Archive of SID

Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Detection of intron 22 inversion type I and II of factor VIII gene in female carriers of hemophilia a using Inverse shifting PCR (IS-PCR) method

Howra Bahrulolum[1], Mehrdad Hashemi[1*], Alimuhammad Malekasgar[2]

[1]Department of Genetics, School of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2]Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.
*Corresponding author; E-mail: drmehashemi@gmail.com

Received: 21 January 2017 Accepted: 12 February 2017 First Published online: 17 January 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 February-March; 40(6):21-27

Abstract

Background: Hemophilia type A is the most common X-linked recessive bleeding disorder, which 45-50% of the cases are caused by intron 22 inversion of factor 8 gene. Carrier detection for prenatal diagnosis in affected families can be effective in order to reduce the spread of disease. Since the linkage analysis for detecting carriers is only possible in families with a family history of hemophilia A, therefore IS-PCR method was chosen as a convenient and reliable method for carrier detection of intron 22 inversion mutation even in sporadic cases of hemophilia A.

Methods: This study was performed on families of hemophilia A patients with intron 22 inversion. After extracting DNA from peripheral blood leukocytes, IS-PCR technique was used to identify intron 22 inversion mutation types 1 and 2.

Results: Among the 9 cases that were analyzed for carrier status by IS-PCR, the results showed that 22/2% were without abnormal allele and 77/8% were carriers of intron 22 inversion mutation.

Conclusion: Using Inverse Shifting PCR is a precise, rapid and reliable method for assessing rearrangements related to intron 22 inversion mutation type 1 and 2 for detecting hemophilia A carriers.

Keywords: Heterozygote Detection, Hemophilia A, Chromosome Inversion, PCR.

How to cite this article: Bahrulolum H, Hashemi M, Malek asgar A M. [Detection of intron 22 inversion type I and II of factor VIII gene in female carriers of hemophilia a using Inverse shifting PCR (IS-PCR) method]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 February-March;40(6):21-27. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

شناسایی جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع۲ ژن فاکتور ۸ در زنان ناقل هموفیلی A به روش (IS-PCR) Inverse Shifting-PCR

حورا بحرالعلوم[۱]، مهرداد هاشمی[*۱]، علی محمد ملک عسگر[۲]

[۱]گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فن آوری نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۲]گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.
[*]نویسنده مسئول؛ ایمیل: drmehashemi@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۱۰/۲۷
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷ بهمن و اسفند؛ ۴۰(۶):۲۱-۲۷

چکیده

زمینه: بیماری هموفیلی A شایع‌ترین بیماری خونریزی دهنده ی وابسته به X مغلوب است که ٪۵۰-۴۵ از موارد به علت وارونگی در اینترون ۲۲ ژن فاکتور ۸ ایجاد می شود. تعیین ناقلین به منظور تشخیص پیش از تولد در خانواده های مبتلا می تواند در کاهش شیوع این بیماری مؤثر باشد. از آن جایی که آنالیز پیوستگی برای تشخیص حاملین فقط در خانواده هایی با سابقه ی خانوادگی هموفیلی A کاربرد دارد بنابراین روش IS-PCR به عنوان روشی مناسب و مطمئن برای شناسایی ناقلین دارای جهش وارونگی اینترون ۲۲ حتی در موارد تک گیر هموفیلی انتخاب شد.

روش‌کار: این مطالعه بر روی خانواده های بیماران مبتلا به هموفیلی A دارای وارونگی اینترون ۲۲ انجام گرفت. پس از استخراج DNA از لکوسیت های خون محیطی، از تکنیک IS-PCR به منظور شناسایی جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع۲ استفاده شد.

یافته‌ها: از ۹ نفر که برای وضعیت ناقل بودن به روش IS-PCR مورد آنالیز قرار گرفتند، ٪۲۲/۲ فاقد آلل جهش یافته و ٪۷۷/۸ ناقل جهش وارونگی اینترون ۲۲ بودند.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج بدست آمده از این مطالعه تکنیک IS-PCR روشی دقیق، سریع و قابل اعتماد جهت شناسایی جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع۲ برای تشخیص ناقلین هموفیلی A می باشد.

کلید واژه‌ها: تشخیص هتروزیگوت، هموفیلی A، وارونگی کروموزوم، PCR.

نحوه استناد به این مقاله: بحرالعلوم ح، هاشمی م، ملک عسگرع م. شناسایی جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع۲ ژن فاکتور ۸ در زنان ناقل هموفیلی A به روش Inverse Shifting-PCR (IS-PCR). مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۶):۲۱-۲۷

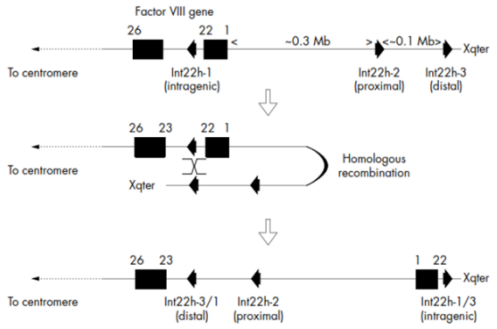
حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری هموفیلی A یک بیماری خونریزی‌دهنده مادرزادی وابسته به X مغلوب ناشی از کاهش فعالیت فاکتور VIII با شیوع ۱:۵۰۰۰ تا ۱:۱۰۰۰۰ نوزاد زنده‌ی پسر در سراسر جهان می‌باشد (۱،۲). مردان به علت داشتن یک کروموزم X با دریافت یک ژن معیوب به هموفیلی مبتلا می‌شوند، در حالیکه زنان با دریافت یک ژن معیوب شکل علامت‌دار بیماری را نشان نداده ولی به عنوان ناقلین نقش عمده‌ای در انتقال بیماری به فرزندان پسر خود ایفا می‌کنند. به این ترتیب ٪۵۰ پسران یک زن ناقل، بیمار و ٪۵۰ دختران وی حامل ژن معیوب خواهند بود (۳). در موارد فوق‌العاده نادری زنان ناقل ممکن است مبتلا به هموفیلی A باشند؛ به عنوان مثال، اگر در آن‌ها غیر فعال شدن نامتعادل کروموزوم X طبیعی (فرضیه لیون)، سندرم ترنر یا سایر اختلالات نادر کروموزوم X وجود داشته باشد یا اگر آنها دختر یک مرد مبتلا و یک زن ناقل باشند (۴). تخمین زده شده است که برای هر مرد هموفیل، ۵ زن حامل بالقوه وجود دارد (۵). بیماری هموفیلی A بسته به سطح فعالیت انعقادی فاکتور VIII به انواع هموفیلی A شدید (٪۱>)، متوسط (٪۵-۱) و خفیف (٪۵<) طبقه‌بندی می‌شود (۴) . خونریزی‌های داخلی، نگرانی عمده در بیماری هموفیلی است. خونریزی داخل مفاصل مانند؛ زانو، مچ پا و آرنج شایع است. این خونریزی ها ممکن است به دلیل یک آسیب وارد شده ایجاد شود اما در هموفیلی شدید، خونریزی می‌تواند خود به خود ایجاد شود (۶). انتظار می‌رود که زنان ناقل، میزان غلظت فاکتور ۸ موجود در پلاسمای آنها نیمی از غلظت موجود در افراد سالم باشد که به طور کلی برای هموستاز نرمال کافی است. با این وجود حدودا ٪۱۰ از زنان با یک آلل بیماری زای فاکتور VIII و یک آلل سالم، دارای فعالیت انعقادی فاکتور VIII کمتر از ٪۳۰ و اختلال خونریزی دهنده می‌باشند (۷، ۸). ژن فاکتور VIII انعقادی نزدیک به ناحیه تلومری کروموزوم X در منطقه Xq28 قرار دارد. این ژن یک ژن بزرگ و پیچیده است که ۱۸۶ کیلوباز از DNA ژنومی را پوشانده و متشکل از ۲۵ اینترون و ۲۶ اگزون می‌باشد که یک زنجیره‌ی پلی پپتیدی پیش ساز ۲۳۵۱ اسید آمینه ای را رمز می‌کند که این زنجیره شامل یک پپتید سیگنال ۱۹ اسید آمینه‌ای و پروتئین بالغ ۲۳۳۲ اسید آمینه‌ای می‌باشد (۱۱-۹). از جمله اختلالات ژنتیکی که منجر به ایجاد هموفیلی A می‌شود می‌توان به حذف‌ها، وارونگی‌های ژنی و جهش های نقطه‌ای اشاره نمود (۱۲). در هموفیلی A شدید، ٪۴۰ از تمام جهش‌ها توسط وارونگی اینترون ۲۲ ایجاد می‌شود (۹). اینترون ۲۲ ژن فاکتور VIII حاوی یک ژن دوم (ژن A مرتبط با فاکتور VIII) است که در جهت مخالف فاکتور VIII رونویسی می‌شود. دو کپی دیگر از F8A در حدود ۵۰۰ کیلوباز بالادست (تلومریک) ژن فاکتور VIII وجود دارد که هر دو در همان جهت ژن فاکتور VIII رونویسی می‌شود. این ویژگی این امکان را می‌دهد تا یک نوترکیبی همولوگی داخل کروموزومی رخ دهد که منجر به وارونگی این منطقه و جدا شدن اگزون ۲۲-۱ از اگزون ۲۶-۲۳ شود. از آن جا که دو نسخه بالادست از ژن F8A وجود دارد، وارونگی دیستال (وارونگی نوع ۱) و پروکسیمال (وارونگی نوع ۲) امکان پذیر می‌باشد که هر دو منجر به فنوتیپ هموفیلی A شدید می‌شود (۱۱) شکل ۱.



شکل ۱: وارونگی اینترون ۲۲ دیستال (نوع۱) و پروکسیمال (نوع۲) ژن فاکتور VIII (۱۳).

به دلیل مشکلات فراوانی که بیماری هموفیلی برای افراد مبتلا و خانواده‌های آن ها دارد و نیز هزینه‌های گزافی که این بیماری بر سیستم درمانی جامعه تحمیل می‌نماید و همچنین با توجه به اینکه فعلا درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد، تلاش‌های گسترده‌ای در سرتاسر جهان به منظور ابداع روش‌هایی برای شناسایی افراد ناقل بیماری و همچنین تشخیص پیش از تولد به منظور کنترل بیماری صورت می‌گیرد (۱۴). در گذشته، تجزیه و تحلیل شجرنامه ها و اندازه‌گیری سطوح فعالیت انعقادی فاکتور ۸ برای تشخیص ناقلین هموفیلی A استفاده می‌شد (۱۵). از طریق آنالیز شجرنامه، مشخص می‌شود که ناقل معلوم، دختر یک بیمار هموفیل است. همچنین مادر دو بیمار هموفیل و مادر فرد مبتلا به هموفیل با سابقه خانوادگی هموفیلی در شجرنامه قابل ردیابی هستند (۱). در اوایل دهه ۱۹۸۰ بررسی وضعیت ناقلین توسط آنالیز DNA ممکن شد که این روش از هاپلوتایپینگ تا تجزیه و تحلیل موتاسیون‌ها که وضعیت ناقلین را بصورت قطعی ارائه می کند تکامل یافت (۱۶). تست تشخیص ناقلین بوسیله آزمایش‌های ژنتیک مولکولی برای بسیاری از زنان در معرض خطر اگر واریانت بیماری‌زا در خانواده آن‌ها شناسایی شده باشد، امکان‌پذیر است (۱). با توجه به اینکه حدود نیمی از موارد هموفیلی A شدید به علت وارونگی اینترون ۲۲ ژن فاکتور ۸ رخ می‌دهد معمولا در بررسی مولکولی این بیماری در خانواده‌های مبتلا ابتدا باید این جهش مورد ارزیابی قرار بگیرد (۱۷). روش‌های ارزیابی ژنتیکی وارونگی اینترون ۲۲ شامل؛ آنالیز ساترن بلات (توصیف شده توسط Lakich و همکاران در سال ۱۹۹۳)، روش LD-PCR (ارائه

www.SID.ir

Archive of SID

شده توسط Bagnall و همکاران در سال ۲۰۰۶) و تکنیک IS-PCR توصیف شده توسط Rossetti و همکاران در سال ۲۰۰۸ می‌باشند (۱۹–۹،۱۸). روش ساترن بلات قادر به ارزیابی نیمه کمی از حاملین موزائیسم می‌باشد اما این روش کار فشرده‌ای است و نیاز به پرسنل مجرب دارد. استفاده از مواد رادیوشیمیایی خطرناک یکی دیگر از نقاط ضعف این روش می‌باشد. همچنین این روش برای تشخیص‌های پیش از تولد نیز ناکارآمد است (۹). روش LD-PCR نیز قادر به ارزیابی انواع وارونگی‌ها می‌باشد اما این روش به کیفیت DNA ورودی، شرایط ترموسایکلینگ و معرف‌ها حساس بوده و همچنین الکتروفورز در این روش به آهستگی انجام می‌شود و بنابراین برای ارزیابی ناقلین روش مناسبی نمی‌باشد (۱۸). اما روش IS-PCR می‌تواند تمام باز آرایی‌های مرتبط با اینترون ۲۲ مانند وارونگی، حذف‌های بزرگ، مضاعف شدگی، واردشدگی و جابه‌جایی را مورد ارزیابی قرار دهد (۱۴). همچنین این روش قادر به ارزیابی ناقلین وارونگی اینترون ۲۲ می‌باشد و برای تشخیص-های پیش از تولد هموفیلی نیز کاربرد دارد (۱۹). هدف از مطالعه حاضر شناسایی ناقلین جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع۱ و نوع۲ به روش نوین IS-PCR می‌باشد.

روش‌کار

در این مطالعه توصیفی که به تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران به شماره مرجع IR.IAU.TMU.REC.1395.276 رسیده است، پس از هماهنگی لازم با بخش خون و انکولوژی بیمارستان حضرت معصومه (س) استان قم، ۳۰ خانواده دارای بیمار مبتلا به هموفیلی A پس از مراجعه به درمانگاه طباطبایی استان قم و تکمیل فرم شرح حال و رضایت‌نامه جهت شرکت در مطالعه انتخاب شدند. کلیه مراحل این تحقیق در مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی استان قم و در بازه زمانی آذر ماه ۱۳۹۳ تا دی ماه ۱۳۹۴ به انجام رسید. در بررسی وضعیت بیماران مشخص شد که ۷ نفر از بیماران مبتلا به هموفیلی A دارای جهش وارونگی اینترون ۲۲ می‌باشند. بنابراین بستگان مونث این ۷ بیمار وارد مطالعه شدند. از این میان ۴ زن ناقل اجباری و ۲ زن ناقل احتمالی وجود داشت که این ۲ دارای فرزند پسر مبتلایی بودند که به صورت تک موردی این بیماری را نشان داده بودند و سابقه بیماری در خویشاوندان آنها وجود نداشت. هم چنین ۳ خواهر مشکوک به ناقل بودن نیز مورد بررسی قرار گرفتند. ۳ سی‌سی خون محیطی از هر فرد شرکت کننده در مطالعه گرفته و در لوله‌های فالکون استریل حاوی مقدار مناسب EDTA، جهت استخراج DNA جمع آوری گردید. سپس DNA ژنومی با استفاده از روش اشباع نمکی (Salting out) از لوکوسیت‌های خون محیطی بیماران استخراج گردید و پس از آن سنجش کیفیت و غلظت DNA های استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. در تکنیک IS-PCR از ۴ نوع پرایمر IU، U۲، U۳ و ID برای بررسی وارونگی اینترون۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ استفاده شد. آغازگرهای IU/ID برای تکثیر آلل نرمال اینترون ۲۲ (۴۸۷ جفت باز)، آغازگرهای U/ID۳ برای تکثیر آلل وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ (۳۳۳ جفت باز) و آغازگرهای U/ID۲، جهت تکثیر آلل وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۲ (۳۸۵ جفت باز) به کار برده شد. پرایمرها با استفاده از نرم افزار Oligo.5 طراحی شد و جهت سنتز به شرکت Bioneer سفارش داده شدند. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر اینترون ۲۲ ژن فاکتور ۸

نوع پرایمر	طول توالی	توالی پرایمر	NC_000023.9
I D	۲۱	ACA TAC GGT TTA GTC ACA AGT	۶۰۸–۱۵۳۷۵۸۵۸۷
I U	۲۰	CCT TTC AAC TCC ATC TCC AT	۵۰–۱۵۳۷۷۹۷۳۰
2 U	۲۰	ACG TGT CTT TTG GAG AAG TC	۹۵–۱۵۴۲۷۰۷۷۵
3 U	۲۲	CTC ACA TTG TGT TCT TGTAGTC	۴۸–۱۵۴۳۳۳۴۲۶

در مرحله بعد به منظور تعیین ناقلین جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع۲ تکنیک IS-PCR به این صورت مورد استفاده قرار گرفت که در مرحله اول جهت هضم آنزیمی DNA، ۲ میکروگرم از DNA ژنومی با ۲۰ واحد آنزیم محدودالأثر Bcl1 (۱۰ واحد بر میکرولیتر) (ترموساینتیفیک، آلمان) به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد در دستگاه انکوباتور قرار گرفت. سپس قطعات DNA به روش فنول–کلروفرم و رسوب با اتانول خالص گردید. در مرحله بعد جهت دستیابی به DNA حلقوی که اساس روش IS-PCR می‌باشد، قطعات DNA تحت تأثیر ۳ واحد آنزیم T۴ لیگاز (۲/۵ واحد بر میکرولیتر) (ژنا بیوسایتس، آلمان) در حجم نهایی ۴۰۰ میکرولیتر به مدت یک شبانه روز در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از آن به منظور آماده‌سازی DNA برای واکنش PCR، خالص‌سازی DNA به روش فنول –کلروفرم و رسوب با اتانول انجام شد. در مرحله آخر، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از DNA حلقوی، در حضور ۰/۶ میکرومولار از هر پرایمر (۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر) (بیونیر، ایران)، ۰/۵ واحد از DNA تک پلیمراز به همراه معرف‌های لازم برای واکنش PCR شامل؛ بافر (۱۰X) (ژنو بیوسایتس، آلمان)، MgCl۲ (۲۵ میلی‌مولار) (ژنو بیوسایتس،آلمان)، دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات dNTP (۱۰ میلی‌مولار) (ژنوبیوسایتس، آلمان) و آنزیم Taq پلی‌مراز (۵ واحد بر میکرولیتر) (ژنوبیوسایتس، آلمان) انجام شد. در این روش، چون از ۳ جفت پرایمر جهت شناسایی وارونگی‌های اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ و همچنین آلل نرمال استفاده می‌شود به همین دلیل برای

www.SID.ir

Archive of SID

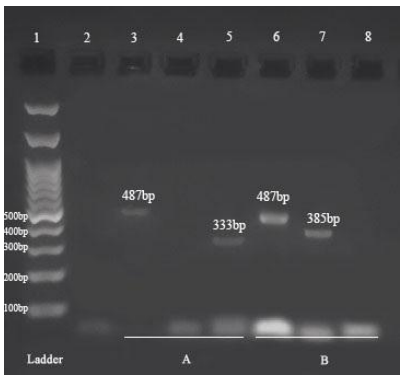
هر نمونه DNA، ۳ واکنش PCR در نظر گرفته شد. به این صورت که در یک واکنش جفت پرایمر ID و IU، در دومی جفت پرایمر ID و U۳ و در سومی جفت پرایمر ID و U۲ اضافه گردید. برنامه PCR مطابق با ۱ چرخه دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه، ۳۲ چرخه دمایی شامل؛ ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱:۲۰ دقیقه و در آخر یک چرخه دمایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر اجرا شد. پس از آن، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند و سپس توسط دستگاه ترانس ایلیمیناتور (UVP, Canada) از نظر وجود یا عدم وجود باندهای مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفتند و در نهایت از ژل مورد نظر عکسبرداری شد. در این مطالعه آنالیز داده‌های پژوهش از روش آمار توصیفی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ محاسبه شد.

یافته‌ها

در این تحقیق ۹ نفر از بستگان مونث بیماران دارای جهش های وارونگی اینترون ۲۲ با میانگین سنی ۳۴/۶۶ سال، شامل ۶ مادر و ۳ خواهر جهت تعیین وضعیت ناقل بودن برای جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ به روش IS-PCR مورد آنالیز قرار گرفتند. طبق نتایج از ۹ نفر مورد بررسی ۷ نفر ناقل جهش وارونگی اینترون ۲۲ و ۲ نفر غیر ناقل بودند. فراوانی ناقلین جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ در این بررسی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: فراوانی ناقلین جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع۲ در جمعیت مورد مطالعه

تعداد افراد	ناقل جهش وارونگی اینترون ۲۲		غیر ناقل
۹(۱۰۰٪)	۷(۷۷/۸٪)		۲ (۲۲/۲٪)
	وارونگی نوع۱	وارونگی نوع۲	
	۲(۲۸/۶٪)	۵(۷۱/۴٪)	



شکل۲: نتایج PCR نمونه‌های ناقلین دارای جهش هتروزیگوت وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲: ۱: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی ۲: نمونه کنترل منفی، A (۳،۴،۵): فرد ناقل وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱، B (۶،۷،۸): فرد ناقل وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۲.

نتایج باندهای تکثیرشده با استفاده از آزمایش IS-PCR بر روی ژل آگارز و تست تشخیص ناقلین جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ در شکل شماره ۲ نمایش داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود، برای نمونه‌ی هتروزیگوت وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱، دو باند ۴۸۷ جفت باز برای آلل نرمال و ۳۳۳ جفت باز برای آلل جهش یافته ایجاد شده است و همچنین برای نمونه هتروزیگوت وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۲، دو باند ۴۸۷ جفت باز برای آلل نرمال و ۳۸۵ جفت باز برای آلل جهش یافته ایجاد شده است.

بحث

بیماری هموفیلی A شایعترین اختلال خونریزی‌دهنده وابسته به کروموزوم X است. این اختلال را به سه فرم خفیف، متوسط و شدید تقسیم‌بندی می‌نمایند. از لحاظ پزشکی فرم شدید هموفیلی A اثرات بسیار مخاطره‌آمیزی را چه از نظر بهداشتی و چه از نظر اقتصادی و روانی برجامعه می‌گذارد (۲۰). تقریبا نیمی (۴۰-۵۰٪ گستره جهانی) از موارد هموفیلی A شدید توسط یک بازآرایی هومولوگی خود به خودی که در نتیجه باعث وارونگی اینترون ۲۲ در ژن فاکتور ۸ می‌شود رخ می‌دهد (۲۱). بنابراین از آن جا که وارونگی اینترون ۲۲ از مهم ترین نقاط داغ جهش در ژن فاکتور ۸ و علت نخستین هموفیلی A شدید می‌باشد، باید در وهله ی اول این موتاسیون در خانواده‌ها و بیماران مبتلا مورد بررسی قرار بگیرد (۲۲). تعیین افراد ناقل در خانواده‌های مبتلا به هموفیلی A نتایج مهمی (از قبیل شناسایی افرادی که نیاز به تشخیص قبل از تولد برای بیماری هموفیلی A دارند به منظور پیشگیری از تولد کودکان مبتلا و جلوگیری از گسترش بیماری) خواهد داشت. از آنجایی‌که برای تعیین وضعیت ناقلین هموفیلی A، روش آنالیز پیوستگی تنها در خانواده‌هایی با سابقه خانوادگی بیماری قابل انجام است در حالیکه ۳۰٪ از موارد هموفیلی A بدون سابقه خانوادگی هموفیلی ایجاد می‌شود و همچنین با توجه به اینکه دیگر روش‌های مولکولی ارزیابی ناقلین، مانند روش ساترن بلات و LD-PCR حساس و زمان بر بوده و نیاز به مهارت های تکنیکی بالایی دارد، لذا در این مطالعه از روش نوین IS-PCR جهت ارزیابی وضعیت ناقلین وارونگی‌های اینترون ۲۲ ژن فاکتور ۸ استفاده گردید (۹،۱۸،۲۳). با توجه به بررسی وضعیت ناقلین، مادر پسر مبتلا به هموفیلی A شانس حدودا ۸۰٪ را برای ناقل بودن دارد زمانیکه پسر او اولین فرد مبتلا در خانواده باشد و این شانس حتی بالاتر است (۹۸٪) زمانیکه فقط وارونگی اینترون ۲۲ در نظر گرفته شود (۲۴). در این مطالعه که بستگان مونث بیماران هموفیل A دارای وارونگی اینترون ۲۲ به روش IS-PCR مورد آنالیز قرار گرفتند، ۲ مورد فاقد جهش وارونگی اینترون ۲۲، ۲ نفر ناقل وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و ۵ نفر نیز ناقل وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۲ شناسایی شدند. طبق نتایج همه مادران بیماران دارای جهش وارونگی

www.SID.ir

Archive of SID

اینترون ۲۲ ناقل این جهش بودند و از سه خواهر مورد بررسی یک مورد ناقل جهش وارونگی اینترون ۲۲ بود. در مطالعه ای که توسط Tizzano و همکاران در سال ۱۹۹۵ در جمعیت اسپانیایی به انجام رسید مشاهده شد که همه‌ی مادران بیماران مبتلا به هموفیلی A دارای جهش وارونگی اینترون ۲۲، حامل آلل جهش یافته هستند. همچنین نشان داده شد که منشاء وارونگی اینترون ۲۲ در سلول-های زایای مذکر است (۲۵). در مطالعه Antonarakis و همکاران در سال ۱۹۹۵، داده‌های ۲۰۹۳ نمونه از سراسر آزمایشگاه های جهان جمع‌آوری گردید. داده های برگرفته از این مطالعه نشان داد که ٪۹۸ از تمام مادران بیماران دارای وارونگی اینترون ۲۲، حامل جهش بودند و تنها یک رویداد وارونگی نوپدید در سلول‌های سوماتیک مادری برای هر ۲۵ مادر از موارد تک گیر رخ داده بود. هنگامی که منشاء وارونگی اجدادی مادری در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، نسبت وقوع جهش نو پدید در سلول‌های زایای مرد: زن، ۱:۶۹ گزارش شد (۲۶). در مطالعه Oldenburg و همکاران در سال ۲۰۰۰ اولین نمونه از وارونگی اینترون ۲۲ که به صورت موزائیسم سوماتیک در یک زن وجود داشت گزارش شد که تنها حدود ٪۵۰ از لمفوسیت‌ها و سلول‌های فیبروبلاست او را تحت تاثیر قرار داده بود. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که جهش وارونگی اینترون ۲۲ به تقسیمات سلولی طی میوز محدود نمی‌باشد، و می‌تواند در طی تقسیمات سلولی میتوز، در پیش سازهای ژرم سل و یا در سلولهای سوماتیک نیز رخ دهد (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر در کشور آرژانتین که ۳۴ خانواده مبتلا به هموفیلی A شدید به روش ساترن بلات مورد بررسی قرار گرفتند نشان داده شد که تمام مادران بیماران با وارونگی اینترون ۲۲ حاملین هتروزیگوت می باشند (۲۸). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط Ilic و همکاران در صربستان انجام شد ۲۴ مادر برای وضعیت ناقل بودن وارونگی اینترون ۲۲ به روش IS-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند که از این تعداد تنها یک نفر ناقل جهش مورد نظر نبود و جهش وارونگی اینترون ۲۲ به صورت جهش نوپدید در فرزند او ایجاد شده بود (۲۹). در مطالعه حاضر با توجه به اینکه تمام مادران بیماران هموفیلی A دارای جهش وارونگی اینترون ۲۲، حامل آلل هتروزیگوت بودند، می‌توان نتیجه گرفت که در هیچ یک از بیماران، جهش وارونگی اینترون ۲۲ به شکل جهش نوپدید رخ نداده است و همه بیماران آلل جهش یافته را از مادر ناقل خود به ارث برده‌اند. در این مطالعه ما از روش IS-PCR به عنوان یک روش مبتنی بر PCR معکوس و طراحی شده به عنوان یک روش جایگزین برای ساترن بلات و LD-PCR به منظور تشخیص مولکولی جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ استفاده کردیم که طی این تحقیق جهش مورد نظر توسط تکنیک IS-PCR در خانواده‌های مبتلا به هموفیلی A استان قم مورد بررسی قرار گرفت و به طور کلی نشان داده شد که این تکنیک روشی سریع، قوی و قابل اعتماد به منظور تشخیص ناقلین جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ می‌باشد.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج حاصل از این تحقیق استفاده از تکنیک IS-PCR، به عنوان روشی ساده، سریع و مقرون به صرفه برای شناسایی ناقلین جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ در خانواده‌هایی با بیماری هموفیلی A امکان‌پذیر می‌باشد. همچنین با توجه به کارایی تکنیک IS-PCR در تشخیص‌های پیش از تولد نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند در این زمینه مورد استفاده قرار بگیرد.

قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد به شماره طرح ۱۳۶۳۰۵۰۳۹۳۱۰۰۶ مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران می‌باشد. بدینوسیله از کلیه همکاران محترم کانون هموفیل استان قم، پرسنل درمانگاه طباطبایی استان قم به ویژه جناب دکتر کمال اسحاق حسینی و همچنین کلیه پرسنل مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی استان قم به ویژه جناب آقای ناصر کلهر قدردانی می‌شود.

References

1. Tantawy A G. Molecular genetics of hemophilia A: Clinical perspectives. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2010; **11**(2): 105-114. doi: 10.1016/j.ejmhg.2010.10.005
2. Stonebraker J S, Bolton-Maggs P H, Soucie J M, Walker I, Brooker M. A study of variations in the reported haemophilia prevalence around the world. *Hemophilia* 2010; **16**: 20-32. doi: 10.1111/j.1365-2516.2009.02127.x
3. Pruthi R K. Hemophilia: a practical approach to genetic testing. *Mayo Clin Proc* 2010; **85**(11): 1485-1499. doi: 10.4065/80.11.1485
4. Bustamante-Aragones A, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Trujillo-Tiebas M J, Diego-Alvarez D, Vallespin E, et al. Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the foetuses of female carriers. *Haemophilia* 2008; **14**(3): 593-598. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01670.x
5. Pavlova A, Brondke H, Sebeck J, Pollmann H, Srivastava A, Oldenburg J. Molecular mechanisms underlying hemophilia A phenotype in seven females. *J Thromb Headmost* 2009; **7**(6): 976-982. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03346.x

www.SID.ir

Archive of SID

6. Sona P S, Lingam C M. Hemophilia-An overview. *IJPSRR* 2010; **5**(1): 18-26. doi: 10.1002/9781444318555.ch35
7. Ay C, Thom K, Abu-Hamdeh F, Horvath B, Quehenberger P, Male C, et al. Determinants of factor VIII plasma levels in carriers of haemophilia A and in control women. *Haemophilia* 2010; **16**(1): 111-117. doi: 10.1111/j.1365-2516.2009.02108.x
8. Plug I, Mauser-Bunschoten EP, Bröcker-Vriends AH, van Amstel H K, van der Bom J G, van Diemen-Homan J E, et al. Bleeding in carriers of hemophilia. *Blood* 2006; **108**(1): 52-56. doi: 10.1111/j.1365-2516.2011.02742.x
9. Lakich D, Kazazian H H, Antonarakis S E, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene is a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; **5**: 236-241. doi: 10.1038/ng1193-236
10. Thompson A R. Structure and function of the factor VIII gene and protein. *Semin Thromb Hemost* 2003; **29**(1): 11-22. doi: 10.1055/s-2003-37935
11. Andrikovics H, Klein I, Bors A, Nemes L, Marosi A, Varadi A, et al. Analysis of Large Structural Changes of The Factor VIII Gene, Involving Intron 1 and 22, in Severe Hemophilia A. *Haematologica* 2003; **88**: 778-784. doi: 10.1016/s0268-960x(07)70029-2
12. Payne A B, Miller C H, Kelly F M, Soucie J M, Hooper W C. The CDC Hemophilia A Mutation Project (CHAMP) Mutation List: a New Online Resource. *Human mutation* 2013; **34**(2): 2382-2391. doi: 10.1002/humu.22247
13. Bowen D J. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Molecular Pathology* 2002; **55**(2): 127-144. doi: 10.1136/mp.55.2.127
14. Karimipoor M, Zeinali S, Lak M, Safaee R. Carrier testing and prenatal diagnosis of haemophilia B by SSCP in an Iranian family. *Haemophilia* 2003; **9**(1): 116-118. doi: 10.1046/j.1365-2516.2003.00710.x
15. Renault N K, Dyack S, Dobson M J, Costa T, Lam W L, Greer W L. Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females. *Eur J Hum Genet* 2007; **15**(6): 628-637. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201799
16. Rossetti L C, Radic C P, Abelleyro M M, Larripa IB, De Brasi C D. Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from southern blot to inverse shifting-PCR. *Int J Mol Sci* 2011; **12**(10): 7271-7285. doi: 10.3390/ijms12107271
17. Rouzafzay N, Kokabi L, Zeinali C, Kiarimipour M. A study of intron 22 inversion type i and ii of coagulation factor 8 gene in patients with severe hemophilia a using IS-PCR technique. *Qom Univ Med Sci J* 2013; **7**(5): 28-34. [Full Text in Persian]
18. Bagnall R D, Giannelli F, Green PM. Int 22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost* 2006; **4**(3): 591-598. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01840.x
19. Rossetti L C, Radic C P, Larripa I B, De Brasi C D. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; **6**(5): 830-836. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.02926.x
20. Mustafa M, Moktar AY, Firdaus H, IIIzam EL, Nornazirah A, Sharifa AM. Hemophilia a Genetic Disorder: Diagnosis, Treatment and Prognosis. *IOSR-JDMS* 2016; **15**(10): 85-89. doi: 10.9790/0853-15100494101
21. Iqbal W, Raza M, Suleman khan M. Intron 22 inversions in severe Hemophiliacs. *AJMS* 2013; **3**(6): 190-196. doi: 10.1055/s-0037-1615084
22. Mantilla-Capacho J M, Beltrán-Miranda C P, Luna-Záizar H, Aguilar-López L, Esparza-Flores MA, López-Guido B, et al. Frequency of intron 1 and 22 inversions of Factor VIII gene in Mexican patients with severe hemophilia A. *Am J Hematol* 2007; **82**(4): 283-287. doi: 10.1002/ajh.20865
23. Price V E, Hawes S A, Chan A K. A practical approach to hemophilia care in children. *Pediatric Child Health* 2007; **12**(5): 381-383. doi: 10.1093/pch/12.5.381
24. Leuer M, Oldenburg J, Lavergne J M, Ludwig M, Fregin A, Eigel A, et al. Somatic mosaicism in hemophilia A: a fairly common event. *Am J Hum Genet* 2001; **69**(1): 75-87. doi: 10.1086/321285
25. Tizzano E F, Domènech M, Baiget M. Inversion of intron 22 in isolated cases of severe hemophilia A. *Thromb Haemost* 1995; **73**(1): 6-9. doi: 10.1055/s-0038-1651667
26. Antonarakis S E, Rossiter J P, Young M, Horst J, de Moerloose P, SommerS S, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995; **86**(6): 2206-2212. doi: 10.1093/hmg/3.7.1035
27. Oldenburg J, Rost S, El-Maarri O, Leuer M, Olek K, Müller C R, et al. De novo factor VIII gene intron 22 inversion in a female carrier presents as a somatic mosaicism. *Blood* 2000; **96**(8): 2905-2906. doi: 10.1007/978-3-642-59633-9_46
28. De Brasi C, Candela M, Cermelj M, Slavutsky I, Larripa I, Bianco R P, et al. Intron 22 factor VIII gene inversions in Argentine families with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2000; **6**(1): 21-22. doi: 10.1046/j.1365-2516.2000.00365.x
29. Ilic N, Krstic A, Kuzmanovic M, Micic D, Konstantinidis N, Guc-Scekic M. Identification of intron 1 and intron 22 inversions of factor VIII gene in Serbian patients with hemophilia A. *Genetika* 2013; **45**(1): 207-216. doi: 10.2298/gensr1301207i

www.SID.ir