این خانواده ها، بررسی های بیشتر جهت تعیین ناقلین صورت نگرفت در بررسی تعیین ناقلین در ۱۲ خانواده که سابقه قبلی هموفیلی A را دارا بودند (۶۰٪) ۲۶ بیمار و ۱۱ نفر از مادران از نظر مارکر C/T در اینترون ۱۹ (HindIII)، ۹ نفر از نظر مارکر T/A در اینترون ۱۸ (BclI) و ۱۰ نفر از نظر مارکر A/G در اینترون ۷ (AlwN1) هتروزیگوت بودند که ردیابی آلل معیوب را در این خانواده ها امکان پذیر نمود. همچنین ۲ نفر از مادران از نظر هیچکدام از این مارکرها آگاهی دهنده نبودند و امکان ردیابی آلل معیوب در دختران آنها وجود نداشت. در نهایت ۴۵ نفر از وابستگان مونث افراد مبتلا در این طرح مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند که در مجموع ۱۲ فرد مونث سالم و ۲۸ نفر به عنوان ناقل بیماری که ۱۱ نفر از آنها ناقل اجباری محسوب می شوند در خانواده های دارای فرزند هموفیل شناخته شدند. ناقلین اجباری شامل دختر مرد هموفیل، مادر با دو یا بیشتر پسر هموفیل و یا مادر بیمار هموفیل در خانواده ای که سابقه قبلی هموفیلی وجود داشته و فرد دیگری از بستگانش، می باشد. شکل ۲ الف در این خانواده که ۳ نسل آن در شجره نامه دیده می شود. ژن عامل بیماری در فرد شاخص (II-2) از مادر ناقل به ارث رسیده است که دارای مارکرهای $\{(T)-(T)-(G)\}$ می باشد. حاصل بررسیهای مولکولی به روش پیوستگی ژنی در این خانواده گویای آن است که افراد مونث دیگر این خانواده شامل II-7، III-7 و III-6، III-1 واجد کروموزوم X حامل ژن فاکتور هشت جهش یافته همانند فرد بیمار این خانواده هستند و لذا برای بیماری هموفیلی A ناقل محسوب می شوند. در یک خانواده با وجود ۳ مرد بیمار و خواهران سالم که حاضر به همکاری جهت تعیین ناقل نبودند (شکل ۲، ب) یافته ها بیانگر این واقعیت است که تولد فرزندان هموفیلی برای بستگان و افراد بیمار در هر زایمان تا ۲۵٪ وجود دارد. همچنین یافته های بدست آمده از کل افراد بررسی شده در این تحقیق بیانگر ضریب هتروزیگوتی زیر برای هر یک از مارکرها در جمعیت مورد مطالعه بوده است. ۴۹/۴٪ برای پلی مورفیسم G/A در اینترون ۷، ۴۱/۱۷٪ پلی مورفیسم T/A در اینترون ۱۸ و ۴۲/۳۵٪ برای پلی مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ محاسبه شده است که هر سه نتیجه نشانگر درصد بالای ضریب هتروزیگوتی در جمعیت بررسی شده می باشد.

جدول ۱. توزیع علائم بالینی در بیماران مبتلا به هموفیلی بررسی شده در استان مازندران

علائم بالینی	بیماران مبتلا به هموفیلی A
تعداد(٪)	
خونریزی از بینی	۱۵ (۵۱/۷)
خونریزی قاعدگی	۱ (۲/۷)
خونریزی مفصلی	۱۸ (۶۰)
هماتوم بافتهای عضلانی	۲۲ (۷۱)
خونریزی گوارشی	۷ (۲۳/۳)
خونریزی مغزی	۲ (۶/۷)
خونریزی پس از ختنه	۲۰ (۶۶/۷)
خونریزی پس از جراحی	۹ (۳۰)
خونریزی پس از کشیدن دندان	۱۷ (۵۸/۶)

مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شدند. در نهایت برای بررسی نتایج PCR، از ژل با استفاده از دستگاه عکس برداری تصویر تهیه و مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. نمونه ای از نتیجه ARMS-PCR در تشخیص پلی مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ [HindIII] به عنوان یک مارکر داخلی در ژن فاکتور ۸. در این روش برای هر فرد دو لوله PCR، یکی برای حالت (C) و دیگری برای حالت (T) بکار می رود. لوله های C و T ردیف ۱ مربوط به یک زن هتروزیگوت کنترل مثبت است. لوله های C و T ردیف ۲ و ۳ متعلق به افرادی است که در این تحقیق بررسی شده است. نمونه ۲ فرد هتروزیگوت برای C و T و فرد شماره ۳ هموزیگوت برای C می باشد.

تعیین ناقلین هموفیلی A: تعیین ناقلین به روش پیوستگی ژنی (linkage study) و با استفاده از سه نقطه یا مارکر پلی مورفیسم در ژن فاکتور ۸ صورت گرفت. برای اینکار از روش ARMS-PCR برای تعیین ژنوتیپ افراد استفاده شد. نتیجه حاصل از هر یک از این قطعات PCR به عنوان مارکرهای مولکولی در فرد بیمار و متعاقب آن در خانمهای فامیل از قبیل خواهر، خاله و دختر خاله مورد ارزیابی قرار گرفت. با تعیین فاز پیوستگی مارکرها در افراد مبتلا و مقایسه آن با نتایج بدست آمده در افراد دیگر خانواده، وضعیت افراد مونث از نظر به ارث بردن کروموزوم حاوی موتاسیون یا ناقل بودن روشن گردید.

یافته ها

در این مطالعه ۹۵ نفر از ۲۰ خانواده بیماران هموفیلی نوع A (۳۰ بیمار و ۶۵ نفر از افراد وابسته به آنها) مورد بررسی قرار گرفتند. از ۳۰ بیمار مبتلا به هموفیلی نوع A، ۲۸ نفر (۹۴/۷٪) مرد و ۲ نفر (۵/۳٪) زن با میانگین سنی 26.6 ± 16 سال بودند. از ۲۰ خانواده مورد بررسی، در ۸ خانواده بدلائل مختلف از جمله عدم وجود سابقه قبلی بیماری، عدم همکاری افراد سالم و یا بیمار در ارائه اطلاعات و نمونه خون و یا عدم وجود فرد مونث مشکوک برای بیماری، بررسیهای مولکولی انجام نپذیرفت. فراوانترین علائم بالینی در بیماران مبتلا به هموفیلی نوع A هماتوم (۷۱٪) و کمترین علائم، خونریزی مغزی (۶/۷٪) بود (جدول ۱). از ۲۰ خانواده بررسی شده، ۳۰ بیمار هموفیل مشاهده گردید که با بررسی سابقه خانوادگی و شجره نامه، در ۸ خانواده بیماری برای اولین بار دیده شد و دارای سابقه قبلی نبودند که به عنوان موارد جدید تلقی گردیدند (۴۰٪). از آنجائی که موارد جدید به معنی ایجاد موتاسیون جدید در همان عضو یا فرد مبتلا خانواده است که ژن معیوب را از والدین دریافت نکرده بلکه در خود فرد یک

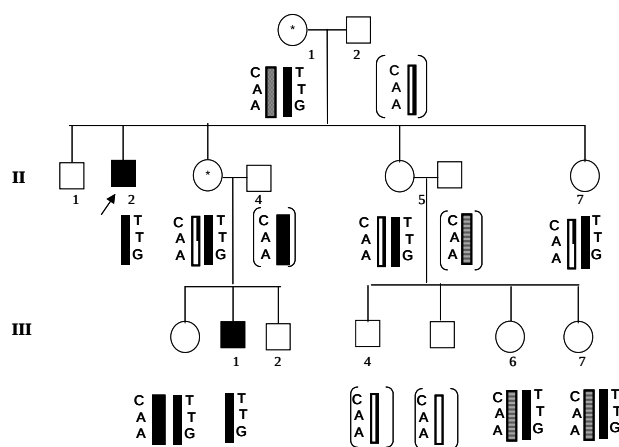
مبتلا یعنی آل (I) به عنوان آل معیوب بوده و هرکدام از خواهران که این آل را داشته باشند ناقل هموفیلی محسوب می شوند (۱۴). یافته های این تحقیق نشانگر این واقعیت است که در خانواده های بزرگ با تعداد نسل ها و فرزندان متعدد (شکل ۲، ب)، بدلیل عدم آگاهی و عدم بررسی و پیگیری های لازم جهت تعیین ناقلین و تشخیص قبل از تولد، احتمال تولد فرزندان هموفیل برای بستگان مونث درجه یک و در افراد بیمار در هر زایمان تا ۲۵٪ وجود دارد که نیاز به پیگیری های بیشتر می باشد.

مارکرهای مختلف داخل ژنی و خارج ژنی برای تشخیص ناقلین هموفیلی تا بحال گزارش شده است که تعداد آنها به بیش از ۱۰ عدد می رسد که مطالعات گذشته میزان گویائی هر یک از این مارکرها را در بررسی ناقلین نشان داده است (۱۵-۱۸). بطور کل مارکرهایی در این مطالعات استفاده می شوند که شیوع هتروزیگوسیتی بالایی داشته باشند (۱۹ و ۲۰). مطالعات گذشته سودمندی مارکرهای A/G در نوکلئوتید ۲۷ اینترون ۷ [AlwN1]، T/A در اینترون ۱۸ [Bcl1] و C/T در اینترون ۱۹ [HindIII] را هم در جوامع مختلف و هم در ایران به اثبات رسانده بود. در تحقیقی که توسط Abbaszadegan و همکاران در مرکز و شمال خراسان انجام گرفت درصد هتروزیگوتی مارکرهای فوق در خانواده ها به صورت HindIII (۵۴/۵۴)٪، Bcl1 (۳۶/۳۶)٪، AlwN1 (۳۶/۳۶)٪ بود (۲۱)، که با یافته های این تحقیق مشابه می باشد. همچنین تعدادی از بررسی های هتروزیگوتی گزارش شده در جمعیت های مختلف آسیائی، اروپائی و آمریکائی به همراه مطالعات مختلف در ایران نشان می دهد که ضریب هتروزیگوسیتی در جمعیت های مختلف آسیائی با یافته های بدست آمده در ایران مشابه بوده و با میزان گزارش شده آن در کشور های اروپائی و آمریکائی اختلاف زیادی از خود نشان نمی دهد (۲۲-۲۴ و ۱۳). به عنوان مثال این میزان برای مارکر T/A در اینترون ۱۸ [Bcl1] در کشور های هند، ژاپن و کره به ترتیب ۵۳٪، ۲۷/۹٪ و ۲۱٪ گزارش شده است (۲۵ و ۱۸) که با میزان ۴۱٪ در این مطالعه قابل مقایسه است. همچنین برای مارکر C/T در اینترون ۱۹ [HindIII] در کشور های هند و ژاپن به ترتیب ۴۴ و ۵۷ درصد و برای روسیه ۴۱٪ گزارش شده است (۲۶ و ۱۸) که با میزان ۴۲٪ در این مطالعه نزدیک می باشند.

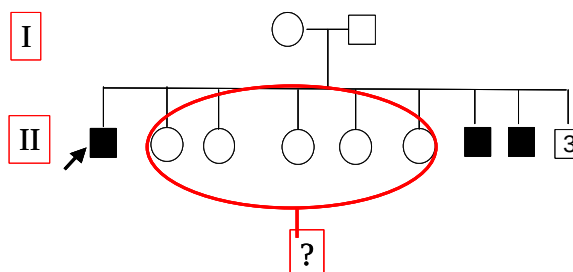
یافته های این تحقیق نشان داد که گویائی این مارکرها در جمعیت شمال ایران همانند مناطق دیگر کشور بالا بوده و ضریب هتروزیگوتی بدست آمده برای هر یک از این مارکرها در این جمعیت این مطلب را تأیید می نماید. با توجه به اینکه اساس تستهای تشخیصی در هموفیلی بر پایه روشهای مولکولی است، به نظر می رسد که استفاده از مارکرهای آگاهی دهنده دیگر برای آنالیز پیوستگی DNA می تواند در حد قابل توجهی دقت تشخیص را بالا برده و خطر اشتباه در حین آنالیز مولکولی را کاهش دهد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران برای حمایت مالی این تحقیق و همچنین از بیماران مراجعه کننده به مراکز بهداشت شهرستانهای بهشهر، ساری، قائمشهر، بابلسر و آمل که در این مطالعه ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می نمایم.



الف



ب

شکل ۲. الف: شجره یک خانواده هموفیلی A بررسی شده در استان مازندران. پیوستگی ژنی به ترتیب مربوط به مارکر های، HindIII و BCL1 و AlwN1 از بالا به پایین در تصویر دیده می شود. این خانواده که ۳ نسل آن در شجره نامه دیده می شود بیماری را در نسل دوم و سوم نشان داده است. ژن عامل بیماری در فرد شاخص (II-2) از مادر ناقل به ارث رسیده است. و دارای مارکر های { (T)-(T)-(G) } می باشد. حاصل بررسی های مولکولی به روش پیوستگی ژنی در این خانواده گویائی آن است که افراد مونث این خانواده یعنی II-7، III-6 و III-1 همگی کروموزوم ایکس حاوی موتاسیون را به ارث برده و برای بیماری هموفیلی A ناقل هستند. افرادی که وضعیت ژنوتیپی آنان در براکت {} قرار داده شده کار آزمایشگاهی بر روی آنها صورت نگرفته، بلکه ژنوتیپ آنها از والدین یا فرزندان شان پیش بینی شده است. (ب) شجره مربوط به یک خانواده مازندرانی که با وجود ۳ مرد بیمار در خانواده، خواهران سالم حاضر به همکاری جهت تعیین ناقل نبوده اند.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه از ۴۵ فرد مونث بررسی شده ۱۱ نفر ناقل اجباری می باشد و ۱۷ فرد مونث به عنوان ناقل با استفاده از روش بررسی ۳ مارکر مولکولی داخل ژنی شناسایی شدند. تشخیص غیر مستقیم ناقلین هموفیلی نیاز به یک مارکر آگاهی دهنده (Informative) ژن فاکتور ۸ در مادر دارای فرزند مبتلا به هموفیلی دارد اگر مادر برای آن آل هتروزیگوت باشد، به عنوان مثال (T/A) و پسر مبتلا تنها آل T را دریافت کرده باشد بنابراین آل مشترک بین مادر و پسر

Evaluation of Hemophilia A Families to Detect Carriers Using Gene Linkage in Mazandaran Province

M.B. Hashemi Soteh (PhD)^{1*}, Z. Hosseini Khah (MSc)², M.A. Bagherian (GP)³, R. Mohseni (GP)³,
A. Siami (GP)³, F. Valizadeh (GP)³, R. Zakizadeh (BSc)³

1. Medical Faculty and Thalassaemia Research Center and Cellular and Molecular Research Center. Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Mazandaran, Iran

2. Cellular and Molecular Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Mazandaran, Iran

3. Mazandaran University of Medical Sciences, Mazandaran, Iran

Received: Feb 8th 2009, Revised: May 13th 2009, Accepted: Jul 15th 2009.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Hemophilia A is an X-linked recessive inherited disease that its frequency is reported as 1 in 5000 to 10000 males. Linkage analysis is widely used in related female of hemophilic family around the world. In this study, 3 intragenic polymorphism markers including G/A in intron 7, T/A polymorphism in intron 18 and C/T polymorphism in intron 19 were introduced as the most informative markers for the linkage analysis of factor eight gene. This research was designed to determine the carrier people and give knowledge to the families in risk for the birth of another affected child on those families.

METHODS: In this cross-sectional study, 20 hemophiliacs A families including 30 patients and 64 family members (father, mother, sisters, aunt, and their children and other relative, who had chance to be carrier) from 5 cities of Mazandaran province were investigated. At first, family history was collected and pedigree was drawn. Five to 10 milliliter peripheral bloods were collected from each person and then DNA was extracted. Molecular study was performed using ARMS-PCR method and using three mentioned markers. At last, carrier persons were identified regarding to the inheritance of the same affected chromosome in patients and other related females in the family and comparison of linkage phase in affected person and results achieved from related females.

FINDINGS: From 95 individuals who were studied in 20 families, 28 related women to the hemophilia patients were diagnosed as obligate or possible carriers. Also the usefulness of each markers applied in this study were evaluated by calculation of the coefficient of heterozygosity for each polymorphic makers and following results were achieved: G/A in intron 7 (49.4%), T/A in intron 18 (41.17%) and C/T in intron 19 (42.35%).

CONCLUSION: The results showed that polymorphic markers used in this study were highly informative and suitable for carrier detection of hemophilia A.

KEY WORDS: Hemophilia A, Linkage study, Molecular analysis, Carrier detection, Polymorphism, Gene markers.

*Corresponding Author;

Address: Department of Biophysics, Biochemistry & Genetics, Mazandaran University of Medical Sciences, Khazarabad Blvd. Sari, Iran

Tel: +98 151 3543081-3

E-mail: hashemisoteh@gmail.com

References

1. Hoyer LW. Hemophilia A. *N Engl J Med* 1994; 330(1): 38-47.
2. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312(5992): 326-30.
3. Wood, WI, Capon DJ, Simonsen CC, et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 1984; 312(5992): 330-7.
4. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* 2002; 55(2): 127-44.
5. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias A and B. *Lancet* 2003; 361(9371): 1801-9.
6. Keeney S, Mitchell M, Goodeve A. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia genetics laboratory network. *Haemophilia* 2005; 11(4): 387-97.
7. Gringeri A, Mantovani LG, Scalone L, Mannucci PM. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood* 2003; 102(7): 2358-63.
8. Sasanakul W, Chuansumrit A, Ajjimakorn S, et al. Cost-effectiveness in establishing hemophilia carrier detection and prenatal diagnosis services in a developing country with limited health resources. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34(4): 891-8.
9. Tencer T, Friedman HS, Li-McLeod J, Johnson K. Medical costs and resource utilization for hemophilia patients with and without HIV or HCV infection. *J Manag Care Pharm* 2007; 13(9): 790-8.
10. Price VE, Hawes SA, Chan AK. A practical approach to hemophilia care in children. *Paediatr Child Health* 2007; 12(5): 381-3.
11. Srinivasan A, Mukhopadhyay S, Karim Z, et al. Factor VIII gene polymorphisms in North Indian population: a consensus algorithm for carrier analysis of hemophilia A. *Clin Chim Acta* 2002; 325(1-2): 177-81.
12. Hashemi Soteh MB, Akhavan Niaki H, Kosarian M, et al. The study of relationships between β -globin gene mutations in β -thalassaemia patients with response to hydroxyurea treatment *J Mazandaran Univ Med Sci* 2008; 18 (64): 1-10.
13. Azimifar SB, Seyedna SY, Zeinali S. Allele frequencies of three factor VIII gene polymorphisms in Iranian populations and their application in hemophilia A carrier detection. *Am J Hematol* 2006; 81(5): 335-9.
14. Klein I, Andrikovics H, Bors A, Nemes L, Tordai A, Varadi A. A haemophilia A and B molecular genetic diagnostic programme in Hungary: a highly informative and cost-effective strategy. *Haemophilia* 2001; 7(3): 306-12.
15. Saxena R, Mohanty S, Choudhry VP. Prenatal diagnosis of haemophilia. *Indian J Pediatr* 1998; 65(5): 645-9.
16. Petkova R, Chakarov S, Kremensky I. Genetic analysis of haemophilia A in Bulgaria. *BMC Blood Disord* 2004; 4(1): 2.
17. Saha A, Mukherjee S, Maulik M, Chandak GR, Ray K. Evaluation of genetic markers linked to hemophilia A locus: an Indian experience. *Haematologica* 2007; 92(12): 1725-6.
18. Tasleem Raza S, Husain N, Kumar A. Screening for hemophilia A carriers: utility of PCR-RFLP--based polymorphism analysis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009; 15(1): 78-83.
19. Mahasandana C, Pung-Amritt P, Treesucon A, et al. Carrier detection by DNA linkage analysis in eighty Thai hemophilia A families. *J Med Assoc Thai* 2002; 85 (Suppl 2): S 513-21.
20. Sawada A, Sumita C, Higasa S, Ueda M, Suehiro A, Kakishita E. Suitability of four polymorphic DNA markers for indirect genetic diagnosis of haemophilia A in Japanese subject. *Thromb Res* 2002; 105(3): 271-6.
21. Abbaszadegan MR, Ziaee M, Khadivi-zand F, et al. Carrier detection of hemophilia A in southern Khorasan using the 3 polymorphic sites of BclI, HindIII, and AlwNI. *Blood, Sci J Iranian Blood Transfus Organ Res Center* 2006; 4(3): 291-8. [in Persian]

22. Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, et al. Haemophilia: strategies for carrier detection and prenatal diagnosis. *Bull World Health Organ* 1993; 71(3-4): 429-58.
23. Shetty S, Ghosh K, Pathare A, Colah R, Badakare S, Mohanty D. Factor VIII and IX gene polymorphisms and carrier analysis in Indian population. *Am J Hematol* 1997; 54(4): 271-5.
24. Chowdhury MR, Herrmann FH, Schroder W, et al. Factor VIII gene polymorphisms in the Asian Indian population. *Haemophilia* 2000; 6(6): 625-30.
25. Choi YM, Hwang D, Choe J, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia A in a Korean population by PCR-based analysis of the BclI/intron 18 and St14 VNTR polymorphisms. *J Hum Genet* 2000; 45(4): 218-23.
26. Surin VL, Aseev MV, Zhukova EL, et al. Detection of carriers of hemophilia A by testing for HindIII polymorphism in the factor VIII gene by PCR. *Genetika* 1990; 26(10): 1840-6.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.