بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم نرمین مکاری زاده رشته بیوشیمی بالینی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان : تعیین غیرتهاجمی جنسیت جنین از نمونه خون مادران باردار ناقل هموفیلی با استفاده از Real-time PCR در تاریخ ۱۳۹۰/۴/۴ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پـذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر سید علیرضا مصباح نمین	(استاد راهنما)	
دکترابوالفضل مهدی زاده	(استاد مشاور)	
دکتر مجید صادقی زاده	(استاد ناظر)	
دکتر محمد تقی خانی	(استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب نسرمین مکاریزاده دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۷ مقطع کارشناسی‌ارشد دانشکده علوم پزشکی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۹۰/۴/۱۴

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیوشیمی‌بالینی است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر سید علیرضا مصباح نمین، مشاوره دکتر ابوالفضل مهدی‌زاده از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ٥ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب نرمین مکاریزاده دانشجوی رشته بیوشیمی بالینی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی نرمین مکاریزاده

تاریخ و امضا ۹۵/٤/۱٤

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

تعیین غیر تهاجمی جنسیت جنین از نمونه‌ی خون مادران باردارناقل هموفیلی با استفاده از Real-time PCR

نگارش

نرمین مکاریزاده

استاد راهنما

دکتر سید علیرضا مصباح نمین

استاد مشاور

دکتر ابوالفضل مهدی‌زاده

۱۳۹۰

تقدیم به:

استاد گرامیم،

که مظهر علم، ادب و تقوی است

پدر و مادرم،

که شمع وجودشان راه زندگیم را روشن ساخت و توان در گامهایم و اراده و پشتکار در قلبم قرار داد

تمام مادران باردار و بیماران هموفیلی،

که در امر پیشگیری و درمان بیماری، چشم به آینده ای روشن دوخته اند

سپاسگزارم از:

استاد راهنمای ارجمند آقای دکتر سید علیرضا مصباح نمین که بار، نمونه‌های ارزشمند و نظرات تخصصی خود با صبر و حوصله راه را برای من هموار کرده و بسیاری از آموخته‌هایم را مدیون ایشان، هستم.

جناب آقای دکتر فریدرون اعلا و مهندس علی اکبر چوپان که با فراهم نمودن محیط مناسب، دستگاه‌ها و تجهیزات مورد نیاز و نمونه‌های خون ما را در انجام و پایان این کار تحقیقاتی بسیار یاری نمودند و نهایت سپاس و قدردانی از ایشان را دارم.

استاد مشاورم آقای دکتر مهدی زاده که مشاوره ی اینجانب را برای این پایان نامه بر عهده داشتند.

کلیه پرسنل آزمایشگاه ژنتیک مرکز درمان جذامیان و همتوفیلی ایران از جمله خانم شیرین روانبد، مریم رسول زادگان و فرزانه نصیری که در مراحل مختلف پایان نامه بسیار کمکم نمودند.

چکیده

کشف DNA جنینی در خون مادر در سال ۱۹۹۷ امکان‌های جدیدی برای تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد فراهم و زمینه‌ی مهمی از مطالعات را در تشخیص ژنتیکی قبل از تولد به خود اختصاص داده است. یک کاربرد احتمالی آن تعیین جنسیت جنین برای زوج‌های در معرض ریسک بیماری‌های وابسته به X مانند بیماری هموفیلی است. تشخیص معمول جنسیت جنین در سه ماهه‌ی اول بارداری هم اکنون بر پایه‌ی شیوه‌های تهاجمی است که ممکن است دارای ریسک ۲-۱٪ سقط جنین باشند. هدف از این مطالعه بررسی حساسیت و ویژگی تعیین جنسیت جنین بوسیله آنالیز Real-time PCR با استفاده از سایبرگرین، در سه ماهه‌ی اول بارداری بوده است. DNA آزاد جنینی اساسا به صورت قطعاتی با طول کمتر از ۵۰۰bp در جریان خون مادری گردش می‌کند. قطعه قطعه بودن DNA آزاد جنینی و غلظت بسیار کم آن (۶-۳٪) در زمینه‌ی زیادی از DNA آزاد مادری (۹۷-۹۴٪)، از اصلی‌ترین مشکلات آشکار کردن DNA جنینی در گردش خون مادری هستند. برای از بین بردن این موانع و تشخیص حساس و ویژه‌ی جنسیت جنین در این پژوهش، یک روش جدید Real-Time PCR به صورت داپلکس برای ژن تعیین کننده‌ی جنسیت روی کروموزوم Y (SRY) توسعه داده شد. در ۲۳ نمونه سرم و پلاسمای مادران باردار ناقل بیماری هموفیلی A (۱۵ نمونه سرم و ۸ نمونه پلاسما) که مورد آنالیز Duplex Real-Time PCR بر روی DNA قرار گرفتند، جنسیت جنین تمام نمونه‌های سرم مادران باردار و در تعداد محدودی از نمونه‌های تازه‌ی پلاسما، در مقایسه با نتایج حاصل از CVS، با حساسیت ۱۰۰٪ آشکار گردید. این مطالعه نشان داد که از طریق این روش ویژه Real-time PCR بدون استفاده از پروب، تعیین غیر تهاجمی جنسیت جنین در نمونه‌های تازه سرم و پلاسمای مادران باردار، به ویژه سرم امکان پذیر است و می‌توان از شیوه‌های تهاجمی تشخیص قبل تولد و ریسک سقط جنین برای جنین‌های ماده جلوگیری کرد، منتهی در یک شرایط کنترل شده و استریل باید این کار انجام شود.

کلمات کلیدی: تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد، DNA آزاد جنینی، Real-Time PCR

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده ۱
۱-۱. مقدمه ۲
۱-۲. تشخیص و طبقه بندی هموفیلی ٤
۱-۲-۱. بررسی‌های کلیدی در تشخیص هموفیلی A ۵
۱-۲-۱-۱. تمایز هموفیلی A از بیماری فون ویلبراند ۵
۱-۲-۲. بررسی‌های کلیدی در تشخیص هموفیلی B ٦
۱-۳. هموستاز و نقش فاکتورهای ۸ و ۹ ..... ٦
۱-٤. علائم بالینی بیماری هموفیلی ۸
۱-۵. کنترل بیماری ۹
۱-۵-۱. عوارض درمان جایگزینی با فاکتورهای انعقادی ۱۰
۱-٦. تشخیص ژنتیکی بیماری هموفیلی ۱۲
۱-٦-۱. روش‌های تشخیص ژنتیکی ۱۲
۱-٦-۱-۱. تعیین مستقیم جهش در ژن فاکتور ۸ ..... ۱۲
۱-٦-۲. تعیین حاملین بیماری ۱۵
۱-٦-۲-۱. لیونیزیشن یا غیر فعال شدن کروموزوم X ۱۵
۱-٦-۲-۱-۱. غیر فعال شدن انحرافی کروموزومX ۱٦
۱-۷. تشخیص قبل از تولد ۱۷
۱-۸. DNA آزاد جنینی ۱۷
۱-۹. آشکارسازی DNA آزاد جنینی ۱۹
۱-۱۰. مارکرهای عمومی جنینی ۲۱
۱-۱۱. کاربردهای بالینی ۲۳
۱-۱۱-۱. تعیین جنسیت ۲۵
۱-۱۲. Real-Time PCR ۲٦

۱-۱۲-۱. تعریف و مفهوم Real-Time PCR ۲۶
۱-۱۲-۲. مزایای روش Real-Time PCR ۲۶
۱-۱۲-۳. روش‌های سنجش با Real-Time PCR ۲۷
۱-۱۲-۳-۱. Non specific format ۲۷
۱-۱۲-۳-۱-۱. آنالیز منحنی ذوب ۲۸
۱-۱۳. مشکلات تشخیص قبل از تولد توسط راه‌های تهاجمی ۳۰
۱-۱٤. مروری بر مطالعات انجام شده ۳۱
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳٦
۲-۱. جمع آوری نمونه‌های خون ۳۷
۲-۲. انجام مرحله‌ی Pilot Study برای بهینه سازی روش‌های تعیین جنسیت ۳۷
۲-۳. استخراج DNA از خون تام نمونه‌های کنترل ۳۸
۲-٤. استخراج DNA از نمونه‌های سرم و پلاسمای مادران باردار ناقل هموفیلی ٤۰
۲-۵. بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده ٤۳
۲-۵-۱. بررسی کمی DNA ٤۳
۲-۵-۲. بررسی کیفی DNA ٤۳
۲-٦. انتخاب پرایمرها ٤۵
۲-۷. آماده سازی پرایمرها و رساندن به غلظت مورد نیاز ٤۷
۲-۸. انجام PCR معمولی بر روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی ٤۷
۲-۹. انجام PCR معمولی به صورت دوتائی (داپلکس) بر روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی ۵۰
۲-۱۰. الکتروفورز محصولات PCR ۵۱
۲-۱۱. Real-Time PCR ۵۱
۲-۱۱-۱. دستگاه Light cycler ۵۱
۲-۱۲. بهینه سازی واکنش PCR برای آنالیز Real-Time PCR ۵٤
۲-۱۲-۱. مواد و وسایل لازم برای آنالیز Real-Time در حالت استفاده از مواد تهیه شده از شرکت‌های مختلف، بدون کیت مشخص ۵۵
۲-۱۲-۲. مواد و وسایل لازم برای آنالیز Real-Time در حالت استفاده از کیت ۵۷

۲-۱۳. بررسی حساسیت سنجش Real-Time PCR برای ژن SRY ٦٠
۲-۱٤. استفاده از PCR Product برای آنالیز Real-Time PCR ٦١

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ٦٢
۳-۱. نتایج حاصل از استخراج DNA نمونه‌های کنترل ٦٣
۳-۲. نتایج حاصل از انجام PCR معمولی بر روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی ٦٥
۳-۳. نتایج حاصل از انجام PCR معمولی به صورت داپلکس بر روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی ... ٦٩
۳-٤. نتایج حاصل از انجام Real-Time PCR ٧٠
۳-٥. نتایج حاصل از استفاده از PCR Product برای آنالیز Real-Time PCR ٧٩

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ٨٤
٤-۱. بحث و نتیجه‌گیری ٨٥
٤-۲. پیشنهادها ٩٥
فهرست منابع ٩٧
چکیده انگلیسی ١٠٧

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول۱-۱. میزان شیوع مهارکننده‌ی فاکتور ۸ با توجه به نوع جهش ۱۱
جدول ۱-۲. خلاصه‌ای از توالی‌های اسید نوکلئیکی که در خون مادر برای اهداف تشخیص غیرتهـاجمی قبل از تولد، آشکار شده‌اند ۲٤
جدول ۲-۱. محتوای کیت استخراج High Pure PCR Templat Preparation Kit ٤۰
جدول ۲-۲. مواد تشکیل دهنده مخلوط واکنش PCR معمولی ٤۸
جدول ۲-۳. مواد تشکیل دهنده‌ی مخلوط واکنش PCR معمولی به صورت داپلکس ۵۰
جدول ۲-٤. طول موج کانال‌های نشر و آشکارسازی در دستگاه Light Cycler ۵٤
جدول ۲- ٤. مواد تشکیل دهنده‌ی مخلوط Real-Time PCR ۵٦
جدول ۲-۵. مواد تشکیل دهنده‌ی مخلوط Real-Time PCR در حالت استفاده از کیت ۵۷
جدول ۳-۱. جذب محصول استخراج شده در طول موج های ۲٦۰ nm و ۲۸۰ ..... ٦٤

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار ۳-۱. منحنی‌های تکثیر (الف) و دمای ذوب (ب) ژن SRY بر روی نمونه کنترل مثبت با استفاده از جفت اول پرایمرهای SRY..... ۷۱
نمودار ۳-۲. منحنی‌های تکثیر و دمای ذوب ژن بتا اکتین بر روی نمونه‌ی کنترل مثبت ۷۲
نمودار ۳-۳. منحنی‌های تکثیر و دمای ذوب ژن بتا اکتین بر روی نمونه های DNA استخراج شده از سرم خانم‌های باردار..... ۷۳
نمودار ۳-٤. منحنی‌های تکثیر و دمای ذوب ژنSRY روی نمونه‌ی DNA استخراج شده از سرم خانم باردار حامل جنین پسر در هفته ۱۰ و ۱۲ بارداری با استفاده از جفت اول پرایمرهای SRY..... ۷٤
جدول ۳-۲. نتایج حاصل از انجام Real-Time PCR بدون استفاده از کیت ۷۵
نمودار ۳-۵. منحنی‌های تکثیر و دمای ذوب ژنSRY روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی با استفاده از جفت اول پرایمرهای SRY. ۷٦
نمودار ۳-٦. نتایج حاصل ازبررسی حساسیت سنجش Real-Time PCR برای ژن SRY با استفاده از جفت دوم پرایمرهای SRY. ۷۷
نمودار ۳-۷. منحنی‌های تکثیر و دمای ذوب ژنSRY روی نمونه‌ی DNA استخراج شده از سرم دو خانم باردار حامل جنین پسر در هفته ۱۲ و ۱۳ بارداری با استفاده از جفت دوم پرایمرهای SRY ۷۸
نمودار ۳-۸. منحنی‌های تکثیر و دمای ذوب ژنSRY روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی به صورت داپلکس با استفاده از دو جفت پرایمرهای SRY. ۷۹
شکل ۳-۷. الکتروفورز محصولات Real-time PCR نمونه‌های کنترل مثبت و منفی به صورت داپلکس با استفاده از دو جفت پرایمرهای SRY ۸۰
نمودار ۳-۹. منحنی‌های تکثیر و دمای ذوب ژنSRY روی نمونه‌های جنینی پسر و دختر به صورت داپلکس با استفاده از دو جفت پرایمرهای SRY ۸۱
نمودار ۳-۱۰. منحنی‌های تکثیر و دمای ذوب ژنSRY روی ۱۷ نمونه جنینی فریز شده (۱۰ دختر، ۵ پسر و دو نمونه با جنسیت نامشخص) به صورت داپلکس با استفاده از دو جفت پرایمرهای SRY. ۸۲

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱. وراثت هموفیلی ٤
شکل ۱- ۲. استراتژی تعیین جهش در ژن فاکتور ۸ ..... ١٤
شکل ۱-۳. مکانیسم عملکرد سایبرگرین ٢٨
شکل۲-۱. جز سایکلر دستگاه Light cycler ٥٣
شکل ۲-۲. جز فلوریمتر دستگاه Light cycler ٥٤
شکل ۳-۱. مشاهده DNA استخراج شده نمونه‌های کنترل بر روی ژل ۰.۸ درصد آگارز ٦٤
شکل ۳-۲. الکتروفورز محصولات PCR به صورت گرادیان برای جفت اول پرایمرهای SRY ٦٥
شکل ۳-۳. الکتروفورز محصولات PCR به صورت گرادیان برای جفت دوم پرایمرهای SRY ٦٦
شکل ۳-٤. الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از جفت اول پرایمرهای SRY ٦٨
شکل ۳-٥. الکتروفورز محصولات PCR ژن بتا اکتین به صورت گرادیان ٦٩
شکل ۳-٦. الکتروفورز محصولات PCR به صورت داپلکس با استفاده از دو جفت پرایمرهای SRY ... ٧٠
شکل ۳-۷. الکتروفورز محصولات Real-time PCR نمونه‌های کنترل مثبت و منفی به صورت داپلکس با استفاده از دو جفت پرایمرهای SRY ٨٠

فصل اول

مقدمه و مروری بر

مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

بیماری هموفیلی، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های انعقادی ژنتیکی و وابسته به جنس بوده که با خونریزی غیرکنترل‌شونده و اغلب تهدیدکننده، مشخص می‌شود. از سال۱۹۵۲ بیماری هموفیلی به دو اختلال مجزا، هموفیلیA یا هموفیلی کلاسیک (ناشی از اختلال در سنتز فاکتور ۸) و هموفیلی B یا بیماری کریسمس (ناشی از اختلال در سنتز فاکتور ۹) تفکیک شد [۱]. میزان شیوع هموفیلی A، ۱ در هر ۱۰۰۰۰-۵۰۰۰ مرد است، هموفیلی B نسبتا نادر است و میزان شیوع آن ۱ در هر ۵۰۰۰۰-۳۰۰۰۰ مرد است [۲و۳]. کثرت وقوع هموفیلی A به علت وراثت وابسته به جنس و سرعت جهش زیاد ژن فاکتور ۸ انعقادی (2.5×10^{-5}-4.2×10^{-5}) است [۴]. جالب است که این جهش‌ها در سلول‌های جنسی افراد مذکر، به میزان 3.6 برابر سلول‌های افراد مونث توسعه می‌یابند، هر چند بسته به نوع جهش، فراوانی جهش در هر جنس متفاوت است [۵]. اما نوع دیگری از هموفیلی وجود دارد به نام هموفیلی C، به میزان ۳-۱ درصد از کل بیماران هموفیلی را شامل می‌شود که مرتبط با نقص فاکتور XI است و به طور اتوزومی به ارث می‌رسد [۶].

به دلیل مشکلات فراوانی که این بیماری برای افراد مبتلا و خانواده‌های آن‌ها دارد و نیز هزینه‌های گزافی که این بیماری بر سیستم درمانی جامعه تحمیل می‌نماید، تلاش‌های گسترده‌ای در سرتاسر جهان برای تعیین جهش‌های ایجاد کننده‌ی بیماری و نیز ابداع روش‌هایی برای شناسایی افراد حامل بیماری و همچنین تشخیص قبل از تولد به منظور کنترل بیماری صورت می‌گیرد. بر طبق بررسی‌های فدراسیون

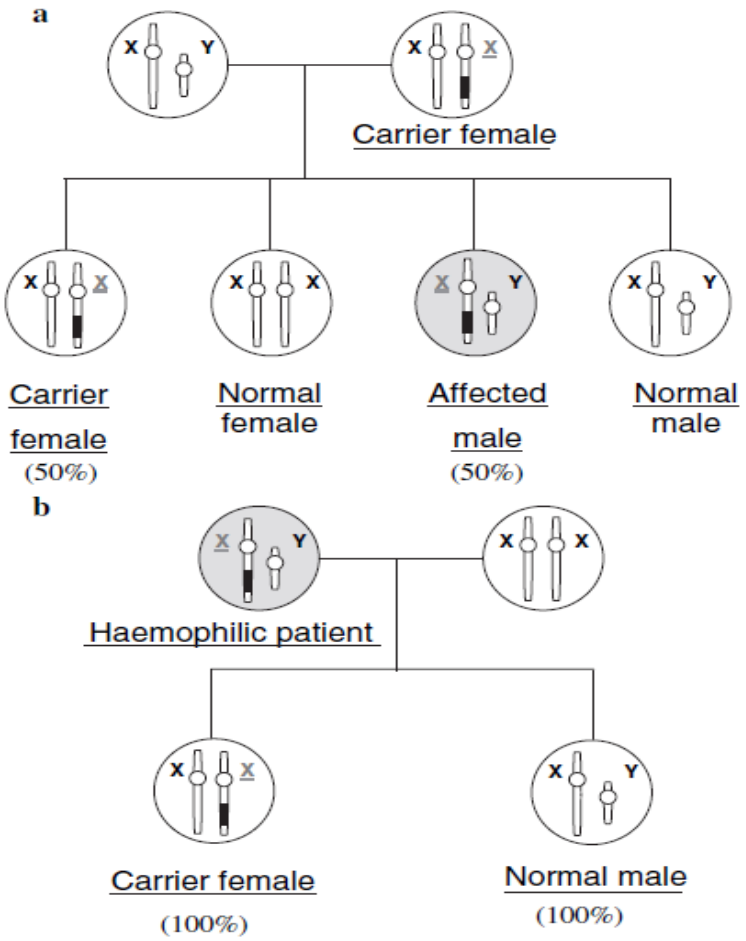
جهانی هموفیلی، ایران به عنوان دومین کشور از لحاظ تعداد افراد هموفیلی در ناحیه‌ی مدیترانه شرقی شناخته شده است [۷،۸].

فرزندان پسر زنان حامل یک بیماری وابسته به x، دارای شانس ۵۰ درصدی ابتلا به بیماری هستند. فرزندان دختر در اکثر شرایط، بیماری را آشکار نخواهند کرد اما دارای ریسک ۵۰ درصدی حامل بودن آن بیماری هستند (شکل ۱-a۱). مردان هموفیل نمی‌توانند بیماری را به زاده‌های پسر منتقل کنند در حالی که همه‌ی زاده‌های دختر حاملین ضروری آن بیماری خواهند بود (شکل ۱-b۱). درموارد بسیار نادر، زاده‌های یک مرد هموفیل و یک زن حامل، یک پسر هموفیل خواهد بود [9]. بنابراین اولین قدم در تشخیص قبل از تولد بیماری هموفیلی، تعیین جنسیت جنین است، اگر جنین ماده باشد بررسی‌های بیشتر مورد نیاز نیست اما در مورد جنین نر، آنالیزهای بعدی DNA مورد نیاز است [۱۰].

کشف DNA آزاد جنینی در خون مادر در سال ۱۹۹۷، با آشکار کردن توالی‌های ویژه‌ی کروموزوم Y در پلاسمای زنان باردار حامل جنین نر امکان‌های جدیدی برای تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد فراهم آورده است. یک کاربرد احتمالی آن تعیین جنسیت جنین برای زوج‌های در معرض ریسک بیماری‌های وابسته به X است. در این پژوهش از مادران ناقل هموفیلی نمونه برداری شد و با استفاده از روش پیشرفته مولکولی PCR از نوع Real-time PCR و تکثیر قطعه‌ای از ژن تعیین کننده‌ی جنسیت روی کروموزوم y (SRY)[۱] از نمونه‌های DNA استخراج شده از پلاسما و سرم مادران باردار، جنسیت جنین به طریق غیر تهاجمی تعیین گردید و زمینه‌ی مناسبی برای پایه گذاری تشخیص غیر تهاجمی قبل از تولد بیماری‌های ژنتیکی در ایران، فراهم آورد.

۱.sex-determining gene on the Y chromosome

با توجه به این که هنوز هم در کشور ما، روش‌های تهاجمی در مورد زنان ناقل هموفیلی که در ریسک بالایی از وجود جنین نر هموفیلی، قرار دارند استفاده می‌شود امید است این مطالعه، گام موثری را در به کارگیری این روش‌های جدید برداشته باشد.



شکل ۱-۱. وراثت هموفیلی

۱-۲. تشخیص و طبقه بندی هموفیلی

تشخیص هموفیلی A و B بر اساس فعالیت فاکتور ۸ و ۹ تثبیت می‌شود و بر پایه‌ی سطح فعالیت فاکتور (FIX، FVIII:C) در پلاسما طبقه‌بندی می‌شود که افراد هموفیلی شدید دارای سطح فعالیت 0.01>

iu/dl[1] (کمتر از یک درصد)؛ هموفیلی متوسط دارای سطح فعالیت iu/dl 0.01-0.05 (۵-۱ درصد)؛ و هموفیلی ملایم دارای سطح فعالیت iu/dl 0.40> - 0.05< (40%> - 5%<) هستند [۱۱].

۱-۲-۱. بررسی‌های کلیدی در تشخیص هموفیلی A

- فاکتور ۸ یک پروتئین ناپایدار است؛ بنابراین سنجش‌های فعالیت فاکتور ۸ بهتر است در نمونه‌های تازه‌ی پلاسما انجام شود. در صورت عملی نبودن، یخ زدن سریع نمونه‌ها در 20°C– توصیه شده است؛ به هر حال این ممکن است منجر به از دست رفتن ۲۰-۱۰ درصدی فعالیت فاکتور ۸ شود. بنابراین کاهش کم یا متوسط فعالیت فاکتور ۸ باید با یک نمونه‌ی تازه‌ی پلاسما باز بینی شود.
- فاکتور فون ویلبراند (vWF)[2] یک پروتئین حامل برای فاکتور ۸ است؛ بنابراین سنجش vWF در مواقعی که فعالیت فاکتور ۸ کاهش نشان می‌دهد باید انجام شود.
- نمونه‌ی خون برای سنجش فعالیت فاکتور ۸، معمولا در لوله‌های حاوی سیترات که به Ca^{+2} متصل می‌شود جمع آوری می‌شود. حجم ضدانعقاد باید برای نمونه‌های با سطح زیاد یا کم هماتوکریت متعادل شود تا تخمین درستی از فعالیت فاکتور ۸ فراهم شود. معمولا کودکان تازه به دنیا آمده، دارای سطح زیاد هماتوکریت (حجم کم پلاسما) در نمونه‌ی خون بند ناف هستند که ممکن است باعث تخمین کم فعالیت فاکتور شود [۱۲].

۱-۲-۱-۱. تمایز هموفیلی A از بیماری فون ویلبراند

الگوی متفاوت وراثت این دو بیماری، نیاز حیاتی به مشورت ژنتیکی برای تشخیص هموفیلی A از بیماری فون ویلبراند را آشکار می‌کند. اثر تثبیت کننده‌ی vWF روی فاکتور ۸ در پلاسما با کاهش برجسته‌ی فاکتور ۸ (در حدود ۳٪ نرمال) در بیماران دارای نقص کامل vWF آشکار می‌شود

۱. international unit per deciliter
۲.Von Willebrand Factor