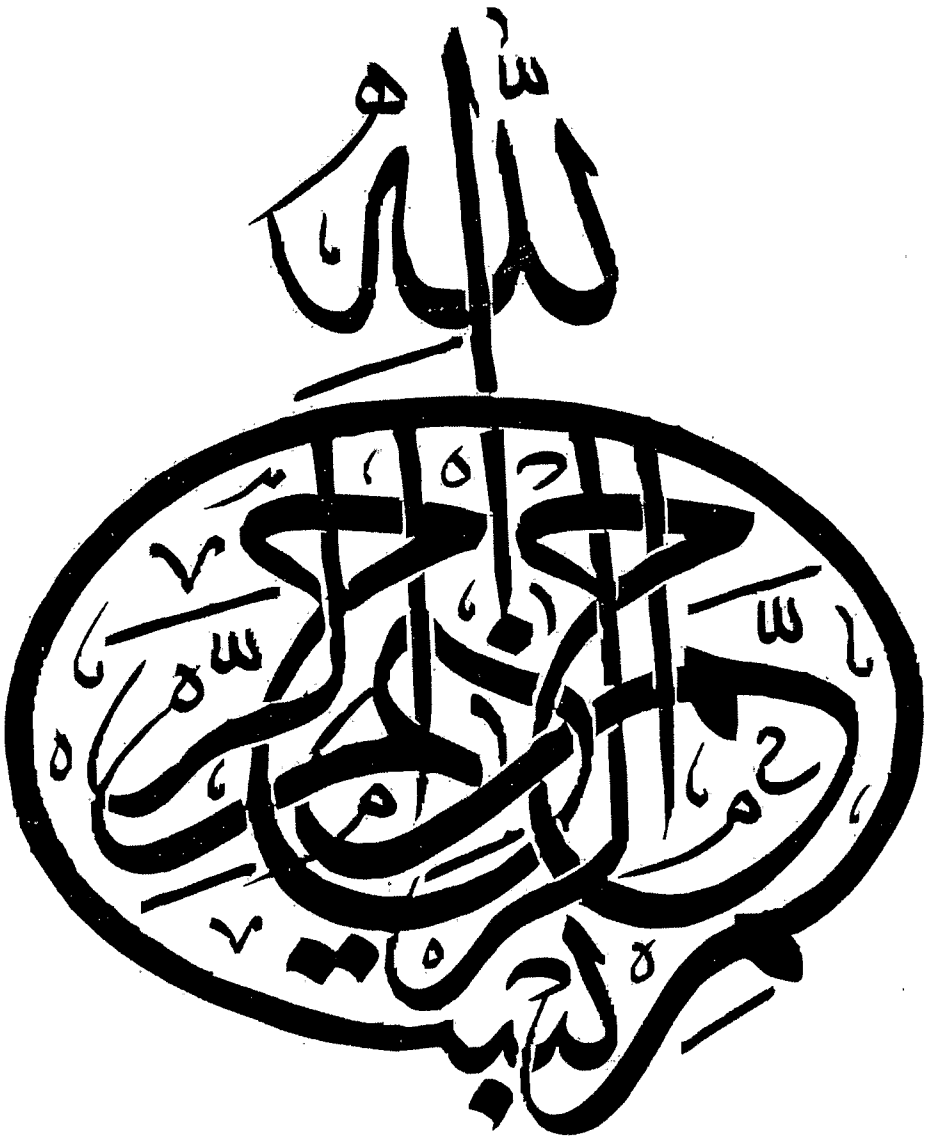


١٠٣٤٦١

# سازمان انتقال خون ایران

مرکز تحقیقات

بسم الله الرحمن الرحیم

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد

هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون

عنوان:

جداسازی،کلونینگ وبیان فاکتورVII نوترکیب انسانی در رده سلولی CHO

**Isolation,cloning and Expression of Recombinant human factor VII in CHO Cell Line**


ا ستاد راهنما:

دکتر مهریار حبیبی رودکنار

استاد مشاور:

دکتر ناصر امیری زاده

نگارنده:

ناصر شاگردی اسماعیلی


شهریور۱۳۸۷


۱۳۸۷/۹/۲۳

۱۰۳۶۱

تقدیم به همسر فداکار و مهربانم

تشکر و قدردانی:

خداوند متعال را شاکریم که یکبار دیگر توفیق انجام کوششی مفید را در جهت اعتلای دانش و پیشرفت علم به ما داد.

در این راه پر پیچ و خم انسانهای خالص و بی آلایش بسیاری با فداکاری و بدون چشم داشت فانوس راه این حقیر شدند و با راهنمائی های روشنگر خود شکیبائی و امید را آموختند.

در اینجا جا دارد از همه این عزیزان تشکر و قدر دانی نمایم و امیدوارم خداوند منان برای ایشان طول عمر با عزت عطا نماید.

معاونت آموزشی پژوهشی محترم جناب آقای دکتر قره باغیان

استاد بسیار عزیز و گرامی ام جناب آقای دکتر حبیبی

استاد محترم جناب آقای دکتر امیری زاده

پرسنل محترم مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

سرکار خانم حلبیان

سرکار خانم داننده

همکاران محترم کتابخانه: سرکار خانمها دهقان و مختاری

# فهرست مطالب


| | |
|---|---|
| چکیده پژوهش | ۵ |
| ۱- دلایل انتخاب موضوع | ۶ |
| ۱-۱ هموفیلی | ۶ |
| ۱-۲ تاریخچه بیماری | ۸ |
| ۱-۳ پاتوژنز | ۱۰ |
| ۱-۴ درمان و محدودیتهای آن | ۱۲ |
| ۲- بیان مسئله | ۱۴ |
| ۲-۱ فاکتورهای انعقادی | ۱۴ |
| ۲-۲ فیزیولوژی روند آبشار انعقادی | ۲۱ |
| ۲-۲-۱ نقش سلولهای اندوتلیال در دستگاه انعقاد خون | ۲۲ |
| ۲-۲-۲ نقش پلاکتها در روند انعقاد | ۲۲ |
| ۲-۳ روند آبشار انعقاد در مسیر درونی | ۲۳ |
| ۲-۴روند آبشار انعقاد در مسیر بیرونی | ۲۶ |
| ۳- بازنگری اطلاعات و منابع موجود | ۳۱ |
| ۳-۱ کلونینگ (همسانه سازی) | ۳۱ |
| ۳-۱-۱ حامل های کلونینگ | ۳۴ |
| ۳-۲ بیان | ۳۵ |
| ۳-۳ نوترکیبی | ۳۶ |
| ۳-۴ فاکتور VII نوترکیب فعال | ۳۷ |
| ۳-۵ رده سلولی CHO | ۳۹ |
| ۴- بررسی مطالعات قبلی | ۳۹ |
| ۵- اهداف کلی و اختصاصی | ۴۲ |
| ۵-۱هدف کلی | ۴۲ |
| ۵-۲هدف اختصاصی | ۴۲ |
| ۶- نوع مطالعه | ۴۲ |
| ۷- نحوه اجرای تحقیق | ۴۲ |
| ۷-۱ لیست مواد مورد نیاز | ۴۳ |
| ۷-۲ لیست تجهیزات مورد نیاز | ۴۴ |
| ۸- روش و مراحل انجام پژوهش | ۴۶ |
| ۸-۱ کشت رده سلولی HepG2 | ۴۶ |
| ۸-۱-۱ محیط کشت RPMI-1640 | ۴۶ |
| ۸-۱-۲ مواد لازم جهت تهیه محیط کشت مناسب فریز سلولهای HepG2 | ۴۷ |
| ۸-۱-۳ روش دفریز کردن سلول | ۴۸ |

۴-۱-۸ کشت سلول ۴۸
۸-۲ استخراج RNA از سلولها ۴۹
۸-۲-۱ مواد لازم جهت استخراج RNA ۵۰
۸-۲-۲ تعیین غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری ۵۱
۸-۲-۳ بررسی کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل ۱ درصد آگاروز ۵۲
۸-۳ ساخت cDNA از روی RNA استخراج شده ۵۳
۸-۴ تکثیر ژن فاکتور VII از روی cDNA ساخته شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۵۴
۸-۴-۱ مواد لازم جهت PCR ۵۴
۸-۴-۲ مخلوط واکنش PCR ۵۶
۸-۴-۳ آغازگرها(پرایمرها) ۵۶
۸-۴-۴ طراحی پرایمرهای ژن فاکتور VII ۵۶
۸-۴-۵ الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۵۷
۸-۵ کلونینگ ژن FVII ۵۸
۸-۵-۱ انتخاب وکتور مناسب ۵۸
۸-۵-۲ برش (هضم) آنزیمی (Digestion) ۵۹
۸-۵-۳ اتصال آنزیمی (Ligation) ۶۰
۸-۵-۴ آماده سازی سلولهای صلاحیت دار *E.coli* ۶۰
۸-۵-۵ ترانسفورماسیون سلولهای صلاحیت دار ۶۱
۸-۶غربالگری کلونها ۶۲
۸-۶-۱غربالگری کلونها با استفاده از PCR ۶۲
۸-۶-۲غربالگری با استفاده از هضم آنزیمی ۶۲
۸-۶-۲-۱ استخراج DNA پلاسمیدی ۶۳
۸-۶-۳ تعیین توالی DNA ۶۴
۸-۷ برش پلاسمید با آنزیم *PvuI* ۶۴
۸-۸ ترانسفکشن ۶۵
۸-۸-۱ تعیین دوز کشندگی جنتیسین ۶۵
۸-۸-۲ ترانسفکت وکتور یوکاریوتی حاوی ژن FVII در رده سلولی CHO ۶۶
۸-۹ بررسی بیان FVII در سطح ژن ۶۹
۸-۱۰ بررسی بیان FVII در سطح پروتئین ۶۹
۸-۱۰-۱ استفاده از تکنیک الایزا ۶۹
۸-۱۰-۲ جداسازی و شمارش سلولها جهت تهیه تک کلون ۷۱
۸-۱۰-۳ استفاده از تکنیک ایمونو پرسیپیتاسیون برای جداسازی FVII موجود در محیط کشت ۷۳
۸-۱۰-۴ پلی آکریلامید ژل الکتروفورز SDS- PAGE ۷۴
۸-۱۰-۵ وسترن بلات (Western- blot) ۷۵
۸-۱۰-۶ بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب ۷۶
۸-۱۰-۷ تست PT ۷۷
۹- تفسیر نتایج ۷۸
۹-۱ سنتز cDNA از RNA استخراج شده رده سلولی HepG2 و ۷۹

جداسازی ژن فاکتور VII با استفاده از RT- PCR
۹-۲ کلونینگ ژن FVII ۸۰
۹-۲-۱ هضم آنزیمی وکتور و قطعه ژنی FVII ۸۰
۹-۲-۲ ترانسفورماسیون ۸۰
۹-۲-۳ غربالگری کلونها ۸۰
۹-۲-۳-۱ جداسازی کلونها با استفاده از PCR ۸۰
۹-۲-۳-۲ جداسازی کلونها با استفاده از هضم آنزیمی ۸۲
۹-۲-۳-۳ تایید توالی کلون شده کلونها با استفاده از توالی یابی سکانس ۸۳
۹-۳ تعیین دوز غلظت جنتیسین ۸۴
۹-۴ بهینه سازی شرایط ترانسفکشن ۸۴
۹-۵ بررسی بیان FVII در سطح ژن ۸۴
۹-۵-۱ استخراج RNA از سلولهای CHO حاوی ژن FVII نوترکیب ۸۴
۹-۵-۲ سنتز cDNA و بررسی بیان ژن فاکتور VII نوترکیب با استفاده از RT-PCR ۸۶
۹-۶ بررسی بیان FVII در سطح پروتئین ۸۷
۹-۶-۱ بررسی بیان فاکتور VII نوترکیب موجود در محیط کشت ۸۷
رده سلولی CHO با استفاده از الایزا
۹-۶-۲ بررسی بیان فاکتور VII نوترکیب موجود در محیط کشت ۸۹
رده سلولی CHO با استفاده از SDS-PAGE
۹-۶-۳ بررسی بیان فاکتور VII نوترکیب موجود در محیط کشت ۹۰
رده سلولی CHO با استفاده از Western-blot
۹-۷ بررسی فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب با استفاده از تست PT ۹۱
۱۰- بحث ۹۲
۱۱- پیشنهادات ۱۱۰
۱۲- پیوست ۱۱۱
۱۳- منابع ۱۱۷

## چکیده فارسی

بیماری هموفیلی یکی از شایعترین بیماریهای انعقادی ژنتیکی و وابسته به جنس بوده که احتمال وقوع آن در مردان بیش از زنان است .یکی از چالشهای عمده در درمان بیماران هموفیلی نیاز به فاکتور VIII وIX پلاسمائی و یا نوترکیب در دوز بالا می باشد.البته این مشکل در ۲۵ درصد از بیماران که بطور طبیعی دارای آنتی بادی بر علیه فاکتور از دست رفته هستند،چند برابر می شود و تزریق فاکتورهای جایگزین تنها در صورتی قابل استفاده است که تیتر آنتی بادی در خون این این افراد پائین باشد.علاوه بر این،تهیه فاکتورهای فوق از پلاسما در مقیاس بالا با توجه به میزان اندک آنها در خون،هزینه تولید آن را سنگین و خطر انتقال بیماری های خونی را نیز بدلیل مشکلات موجود در ویروس زدائی از آنها افزایش می دهد.بنابراین تولید فاکتور VII به روش نوترکیبی می تواند با توجه به نقش این فاکتور در مسیر خارجی انعقاد،روش مناسب و ایمن برای حل مشکلات موجود در درمان هموفیلی باشد.

کلونینگ و بیان این فاکتور نوترکیب در رده سلولی CHO به دلیل سرعت و بازدهی(Yield) بسیار بالا در تولید پروتئین نوترکیب،هدف اساسی این تحقیق می باشد.

برای این منظور ابتدا cDNA فاکتور VII از کشت رده سلولی HepG2 و با کمک پرایمرهای اختصاصی جداسازی شد.ژن مذکور و به موازات آن وکتور pcDNA توسط آنزیمهای محدود الاثر *EcoRI* و*NotI* در محلهای اثر اختصاصی برش داده شد و وکتور نوترکیب پس از ترانسفورم به *E.Coli* برای کلونیهای نوترکیب غربالگری شد.در مرحله بعد پس از استخراج پلاسمید نوترکیب و خطی کرن آن توسط آنزیم *PvuI* ، پلاسمید مذکور برای ترانسفکت به رده سلولی CHO آماده شد.

وکتور نوترکیب به میزبان یوکاریوتی ترانسفکت و پروتئین نوترکیب پس از غربالگریهای لازم آنالیز گردید.

نتایج بررسی، بیان ژن فاکتور VII نوترکیب در سطح ژن و پروتئین را با استفاده از RT-PCR ،الایزا و وسترن بلات تائید نمود.همچنین تائید فعالیت بیولوژیکی فاکتور VII نوترکیب توسط تست PT و ایجاد لخته در پلاسمای فاقد فاکتور VII صورت گرفت.

کلمات کلیدی:هموفیلی، فاکتورVII ، CHO ، کلونینگ، وسترن بلات

# ۱- دلایل انتخاب موضوع

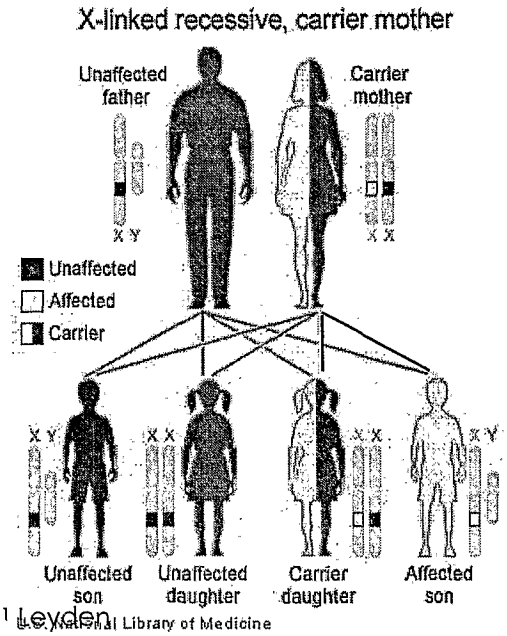
## ۱-۱ هموفیلی

هموفیلی یک بیماری ارثی و وابسته به جنس مغلوب است که باعث کند شدن فرآیند انعقاد خون می گردد. دراین شرایط جراحت، عمل جراحی ویاکشیدن دندان اغلب خونریزی های طولانی مدت را به دنبال خواهدداشت. وجود خون درادرار، خون ریزی بینی بدون دلیل وخونمردگی های متعدد پوستی ازعلائم این بیماری هستند. بیماری را میتوان باتوجه به غلظت فاکتورهای منعقدکننده خون دراشکال حاد، متعادل وخفیف دسته بندی کرد. این رده بندی برمبنای میزان فعالیت فاکتورهای انعقادی نسبت به حالت طبیعی صورت می گیرد. درموارد حاد بیماری دراثراسترسهای روانی ویا حتی بدون وقوع هرگونه جراحت یا زخم(خونریزی خودبخودی) خونریزیهای شدیدی روی می دهد. این خونریزی ها می تواند عوارض جدی برروی مغز، ماهیچه، مفاصل وسایراندامهای درونی بدن داشته باشد. اشکال خفیف تر هموفیلی شامل خونریزی های خودبخودی نبوده وعلائم بیماری تنها زمانی بروز خواهد کرد که فرد دچارخونریزی غیرعادی طی یک عمل جراحی ویا سانحه شده باشد[۱].

دونوع عمده این بیماری هموفیلی A (نوع کلاسیک) وهموفیلی B (بیماری کریسمس) هستند. اگرچه دونوع مذکور علائم ونشانه های مشابه دارند ولی ازموتاسیون دردو ژن مختلف (F8 وF9) ناشی می شوند. بیمارانی با شکل غیرمعمول ازهموفیلی B که به عنوان هموفیلی B لیدن[1] شناخته می شود، خونریزی های مکرر را دردوران کودکی تجربه می کنند اما مشکلات کمتری دردوران بلوغ خواهند داشت. شکل دیگری ازبیماری، هموفیلی اکتسابی[2] نام دارد که ازوراثت موتاسیونهای ژنی ناشی نمی شود. این شکل نادر باخونریزی های غیرطبیعی زیرپوستی، ماهیچه وهربافت نرم دیگر ترسیم و عموماً دردوران بلوغ آغاز می گردد[۴-۲].

دونوع رایج هموفیلی درمردها بسیار بیشتر اززنها مشاهده می شود. هموفیلی A نوع رایج تر بیماری بوده بطوریکه ازهر ۴۰۰۰ نوزاد مذکر متولدشده دردنیا یک نفر به آن مبتلا است. این درحالی است که نوع B آن یک درهر ۲۰۰۰۰ تولد نوزاد مذکر درسطح جهان می باشد. بیماری همه نژادها راگرفتارکرده وتفاوتی ازاین لحاظ دیده نشده است. (منبع www.hemophilia.org)

هموفیلی به صورت پیوسته بهX مغلوب به ارث می رسد، یک چنین عارضه ای درصورتی پیوسته به X خوانده می شود که ژن جهش یافته عامل بیماری برروی کروموزومX (یکی ازدونوع کروموزوم جنسی درانسان) واقع شده باشد. درافرادمذکرکه تنها یک کروموزوم جنسیX دارند یک نسخه تغییریافته از ژن




شکل۱-۱: نحوهٔ وراثت یک وراثت بیماری X مغلوب( www.hemophilia.org)

[1] Leyden
[2] Acquired hemophilia

U.S. National Library of Medicine

کافیست تاعلائم بیماری را ازخودبروز دهند. این درحالی است که در افراد مؤنث با دوکروموزوم X، موتاسیون بایددرهردو کپی ازژن عامل بیماری رخ داده تابیماری مشاهده گردد. درنتیجه مردان بافراوانی بیشتری نسبت به زنان به بیماریهای پیوسته بهX مغلوب دچارمی شوند. یکی ازمشخصه های بارز وراثت پیوسته به X عدم توانایی پدردرانتقال صفت بیماریزا به فرزندان مذکر خود است(شکل۱-۱).

درووراثت پیوسته بهX مغلوب فرد مؤنث بایک نسخه تغییریافته ازژن، حامل[3] نامیده می شود ومی تواند کپی جهش یافته ژن را به فرزندان خودانتقال دهد بدون اینکه خودبیماری را تجربه نماید. در۱۰٪ ازموارد، زنان حامل آلل جهش یافته ازژن F8 یا F9 به طورخفیف علائم هموفیلی را درمواقع خونریزی نشان می دهند(فرضیه لیون[4])[۶-۵].

## ۲-۱تاریخچه

ازتلمود[5] (کتاب مقدس یهودیان) به عنوان قدیمی ترین منبع موجود درمورد هموفیلی یاد می شود. درآن تذکرداده شده است که ضروری نیست پسران فریضهٔ دینی خودرا اداءکنند درصورتی که درگذشته دوبرادرآنها بواسطه این رسم فوت کرده باشند. درسال ۱۰۰۰میلادی یک پزشک عرب، ابوالقاسم الزهراوی[6]، درکتاب خود باعنوان التصریف به جزئیات بیشتری ازهموفیلی اشاره کرده است. درکتاب مذکورازیک خانوادهٔ آندولوسی یادشده که مردان درآن براثرخونریزی مداوم حتی ناشی ازیک زخم کوچک می مردند.

---

[3] Carrier
[4] Lyon hypothesis (M. Lyon1962)
[5] Talmud
[6] also known in the west as Abulcasis

در۱۸۰۳میلادی دکترجان کانراد اوتو[7] فیزیکدان اهل فیلادلفیا توصیفی درباره «ویژگی منحصربفرد خونریزی دربرخی خانواده ها» نوشته است. اوتشخیص داد که این بیماری ارثی بوده مردان و بندرت زنان را مبتلا می سازد. همچنین توانست بیماری راتا والد مؤنثی درسال ۱۷۲۰ میلادی، ردیابی نماید. اولین کاربرد واژه «هموفیلی» به شرح این بیماری که توسط هوف[8] دردانشگاه زوریخ (۱۸۲۸م) نوشته شده است، بازمی گردد. درسال ۱۹۳۷م دوپزشک ازدانشگاه هاروارد به نامهای پاتک و تایلور[9] گلوبولین آنتی هموفیلیک راکشف کردند. پاولوسکی[10] پزشک اهل بوینوس آیرس باانجام یک تست آزمایشگاهی توانست دوبیماری هموفیلی A وB را ازیکدیگرتفکیک نماید. آزمایش فوق باترکیب کردن خون یک فردمبتلا به هموفیلی با خون بیماردیگر منجربه کشف این واقعیت گشت که بیشترازیک فرم برای این بیماری وجود دارد.

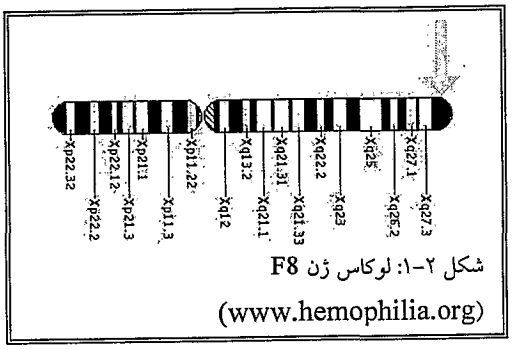
دراواسط قرن ۱۹ شیوع هموفیلی بین خانواده های سلطنتی اروپا باعث شده بود تا برخی مواقع از آن به عنوان بیماری سلطنتی یاد شود. ملکه ویکتوریا اولین حامل شناخته شده، با انتقال این موتاسیون به دو دخترش آلیس و بتریس[11] وهمچنین پسرش لئوپولد[12] سبب شد تا چندین خانوادهٔ سلطنتی دیگر در اروپا (اسپانیا،اطریش و روسیه) نیز به این بیماری مبتلا گردند[۹-۷].

---

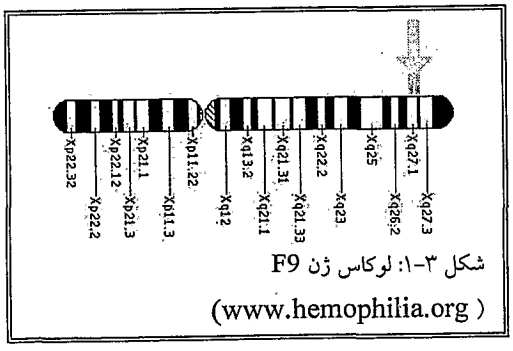
7 John Conrad Otto
8 Hopff (The History of hemophilia. Retrieved on 2007-06-27)
9 Patek & Taylor
10 Pavlosky
11 Alice & Beatrice
12 Leopold

## ۳-۱پاتوژنز

سیستم انعقادی ازطریق تعادل ظریفی بین تشکیل شدن ومهارلخته، تمامیت گردش خون راحفظ می کند. پروتئازها وکوفاکتورهای پروتئینی تشکیل دهندهٔ آبشارانعقادی به صورت پیش ماده های غیرفعال درجریان خون حضوردارند ودرمحل آسیب بایستی تحریک شده تا لختهٔ فیبرینی راتشکیل دهند. زمان وکیفیت تشکیل شدن یک لخته به فعال شدن تصاعدی یاتقویت آبشار پروتئازی نیازدارد. عوامل انعقادی IX وVIII هردوکلید این تقویت بوده وعامل انعقادی X رافعال می کنند. فاکتورIX بعنوان یک پروتئاز وفاکتور VIII بعنوان یک کوفاکتور عمل کرده و کمبودیا نقص هریک ازعوامل مذکورمنجربه بروز انواع هموفیلی می گردد[۱۱-۱۰].



شکل ۲-۱: لوکاس ژن F8
(www.hemophilia.org)



شکل ۳-۱: لوکاس ژن F9
( www.hemophilia.org)

هموفیلی های A وB بترتیب بواسطه جهش هائی درژنهای F8 و F9 بوجودمی آیند. ژن F8 دستورالعمل ساخت پروتئینی را به همراه دارد که فاکتورانعقادی VIII نامیده می شود. فاکتورمذکور به طورعمده توسط سلولهای اندوتلیوم سنتز وهمراه باجریان خون به شکل غیرفعال ودراتصال با مولکول دیگری به نام فاکتور فون- ویلبراند[۱۳] (vWF) درگردش است. درپاسخ به هر جراحتی که باعث بروزصدمه به رگهای خونی گردد، فاکتور VIII فعال و ازکمپلکس فوق جدا می شود.

[13] von Willebrand Factor

پروتئین فعال(FVIIIa) با فاکتوردیگری به نام IX، میانکنش داده وزنجیره ای ازواکنشهای آبشاری که درنهایت منجربه تشکیل لخته می شود، آغازمی گردد. موقعیت این ژن برروی کروموزوم Xq28 ودقیقاً ازجفت باز153,717,259 تا 153,904,191 می باشد(شکل۲-۱)[۱۰].

ژن F9 دستورالعمل ساخت فاکتورانعقادی IX را داشته که یک آنزیم محصول کبد میباشد. این پروتئین نیزبه صورت غیرفعال درخون جریان دارد ودرپاسخ به آسیب دیدگی رگها توسط فکتوردیگری به نام XI فعال میگردد. فاکتورفعال(IXa)درمیانکنش بافاکتورVIII و سایرفاکتورهای انعقادی مقدمات شروع آبشارانعقادی رافراهم می سازند. این ژن برروی بازوی بزرگ کروموزوم X بین موقعیتهای 27.1 و 27.2 و دربررسی دقیق تر بین جفت بازهای 138,440,560 تا 138,473,282 واقع شده است(شکل۳-۱).

جهش های F8 باعث کمبود یانقص عملکرد فاکتورVIII انعقادی و جهش های F9 باعث کمبود یا نقص عملکرد فاکتورIX انعقادی می شوند. برخی جهش ها بکلی فعالیت این فاکتورها را ازبین برده ودرموارد حاد بیماری دیده می شوند، درمقابل برخی باعث کاهش فعالیت آنها شده وعاملی برای بروز خفیف بیماری شناخته می شوند.

جهش های F8 شامل حذفها، دخولها[14]، واژگونی ها وجهش های نقطه ای هستند. شایعترین آنها واژگونی حذف کنندهٔ انتهای کربوکسیل فاکتور VIII بوده که به تنهایی مسئول ۲۵درصد کل مواردهموفیلی A و۴۰ تا ۵۰ درصد انواع دیگرهموفیلی های شدید است. این واژگونی ازنوترکیبی درون کروموزومی بین توالی واقع دراینترون ۲۲ ژن F8 وتوالی همتای تلومریک آن ناشی می شود.

[14] Insertion

جهش های متفاوت زیادی از F9 دربیماران مبتلا به هموفیلی B وجود دارد اما برخلاف نوع A، درمورد هموفیلی B جهش شایعی تشخیص داده نشده است. بروزبرخی جهش ها درمجاورت ۵' ژن مذکور منجربه تولید شکل نادری ازهموفیلی به نام لِیدن می گردد. بیماران در بدو تولد ازکمبود فاکتورIXa رنج می برند اما تغییرات هورمونی درسنین بلوغ بتدریج باعث افزایش سطح این فاکتورشده درنتیجه بالغین مبتلا به هموفیلی B لیدن بندرت پدیدهٔ خونریزی غیرطبیعی را تجربه می کنند.

چند موتاسیون نقطه ای درژن F9 شناخته شده است که منجربه حساسیت غیرطبیعی به دارویی بنام وارفارین[15] میگردد. این داروی ضدانعقاد برای جلوگیری ازتشکیل لخته های خونی غیرمعمول مورداستفاده قرارمی گیرد. هرچند افراد حامل این جهش ها مبتلابه هموفیلیB نیستند اما چنانچه تحت درمان با وارفارین قرارگیرند مشکلات مشابهی را درلخته شدن خون بروزخواهند داد. بدین ترتیب که دارو باعث کاهش سطح فاکتورIX به کمترازحدمعمول درخون شده، می تواند مانع ازانعقاد طبیعی و درنتیجه خونریزی های شدیدگردد[۱۶-۱۲].

## ۴-۱درمان ومحدودیتهای آن

اگرچه اکنون ژن درمانی[16] بسیار نویدبخش است ولی درحال حاضربجز پیوند کبد هیچ درمان قطعی برای هموفیلی A وB وجود ندارد. امروزه مراقبت معمول تزریق وریدی فاکتورهای مربوطه است. جایگزینی فاکتور معیوب میتواند باجداسازی فاکتورسالم ازسرم خون، به صورت نوترکیب ویاترکیبی ازهردو انجام پذیرد. در۲۵٪ ازبیماران هموفیل A توسط سیستم دفاعی بدن آنتی بادی برعلیه فاکتورتزریق شده ترشح می گرددکه دراین مواردیا دُز فاکتور جایگزین شده افزایش می یابد ویااز

---

15 Warfarin
16 Gene therapy

پروتئینهای همولوگ غیرانسانی مثلافاکتورVIII خوک استفاده می شود. چنانچه بیمار بدلیل بازدارنده های موجود در خون نسبت به درمان باجایگزینی فاکتورمعیوب مقاومت نشان دهد دراین صورت میتوان ازفاکتورVII انسانی نوترکیب به طورمقطعی برای درمان بیماری بهره برد. درمان باجایگزینی فاکتورمربوطه طول عمربیمار را از ۱/۴ سال دراوایل قرن بیستم تاحدود ۶۵ سالگی درحال حاضرافزایش داده است[۲۱-۱۹].

دراوایل ۲۰۰۸م اداره غذا ودارو ایالات متحده فاکتورآنتی هموفیلیک Xyntha راتأیید کرد که یک پروتئین مهندسی شده ازژنوم سلولهای CHO[17] است. ازسال ۱۹۹۳ فاکتورهای نوترکیب (عموماً بااستفاده ازکشت سلول های CHO علیرغم تولید اندک) در دسترس بوده و به طورگسترده درکشورهای ثروتمند مورد استفاده قرار می گیرند. اگرچه فاکتورهای انعقادی نوترکیب خلوص وایمنی بالایی را به همراه دارند اما تولید آنها درغلظت های بالا بسیارپرهزینه است.

به بیماران هموفیل توصیه می گردد تابا انجام تمرین های روزانه، مفاصل بخصوص آرنج، زانو ومچ پا را تقویت سازند. ورزش ازجمله عواملی است که سبب افزایش انعطاف پذیری، خاصیت کشسانی و توان ماهیچه ها شده وکارآیی آنهارا درمحافظت ازمفاصل درمقابل صدمات ناشی ازخونریزی بالا می برد.

همچنین برخی تحقیقات دانشمندان نشان می دهد هیپنوتیزم[18] برکاهش دفعات خونریزی وشدت آن درنوع حاد بیماری مؤثربوده و ازمراحل درمان به کرّات می کاهد. گیاهانی که درتقویت دیواره رگهای

---

17 Chinese Hamster Ovary (CHO)
18 Hypnosis

خونی نقش دارند نیز ممکن است برای بیماران هموفیل مفید باشند. ازاین دسته میتوان عصاره دانه انگور، گزنه، فندق و بومادران[19] را نام برد. (منبع www.hemophilia.org)

بااین وجود محققان درتلاشند تاباگسترش روشهایی برای تصحیح ژنهای معیوب بربیماری غلبه نمایند. گرچه هنوز ژن درمانی به مرحله ای که برای درمان هموفیلی پذیرفته شده باشد، نرسیده است اما همچنان دانشمندان علم ژنتیک به نتایج تحقیقات کلینیکی خود امیدوارند[۲۳-۱۷].

## ۲- بیان مسئله

### ۲-۱ فاکتورهای انعقادی

فاکتورهای انعقادی عموماً با اعداد یونانی مشخص و به صورت زیموژن های غیرفعال باجریان خون درگردش هستند. اشکال فعال شدهٔ آنها با زیرنویس a نشان داده می شودو اغلب آنزیمهایی ازدسته سرین پروتئازها می باشند. امادراین میان استثناهایی نیزوجوددارد، به عنوان مثال فاکتورVوVIII گلیکوپروتئین بوده وفاکتورXIII یک ترنس گلوتامینازاست. سرین پروتئازها با شکستن سایرپروتئینها درجایگاه های ویژه نقش خود راایفاء می نمایند. درمیان فاکتورهای انعقادی فعال خون، فاکتورVIIa بیشترین غلظت رادرخون به خوداختصاص داده است. استفاده ازاعداد یونانی بجای نام کاشفان آنها ویا اسامی سیستماتیک، درطی کنفرانس های سالیانه متخصصین هموستاز[20] (شروع از۱۹۵۵م) پذیرفته و درسال ۱۹۶۲ اکثریت آراء برای نامگذاری فاکتورهای I الی XII کسب شد. این کمیته اکنون به کمیته بین المللی ترومبوزیس وهموستازیس[21] (ICTH) تغییرنام یافته است [۲۵-۲۴].

---

19 Yarrow
20 Hemostasis Experts
21 International Committee on Thrombosis and Hemostasis

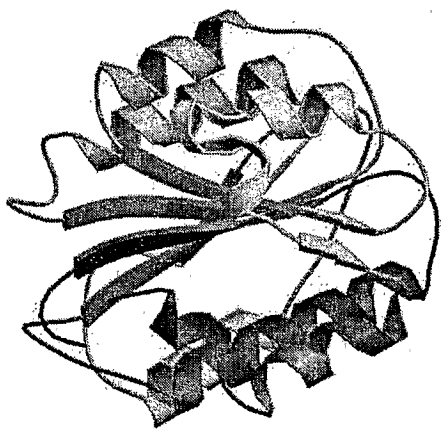
جدول ۱-۲ فهرستی ازفاکتورهای آبشارانعقاد را ارائه می نماید و برخی ازمهمترین فاکتورهای دخیل دربروز هموفیلی ودرمان آن نیزدرادامه بررسی می گردد.

جدول ۱-۲ پروتئینهای دخیل در سیستم انعقاد و هموستاز[۲۱].

| Number and/or name | Function |
|---|---|
| I (fibrinogen) | Forms clot (fibrin) |
| II (prothrombin) | Its active form (IIa) activates I, V, VIII, XI, XIII, protein C, platelets |
| Tissue factor | Co-factor of VIIa (formerly known as factor III) |
| Calcium | Required for coagulation factors to bind to phospholipid (formerly known as factor IV) |
| V (proaccelerin, labile factor) | Co-factor of X with which it forms the prothrombinase complex |
| VI | *Unassigned* – old name of Factor Va |
| VII (stable factor) | Activates IX, X |
| VIII (antihemophilic factor) | Co-factor of IX with which it forms the tenase complex |
| IX (Christmas factor) | Activates X: forms tenase complex with factor VIII |
| X (Stuart-Prower factor) | Activates II: forms prothrombinase complex with factor V |
| XI (plasma thromboplastin antecedent) | Activates IX |
| XII (Hageman factor) | Activates factor XI and prekallikrein |
| XIII (fibrin-stabilizing factor) | Crosslinks fibrin |
| von Willebrand factor | Binds to VIII, mediates platelet adhesion |
| prekallikrein | Activates XII and prekallikrein; cleaves HMWK |
| high molecular weight kininogen (HMWK) | Supports reciprocal activation of XII, XI, and prekallikrein |
| fibronectin | Mediates cell adhesion |
| antithrombin III | Inhibits IIa, Xa, and other proteases; |
| heparin cofactor II | Inhibits IIa, cofactor for heparin and dermatan sulfate ("minor antithrombin") |
| protein C | Inactivates Va and VIIIa |
| protein S | Cofactor for activated protein C (APC, inactive when bound to C4b-binding protein) |
| protein Z | Mediates thrombin adhesion to phospholipids and stimulates degradation of factor X by ZPI |
| Protein Z-related protease inhibitor (ZPI) | Degrades factors X (in presence of protein Z) and XI (independently) |
| plasminogen | Converts to plasmin, lyses fibrin and other proteins |
| alpha 2-antiplasmin | Inhibits plasmin |
| tissue plasminogen activator (tPA) | Activates plasminogen |
| urokinase | Activates plasminogen |

| | |
|---|---|
| plasminogen activator inhibitor-1 (PAI1) | Inactivates tPA & urokinase (endothelial PAI) |
| plasminogen activator inhibitor-2 (PAI2) | Inactivates tPA & urokinase (placental PAI) |
| cancer procoagulant | Pathological factor X activator linked to thrombosis in cancer |
| | |

•**فاکتورفون**



شکل ۱-۲: ساختمان سه بعدی vWF
(www.bloodmed.com)

•**ویلبراند**(vWF)؛یک گلیکوپروتئین بزرگ باچندین زیرواحد است که درساختارپلاسمای خون وجود دارد و به طورعمده در اندوتلیوم، مگاکاریوسیتها[22] وبافت پیوندی ساب اندوتلیال تولید می گردد(شکل۱-۲).

هرزیرواحدآن شامل ۲۰۵۰ آمینواسیدبوده وشامل دومین های زیر می باشد:

- دومین D□/D3 به فاکتورVIII متصل می شود.
- دومین A1 به گیرنده GPlb پلاکت، هپارین واحتمالا کلاژن متصل می شود.
- دومین A3 به کلاژن متصل می شود.
- دومین C1 که درآن تری پپتید RGD[23] به اینتگرین فعال شدهٔ پلاکت متصل می شود.

[22] Megakaryocyte
[23] Arg - Gly - Asp

- دومین گره سیستئینی درانتهای کربوکسیل پروتئین که با[24] PDGF ، [25]TGFß و [26]ßHCG پیونددارد.

این پروتئین یک آنزیم نیست درنتیجه فعالیت کاتالیتیکی نداشته عملکرد اصلی آن اتصال به سایرپروتئینها بخصوص فاکتور VIII است ودرجمع شدن پلاکتها در محل زخم نقش مهمی ایفاءمی کند[۲۶].

- **فاکتورVII** ؛ یا proconvertin یکی ازپروتئینهای اصلی درآبشارانعقاد ویکی ازآنزیمهای خانوادهٔ سرین پروتئازها(EC:3.4.21.21) می باشد. ژن فاکتورVII 3.1kp (ID:2155) و روی کروموزوم۱۳(13q34) درمجاورت ژن فاکتورX قراردارد، بندرت عامل بیماری شناخته شده وبصورت مغلوب به ارث می رسد. پیش سازفاکتور VII از۹ اگزون تشکیل یافته که اگزون شماره I به دوشکل a وb پپتید سیگنال واگزونهای IIو III به ترتیب ناحیه پروپپتید گاماکربوکسی گلوتامیک اسید وناحیه اسیدهای آمینه حلقوی را می سازند. اگزونهای IV وV دو دومین EGF واگزونهای VI تا VIII دومین کاتالیک را تشکیل

شکل۲-۲: FVIIa دراتصال به غشاء ازطریق دومین Gla (www.bloodmed.com)

[24] platelet-derived growth factor
[25] transforming growth factor-β
[26] β-human chorionic gonadotropin