

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 Bahrulolum¹ , Mehrdad Hashemi^{1*} , Alimuhammad Malekasgar²

¹Department of Genetics, School of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Department 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.

مقاله پژوهشی

شناسایی جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ ژن فاکتور ۸ در زنان ناقل هموفیلی A به روش-IS) (Inverse Shifting-PCR PCR)

حورا بحرالعلوم^۱، مهرداد هاشمی^{۱*}، علی محمد ملک عسگر^۲

^۱گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فن آوری نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
^۲گروه 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 - 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 ۴۵-۵۰٪ 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.
روش کار: 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 نوع ۲ استفاده شد.
یافته ها: 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.
نتیجه گیری: 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 نوع ۲ برای تشخیص ناقلین هموفیلی A می باشد.

کلید واژه ها: تشخیص هتروزیگوت، هموفیلی A، وارونگی کروموزوم، PCR.

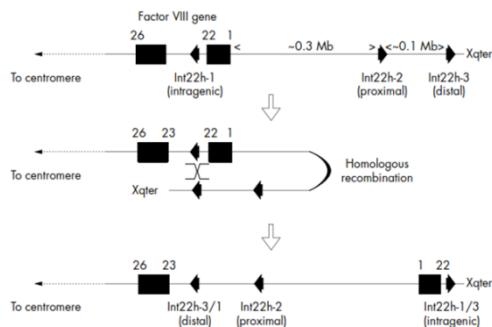
نحوه استناد به این مقاله: بحرالعلوم ح، هاشمی م، ملک عسگر ع. شناسایی جهش وارونگی اینترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ ژن فاکتور ۸ در زنان ناقل هموفیلی A به روش Inverse Shifting-PCR (IS-PCR). مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۶):۲۱-۲۷

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت 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.

مقدمه

دهد 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 می باشد که هر دو منجر به فنوتیپ هموفیلی A شدید می شود (۱۱) شکل ۱.



شکل ۱: وارونگی اینترون ۲۲ دیستال (نوع ۱) و پروکسیمال (نوع ۲) ژن فاکتور VIII (۱۳).

به دلیل مشکلات فراوانی که بیماری هموفیلی برای افراد مبتلا و خانواده های آن ها دارد و نیز هزینه های گزافی که این بیماری بر سیستم درمانی جامعه تحمیل می نماید و همچنین با توجه به اینکه فعلا درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد، تلاش های گسترده ای در سرتاسر جهان به منظور ابداع روش هایی برای شناسایی افراد ناقل بیماری و همچنین تشخیص پیش از تولد به منظور کنترل بیماری صورت می گیرد (۱۴). در گذشته، تجزیه و تحلیل شجرنامه ها و اندازه گیری سطوح فعالیت انعقادی فاکتور ۸ برای تشخیص ناقلین هموفیلی A استفاده می شد (۱۵). از طریق آنالیز شجرنامه، مشخص می شود 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 موتاسیون ها که وضعیت ناقلین را بصورت قطعی ارائه می کند تکامل یافت (۱۶). تست تشخیص ناقلین بوسیله آزمایش های ژنتیک مولکولی برای بسیاری از زنان در معرض خطر اگر واریانت بیماری را در خانواده آن ها شناسایی شده باشد، امکان پذیر است (۱). با توجه به اینکه حدود نیمی از موارد هموفیلی A شدید به علت وارونگی اینترون ۲۲ ژن فاکتور ۸ رخ می دهد معمولا در بررسی مولکولی این بیماری در خانواده های مبتلا ابتدا باید این جهش مورد ارزیابی قرار بگیرد (۱۷). روش های ارزیابی ژنتیکی وارونگی اینترون ۲۲ شامل؛ آنالیز ساترن بلات (توصیف شده توسط Lakich و همکاران در سال ۱۹۹۳)، روش LD-PCR (ارائه

بیماری هموفیلی A یک بیماری خونریزی دهنده مادرزادی وابسته به X مغلوب ناشی از کاهش فعالیت فاکتور VIII با شیوع ۱:۵۰۰۰ تا ۱:۱۰۰۰۰ نوزاد زنده ی پسر در سراسر جهان می باشد (۱،۲). مردان به علت داشتن یک کروموزم X با دریافت یک ژن معیوب به هموفیلی مبتلا می شوند، در حالیکه زنان با دریافت یک ژن معیوب شکل علامت دار بیماری را نشان نداده ولی به عنوان ناقلین نقش عمده ای در انتقال بیماری به فرزندان پسر خود ایفا می کنند. به این ترتیب ۵۰٪ پسران یک زن ناقل، بیمار و ۵۰٪ دختران وی حامل ژن معیوب خواهند بود (۳). در موارد فوق العاده نادری زنان ناقل ممکن است مبتلا به هموفیلی A باشند؛ به عنوان مثال، اگر در آن ها 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 (۱٪-۵٪) و خفیف (>۵٪) طبقه بندی می شود (۴). خونریزی های 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 می تواند خود به خود ایجاد شود (۶). انتظار می رود که زنان ناقل، میزان غلظت فاکتور ۸ موجود در پلاسما 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 می باشند (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 کیلو باز از DNA ژنومی را پوشانده و متشکل از ۲۵ اینترون و ۲۶ اگزون می باشد که یک زنجیره ی پلی پپتیدی پیش ساز ۲۳۵۱ اسید آمینه ای را رمز می کند که این زنجیره شامل یک پپتید سیگنال ۱۹ اسید آمینه ای و پروتئین بالغ ۲۳۳۲ اسید آمینه ای می باشد (۹-۱۱). از جمله اختلالات ژنتیکی که منجر به ایجاد هموفیلی A می شود می توان به حذف ها، وارونگی های ژنی و جهش های نقطه ای اشاره نمود (۱۲). در هموفیلی A شدید، ۴۰٪ از تمام جهش ها توسط وارونگی اینترون ۲۲ ایجاد می شود (۹). اینترون ۲۲ ژن فاکتور VIII حاوی یک ژن دوم (ژن A مرتبط با فاکتور VIII) است که در جهت مخالف فاکتور VIII رونویسی می شود. دو کپی دیگر از F8A در حدود ۵۰۰ کیلو باز بالادست (تلومریک) ژن فاکتور VIII وجود دارد که هر دو در همان جهت ژن فاکتور VIII رونویسی می شود. این ویژگی این امکان را می -

ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. در تکنیک IS-PCR از ۴ نوع پرایمر ۱U، ۲U، ۳U و ID برای بررسی وارونگی ایترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ استفاده شد. آغازگرهای IU/ID برای تکثیر آلل نرمال ایترون ۲۲ (۴۸۷ جفت باز)، آغازگرهای U/ID۳ برای تکثیر آلل وارونگی ایترون ۲۲ نوع ۱ (۳۳۳ جفت باز) و آغازگرهای U/ID۲، جهت تکثیر آلل وارونگی ایترون 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 ایترون ۲۲ ژن فاکتور ۸

نوع پرایمر	طول توالی	توالی پرایمر	NC_000023.9
1 D	۲۱	ACA TAC GGT TTA GTC ACA AGT	۶۰۸-۱۵۳۷۵۵۱۷
1 U	۲۰	CCT TTC AAC TCC ATC TCC AT	۵۰-۱۵۳۷۹۷۳۰
2 U	۲۰	ACG TGT CTT TTG GAG AAG TC	۹۵-۱۵۴۲۷۰۱۷۵
3 U	۲۲	CTC ACA TTG TGT TCT TGATGTC	۴۸-۱۵۴۳۳۴۲۶

در مرحله بعد به منظور تعیین ناقلین جهش وارونگی ایترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ 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 محدودالتر 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 بیوساینس، 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 پلیمرز به همراه معرف‌های لازم برای واکنش PCR شامل؛ بفر (۱۰X) (ژنو بیوساینس، آلمان)، MgCl۲ (۲۵ میلی‌مولار) (ژنو بیوساینس، آلمان)، دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات dNTP (۱۰ میلی‌مولار) (ژنوبیوساینس، آلمان) و آنزیم Taq پلی‌مراز (۵ واحد بر میکرولیتر) (ژنوبیوساینس، آلمان) انجام شد. در این روش، چون از ۳ جفت پرایمر جهت شناسایی وارونگی‌های ایترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ و همچنین آلل نرمال استفاده می‌شود به همین دلیل برای

شده توسط Bagnall و همکاران در سال ۲۰۰۶) و تکنیک IS-PCR توصیف شده توسط Rossetti و همکاران در سال ۲۰۰۸ می‌باشند (۹، ۱۸-۱۹). روش ساترن بلات قادر به ارزیابی نیمه کمی از حاملین موزائیسیم 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 آرایه‌های مرتبط با ایترون ۲۲ مانند وارونگی، حذف‌های بزرگ، مضاعف شدگی، واردشدگی و جابه‌جایی را مورد ارزیابی قرار دهد (۱۴). همچنین این روش قادر به ارزیابی ناقلین وارونگی ایترون ۲۲ می‌باشد و برای تشخیص‌های پیش از تولد هموفیلی نیز کاربرد دارد (۱۹). هدف از مطالعه حاضر شناسایی ناقلین جهش وارونگی ایترون ۲۲ نوع ۱ و نوع ۲ به روش نوین IS-PCR می‌باشد.

روش کار

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 ایترون 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 مودی 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 فالتون 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

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 بر جامعه می‌گذارد (۲۰). تقریباً نیمی (۴۰-۵۰٪) گستره جهانی از موارد هموفیلی A شدید توسط یک بازآرایی همولوگی 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 آنجایی که 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 مهارت‌های 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 حدوداً 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

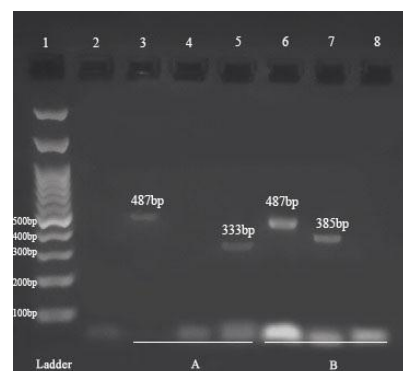
هر نمونه DNA، ۳ واکنش PCR در نظر گرفته شد. به این صورت که در یک واکنش جفت پرایمر ID و IU، در دومی جفت پرایمر ID و U۳ و در سومی جفت پرایمر ID و U۲ اضافه گردید. برنامه PCR مطابق با ۱ چرخه دمایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه، ۳۲ چرخه دمایی شامل؛ ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد به 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 نوع ۲ در جمعیت مورد مطالعه

تعداد افراد	ناقل جهش وارونگی اینترون ۲۲	غیر ناقل
۹ (۱۰۰٪)	۷ (۷۷/۸٪)	۲ (۲۲/۲٪)
	وارونگی نوع ۱ ۲ (۲۸/۶٪)	وارونگی نوع ۲ ۵ (۷۱/۴٪)



شکل ۲: 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.

تمام مادران بیماران هموفیلی A دارای جهش وارونگی ایترون ۲۲، حامل آلل هتروزیگوت بودند، می‌توان نتیجه گرفت که در هیچ یک از بیماران، جهش وارونگی ایترون 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 ایترون 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 ایترون 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 ایترون 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.

ایترون ۲۲ ناقل این جهش بودند و از سه خواهر مورد بررسی یک مورد ناقل جهش وارونگی ایترون 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 ایترون ۲۲، حامل آلل جهش یافته هستند. همچنین نشان داده شد که منشاء وارونگی ایترون ۲۲ در سلول-های زایای مذکر است (۲۵). در مطالعه Antonarakis و همکاران در سال ۱۹۹۵، داده‌های ۲۰۹۳ نمونه از سراسر آزمایشگاه‌های جهان جمع‌آوری گردید. داده‌های برگرفته از این مطالعه نشان داد که ۹۸٪ از تمام مادران بیماران دارای وارونگی ایترون 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 ایترون ۲۲ که به صورت موزائیکس 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 ایترون 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 ایترون ۲۲ حاملین هتروزیگوت می‌باشند (۲۸). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط Ilic و همکاران در صربستان انجام شد ۲۴ مادر برای وضعیت ناقل بودن وارونگی ایترون ۲۲ به روش IS-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند که از این تعداد تنها یک نفر ناقل جهش مورد نظر نبود و جهش وارونگی ایترون ۲۲ به صورت جهش نوپدید در فرزند او ایجاد شده بود (۲۹). در مطالعه حاضر با توجه به اینکه

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

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. Karimipour M, Zeinali S, Lak M, Safaei 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, Abelleiro 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, Izzam 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, Sommer S 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