مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره یازدهم، شمارهٔ ۶، بهمن – اسفند ۱۳۸۸، صفحه ۷۰-۶۴

مقاله تحقیقی

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

محمدباقر هاشمی سوته (PhD)[1*]، زهرا حسینی خواه (MSc)[2]، محمدعلی باقریان رستمی (GP)[3]، رحمت اله محسنی (GP)[3]، انسیه سیامی (GP)[3]، فرزانه ولی زاده (GP)[3]، رقیه زکی زاده (BSc)[3]

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 شناسائی 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، مارکر های ژنی.

مقدمه

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 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 می‌دهد، طول این ژن ۱۸۶ کیلو باز

▣ 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: ۳-۳۵۴۳۰۸۱-۰۱۵۱
e-mail: hashemisoteh@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.6.10.5]

و دارای ۲۶ اگزون 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 علایم 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 (۶و۵). 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 نهایتا 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 نوعA با ژنی به طول ۱۷۸۰۰۰ نوکلئوتید (۸۹ برابر ژن بتا-گلوبین ، مسئول بیماری بتا-تالاسمی) که دارای هتروژنسیتی 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، تقریبا 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 مورفیسم در ژن فاکتور هشت انجام شد. به دلیل اینکه مارکرهای پلی مورفیسم G/A در نوکلئوتید ۲۷ اینترون ۷ [AlwN1]، پلی مورفیسم T/A در اینترون ۱۸ {BCl1} و پلی مورفیسم 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 که احتمال ناقل بودن آنها وجود داشت) در ۵ شهرستان استان مازندران، شامل بهشهر، ساری، قائمشهر، آمل و بابلسر که عمدتا نواحی شرقی و میانه استان به حساب می آیند، انجام شد. از ۲۰ خانواده بیماران هموفیلیA (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.

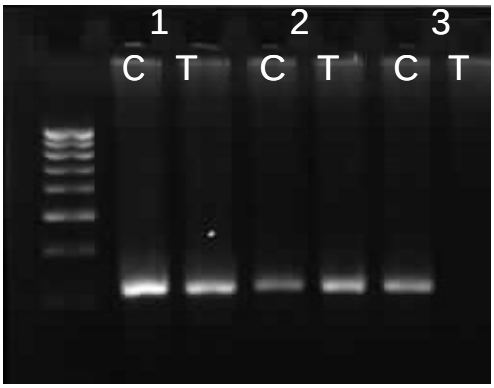
روش نمونه گیری و استخراج DNA: از بیمارانی که قبلا با انجام آزمایشات هماتولوژی هموفیلی نوع A در آنها ثابت شده بود و عمدتا در کانون هموفیلی پرونده داشتند جهت مطالعه تعیین ناقلین در وابستگان آنها مقدار ۱۰سی سی خون وریدی در لوله حاوی ۳۰۰ میکرولیتر ضد انعقاد EDTA (۰/۵ مولار) از آنان تهیه و تا زمان تخلیص DNA در دمای ۲۰ – درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپسDNA با استفاده از روش"Nucleon BACCII" از خون محیطی استخراج گردید و با استفاده از اسپکتروفتومتر 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 مورفیسم در ژن فاکتور هشت شامل، پلی مورفیسم G/A در نوکلئوتید ۲۷ اینترون ۷ [AlwN1]، پلی مورفیسم T/A در اینترون ۱۸ در [BCl1] و پلی مورفیسم 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 پلیمراز Taq (شرکت سیناژن) تکثیر یافت. ۲۴ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR (شرکت سیناژن، ایران) در هر میکروتیوب شامل تریس ۱۰ میلی مولار (۸/۳=PH)، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی مولار، کلرید منیزیم (شرکت سیناژن) ۱/۵ میلی مولار و ۲۰۰ میکرو مول از هر یک ازdNTP (شرکت سیناژن) 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 مراز Taq (شرکت سیناژن) 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 نهایتا 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 اتیدیوم 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 اتیدیوم بروماید ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر اضافه کردیم و سپس نمونه های PCR با ولتاژ ۱۰۰ به

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.6.10.5]

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 هموفیلیA: 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 مارکر های 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.

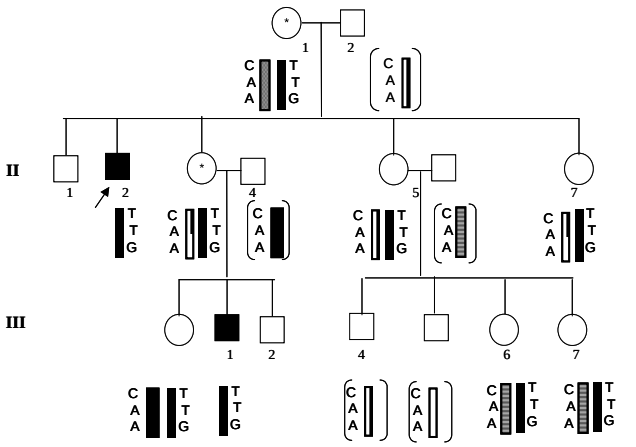
یافته ها

در این مطالعه ۹۵ نفر از ۲۰ خانواده بیماران هموفیلی نوع A (۳۰ نفر 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 ۱۶±۲۶/۶ سال بودند. از ۲۰ خانواده مورد بررسی، در ۸ خانواده بدلایل 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 علایم 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 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 (Bcl1) 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 مارکر ها 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 مورفیسمC/T در اینترون ۱۹ محاسبه شده است که هر سه نتیجه نشانگر درصد بالای ضریب هتروزیگوتی در جمعیت بررسی شده می باشد.

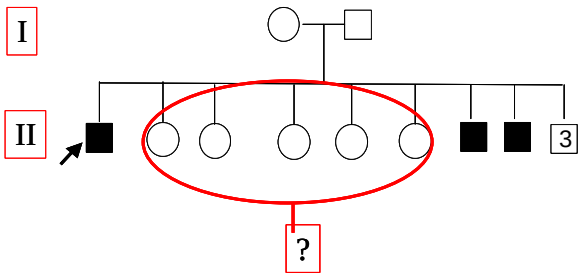
جدول۱. توزیع علایم بالینی در بیماران مبتلا به هموفیلی بررسی شده در استان مازندران

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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.6.10.5]



الف



ب

شکل۲. الف: شجره یک خانواده همـوفیلی A بررسـی شـده در اسـتان مازندران. پیوستگی ژنی بـه ترتیـب مربـوط بـه مـارکر هـای، HindIII و BCL1 و AlwN1 از بالا به پائین در تـصویر دیـده مـی شـود. ایـن خانواده که ۳ نسل آن در شجره نامه دیده می شود بیماری را در نـسل دوم و سوم نشان داده است. ژن عامل بیماری در فرد شـاخص (II-2) از مـادر ناقل به ارث رسیده است. و دارای مارکر های {(G)-(T)-(T)} می باشـد. حاصل بررسی های مولکولی به روش پیوستگی ژنی در این خانواده گویـای آن است که افراد مونث این خانواده یعنی II-7، III-7و III-6 ، III-1 همگی کروموزوم ایکس حاوی موتاسیون را به ارث برده و بـرای بیمـاری هموفیلی A ناقل هستند. افرادی که وضعیت ژنـوتیپی آنـان در براکـت {} قرار داده شده کار آزمایشگاهی بر روی آنها صورت نگرفته، بلکـه ژنوتیـپ آنها از والدین یا فرزندان شان پیش بینی شده است.

ب) شجره مربوط به یک خانواده مازندرانی که بـا وجـود ۳ مـرد بیمـار 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 داخـل ژنی شناسایی شدند. تشخیص غیر مستقیم ناقلین هموفیلی نیـاز بـه یـک مـارکر آگاهی دهنده (Informative) ژن فـاکتور ۸ در مـادر دارای فرزنـد مبـتلا بـه هموفیلی دارد اگر مادر برای آن آلل هتروزیگوت باشد، به عنوان مثـال (T/A) و پسر مبتلا تنها آلل T را دریافت کرده باشد بنابراین آلل مشترک بین مادر و پـسر مبتلا یعنی آلل (T) به عنوان آلل معیوب بوده و هرکدام از خواهران که این آلل را داشته باشند ناقل هموفیلی محسوب مـی شـوند (۱۴). یافتـه هـای ایـن تحقیـق نشانگر این واقعیت است که در خانواده های بزرگ با تعـداد نـسل هـا و فرزنـدان متعدد (شکل ۲، ب)، بدلیل عدم اگاهی و عدم بررسی و پیگیری های لازم جهـت تعیین ناقلین و تشخیص قبل از تولد، احتمال تولد فرزندان هموفیل برای بستگان مونث درجه یک و در افراد بیمار در هر زایمـان تـا ۲۵٪ وجـود دارد کـه نیـاز بـه 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 اسـت (۱۸-۱۵). بطور کل مارکرهائی در این مطالعـات اسـتفاده مـی شـوند کـه شـیوع هتروزیگوسـیتی بـالایی داشـته باشـند (۲۰و۱۹). مطالعـات گذشـته سـودمندی مارکرهای A/G در نوکلئوتیـد ۲۷ اینتـرون ۷ [AlwN1]، T/A در اینتـرون ۱۸ [Bcl1] و C/T در اینترون ۱۹ [HindIII] را هم در جوامع مختلـف و هم در ایران به اثبات رسانده بود. در تحقیقی که توسـط Abbaszadegan و همکاران در مرکز و شمال خراسان انجام گرفت درصـد هتروزیگـوتی مارکرهـای فـوق در خـانواده هـا بـه صـورت (۵۴/۵۴٪) HindIII، (۳۶/۳۶٪) Bcl1، (۳۶/۳۶٪) AlwN1 بود (۲۱)، که با یافته های این تحقیـق مـشابه مـی باشـد. همچنین تعدادی از بررسی هـای هتروزیگـوتی گـزارش شـده در جمعیـت هـای مختلف آسیائی، اروپائی و آمریکائی به همراه مطالعات مختلف در ایران نشان مـی دهد که ضریب هتروزیگوسیتی در جمعیت های مختلـف آسـیایی بـا یافتـه هـای بدست آمده در ایران مشابه بوده و با میزان گزارش شده آن در کشور های اروپائی و آمریکائی اختلاف زیادی از خود نشان نمی دهـد (۲۴-۲۲و۱۶و۱۳). بـه عنـوان 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 (۲۵و۲۰و۱۸) که بـا میزان ۴۱٪ در این مطالعه قابـل مقایـسه اسـت. همچنـین بـرای مـارکرC/T در اینترون ۱۹ [HindIII] در کشور های هند و ژاپن به ترتیب ۴۴ و ۵۷ درصد و برای روسیه ۴۱٪ گزارش شده است (۲۶و۲۰و۱۸) 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 تائید می نماید. بـا توجـه بـه اینکه اساس تستهای تشخیصی در هموفیلی بر پایه روشهای مولکولی اسـت، بـه نظر می رسد که استفاده از مارکرهای آگاهی دهنده دیگر بـرای آنـالیز پیوسـتگی 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 دانـشگاه علـوم پزشـکی مازندران برای حمایت مالی این تحقیق و همچنین از بیماران مراجعـه کننـده بـه مراکز بهداشت شهرستانهای بهشهر، ساری، قائمشهر، بابلسر و آمـل کـه در ایـن مطالعه ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر می نمائیم.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.6.10.5]

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 heterozygocity 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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.6.10.5]

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]

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.6.10.5]

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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.6.10.5]

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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1388.11.6.10.5]