

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



۹۳۱۰۲۶۹

دانشگاه شهید چمران اهواز
دانشکده علوم
گروه ژنتیک

پایان نامه کارشناسی ارشد

عنوان :

بررسی واژگونی اینترون ۲۲ و مارکر HindIII در اینترون ۱۹ ژن
فاکتور ۸ انعقادی در بیماران هموفیل A شدید استان کرمانشاه

نگارش:

هانیه نجفی

اساتید راهنما:

دکتر سید رضا کاظمی نژاد

دکتر رضا علی بخشی

استاد مشاور:

دکتر محمدرضا گلپایگانی

شهریور ۹۳

تقدیم به:

پدرم و مادر بسیار مهربانم، دریای زلال معرفت و فداکاری

تقدیم به:

همسر، اسطوره زندگیم، پناه حستگیم و امید بودنم

و تقدیم به خواهرم:

که وجودش شادی بخش و صفایش مایه آرامش من است.

سپاسگذاری

سپاس مخصوص خداوند مهربان که به انسان توانایی و توانایی بخشد تا به بندگانش شفقت ورزد، مهربانی کند و در حل مشکلاتشان یاری شان نماید. از راحت خویش بگذرد و آسایش هم نوعان را مقدم دارد، با او معامله کند و در این خلوص انباز نکیر و خوش باشد که پروردگار سمیع و بصیر است. سپاس ایندو منان که به من این فرصت را داد تا به این مرحله از علم رسیده و از پیچ محبتی دریغ نکرد و در تمام مراحل زندگی مرا قوت قلب بود.

سپاس فراوان از مادرم، پدرم، همسر و خواهرم که همواره حامی و پشتیبانم بوده اند.

و همچنین مراتب سپاس و قدردانی ام را از این عزیزان ابراز می نمایم:

اساتید را به نام جناب آقای دکتر سید رضا کاظمی نژاد و جناب آقای دکتر رضا علی بخشی

استاد مشاورم جناب آقای دکتر محمد رضا گلپایگانی

سایر اساتید گروه ژنتیک، منشی گروه سرکار خانم صفار و بگلایسی های مهربانم

خانواده های محترم بیماران

پرنس محترم آزمایشگاه رفرنس شهرستان کرمانشاه

پرنس محترم و دانشجویمان بخش ژنتیک آزمایشگاه رفرنس شهرستان کرمانشاه:

خانم ها: قحطی، عظیمی، میراحمدی، مانی، بی باک، حیاتی، احمدی، مهربانی، شفیعی، نیاکان، نوری، شاه محمدی و آقایان: بیگلری، حاصفی

باسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز
دانشکده علوم
(نتیجه ارزشیابی پایان نامه ارشد)

پایان نامه خانم: هانیه نجفی دانشجوی رشته: زیست شناسی سلولی مولکولی گرایش: ژنتیک دانشکده علوم به شماره دانشجویی ۹۰۱۰۲۱۱ با عنوان: بررسی واژگونی ایترون ۲۲ و مارکر HindIII در ایترون ۱۹ ژن فاکتور ۸ انعقادی در بیماران هموفیل A شدید استان کرمانشاه جهت اخذ مدرک: کارشناسی ارشد در تاریخ: ۹۳/۶/۳۱ توسط هیأت داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با درجه..... تصویب گردید.

اعضای هیأت داوران:	رتبه علمی	امضاء
۱. استاد راهنما اول: دکتر سید رضا کاظمی نژاد	دانشیار
استاد راهنما دوم: دکتر رضا علی بخشی	دانشیار
استاد مشاور: دکتر محمدرضا گلپایگانی	استادیار
استاد داور: دکتر علی محمد فروغمند	دانشیار
استاد داور: دکتر محمد شفیعی	استادیار
نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر سعید رضا خاتمی	استادیار
۲. مدیر گروه: دکتر حمید گله داری	استاد
۳. معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده: دکتر طاهره صداقت	دانشیار
۴. مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه: دکتر عبدالرحمن راسخ	استاد

چکیده

نام خانوادگی: نجفی	نام: هانیه	شماره دانشجویی: ۹۰۱۰۲۱۱
عنوان پایان نامه: بررسی واژگونی اینترون ۲۲ و مارکر HindIII در اینترون ۱۹ ژن فاکتور ۸ انعقادی در بیماران هموفیل A شدید استان کرمانشاه		
اساتید راهنما: دکتر سید رضا کاظمی نژاد ، دکتر رضا علی بخشی		
استاد مشاور: دکتر محمد رضا گلپایگانی		
درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد	رشته: زیست شناسی	گرایش: ژنتیک
دانشگاه: شهید چمران اهواز	دانشکده: علوم	گروه: ژنتیک
تاریخ فارغ التحصیلی: ۹۳/۶/۳۱		تعداد صفحه: ۸۳
کلید واژه ها: هموفیلی A ، اینترون ۲۲ ، جهش ، ژن فاکتور ۸ ، پلی مورفیسم		
<p>هموفیلی A بیماری انعقادی وابسته به X با شیوع تقریبی ۱ در هر ۵۰۰۰ مرد می باشد. تقریباً نیمی از بیماران هموفیلی شدید دارای واژگونی های بزرگ DNA هستند که باعث اختلال در اینترون ۲۲ ژن فاکتور ۸ می شود. واژگونی اینترون ۲۲ توسط روش های ساترن بلات و LD-PCR و اخیراً Inverse Shifting- PCR شناسایی می شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی کارایی روش جدید IS-PCR به منظور شناسایی جهش شایع Inv22 می باشد. همچنین در این مطالعه میزان همراهی پلی مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ در بیماران هموفیل شدید و افراد کنترل بررسی شد. براساس نتایج به دست آمده از روش IS-PCR ، طول قطعات تکثیری مشاهده شده ، متفاوت با نتایج موجود در مقاله اصلی به دست آمد. پس از توالی یابی قطعه تکثیر شده مشخص شد که پرایمر IU بجای اتصال به جایگاه خود، به توالی ۸ نوکلئوتیدی مشابه اش در پایین دست توالی تکثیری متصل می شود. بنابراین اختلاف این قطعه تکثیر شده مشکلی در شناسایی Inv22 در افراد نرمال ایجاد نمی کند و میتوان در تشخیص ناقلین از آن بهره جست. با توجه به در دسترس نبودن توالی قطعه واژگون شده و عدم امکان مقایسه بین توالی تکثیر شده با پرایمرهای موتانت ما و توالی مورد انتظار ، امکان بررسی بیشتر جهت تعیین اختلاف سبب به دست آمده مقدور نشد. نتایج به دست آمده از همراهی پلی مورفیسم C/T نشان داد که هیچ گونه همراهی برای پلی مورفیسم C/T بین جمعیت بیمار و کنترل وجود ندارد.</p>		

فہرست مطالب

فصل ۱: کلیات و مروری بر مطالعه دیگران

- ۱-۱ تاریخچه هموفیلی..... ۲
- ۲-۱ انواع هموفیلی ونحوه توارث آن..... ۲
- ۱-۲-۱ هموفیلی A..... ۲
- ۲-۲-۱ هموفیلی B..... ۲
- ۳-۲-۱ هموفیلی C..... ۳
- ۳-۱ طبقه بندی شدت هموفیلی A..... ۳
- ۴-۱ ژن فاکتور ۸ (F8)..... ۳
- ۵-۱ بیوسنتز و ترشح فاکتور ۸..... ۴
- ۶-۱ مسیر آبشاری انعقاد..... ۴
- ۷-۱ تشخیص بیماری به وسیله تست های آزمایشگاهی..... ۶
- ۱-۷-۱ فعالیت فاکتور ۸ انعقادی..... ۷
- ۸-۱ علائم کلینیکی و عوارض عدم درمان هموفیلی..... ۷
- ۱-۸-۱ علائم کلینیکی..... ۷
- ۲-۸-۱ عوارض خونریزی مهار نشده..... ۷
- ۹-۱ درمان های جایگزین برای هموفیلی..... ۸
- ۱۰-۱ مشکلات درمان..... ۸
- ۱-۱۰-۱ ایجاد مهار کننده در بیماران هموفیل..... ۸
- ۱-۱۰-۱-۱ مهار کننده چیست..... ۹
- ۲-۱۰-۱-۱ تشخیص مهار کننده..... ۹
- ۳-۱۰-۱-۱ فاکتورهای تشدید کننده حضور مهار کننده ها..... ۹
- ۱-۱۰-۱-۳-۱ سابقه خانوادگی ونوع جهش..... ۹
- ۲-۱۰-۱-۳-۱ نوع فرآورده مصرفی..... ۹
- ۲-۱۰-۱ عفونت های ویروسی..... ۱۰
- ۱۱-۱ ژن درمانی هموفیلی A..... ۱۰
- ۱۲-۱ هموفیلی اکتسابی AH (Acquired Hemophilia)..... ۱۲
- ۱۳-۱ بیماری ون ویلبراند..... ۱۲
- ۱۴-۱ ازنان مبتلا به هموفیلی A..... ۱۲

۱۳	۱۵-۱ تشخیص ناقلین هموفیلی
۱۳	۱۶-۱ علت مولکولی نقص فاکتور ۸
۱۳	۱۷-۱ انواع جهش در ژن F8
۱۴	۱۸-۱ ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ در هموفیلی
۱۴	۱۹-۱ اینترون ۲۲
۱۵	۱-۱۹-۱ ویژگی های خاص اینترون ۲۲
۱۶	۲-۱۹-۱ واژگونی اینترون ۲۲ در ژن F8
۱۷	۲۰-۱ روش های بررسی ژنتیکی
۱۷	۱-۲۰-۱ آنالیز هدف دار جهش
۱۸	۱-۱-۲۰-۱ تشخیص جهش ناشناخته
۱۹	۲-۲۰-۱ روش های شناسایی جهش واژگونی اینترون ۲۲ در ژن F8
۱۹	۱-۲-۲۰-۱ روش ساترن بلات
۱۹	۲-۲-۲۰-۱ LD-PCR
۱۹	۳-۲-۲۰-۱ Inverse Shifting PCR
۲۰	۲-۲۰-۱ روش تحلیل پلی مورفیسم
۲۱	۲۱-۱ پلی مورفیسم های ژن F8
۲۱	۱-۲۱-۱ پلی مورفیسم های درون ژنی
۲۲	۲-۲۱-۱ دی مورفیسم های خارج ژنی
۲۲	۲۲-۱ موزائیسم سوماتیک در زنان ناقل
۲۲	۲۳-۱ اهمیت مطالعه
۲۳	۲۴-۱ پیشینه موضوع در ایران و جهان با ذکر منابع معتبر
۲۳	۱-۲۴-۱ در ایران
۲۳	۲-۲۴-۱ در جهان
۲۴	فصل دوم: مواد و روش ها
۲۵	۱-۲ جمع آوری نمونه
۲۸	۲-۲ استخراج DNA
۳۰	۱-۲-۲ روش Salting out
۳۰	۱-۱-۲-۲ مراحل استخراج DNA به روش Salting out

۳۱	۲-۲-۲ مراحل استخراج DNA به روش فنول- کلروفرم.....
۳۴	۳-۲-۲ استخراج DNA با کیت.....
۳۴	۳-۲-۳ تعیین غلظت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری.....
۳۵	۴-۲ روش Inverse-Shifting PCR.....
۳۵	۱-۴-۲ تهیه DNA حلقوی.....
۳۶	۱-۱-۴-۲ روش هضم آنزیمی توسط آنزیم محدود کننده BclII.....
۳۶	۲-۱-۴-۲ خالص سازی DNA برش خورده شده با آنزیم BclII توسط روش فنول- کلروفرم.....
۳۷	۳-۱-۴-۲ مرحله اتصال قطعات DNA به یکدیگر توسط آنزیم T4 DNA Ligase.....
۳۸	۴-۱-۴-۲ خالص سازی DNA حلقوی شده با روش فنول- کلروفرم.....
۳۸	۱-۴-۱-۴-۲ خالص سازی DNA حلقوی شده با کیت تخلیص.....
۴۰	۵-۲ واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR).....
۴۱	۱-۵-۲ پرایمرها.....
۴۲	۲-۵-۲ پارمترهای مهم و تأثیرگذار در بهینه نمودن PCR.....
۴۲	۳-۵-۲ تنظیم نمودن دمای اتصال.....
۴۲	۴-۵-۲ تنظیم نمودن تعداد چرخه ها.....
۴۳	۵-۵-۲ تنظیمات دیگر.....
۴۳	۶-۲ الکتروفورز.....
۴۵	۷-۲ مارکر HindIII در ایترون ۱۹.....
۴۵	۲-۷-۲ انتخاب پرایمر.....
۴۷	۳-۷-۲ انجام PCR برای مارکر C/T در ایترون ۱۹.....
۴۸	۴-۷-۲ برش با آنزیم HindIII.....
۴۹	فصل سوم: نتایج.....
۵۰	۱-۳ مروری بر اطلاعات جمع آوری شده از بیماران.....
۵۰	۱-۱-۳ نوع مطالعه.....
۵۰	۲-۱-۳ جنسیت افراد مورد مطالعه.....
۵۰	۲-۳ بررسی نتیجه حاصل از استخراج DNA.....
۵۱	۳-۳ نتایج به دست آمده از روش IS-PCR.....
۵۲	۱-۳-۳ نتایج به دست آمده از واکنش PCR.....

۵۴	۲-۳-۳ نتایج حاصل از بررسی خالص سازی در روش IS-PCR
۵۴	۳-۳-۳ نتایج حاصل از بررسی عملکرد آنزیمی
۵۵	۴-۳ نتایج حاصل از بررسی پلی مورفیسم C/T در اینترون ۱۹
۵۵	۱-۴-۳ نتایج انجام واکنش PCR
۵۶	۲-۴-۳ نتایج حاصل از هضم آنزیمی (RFLP) جهت تعیین ژنوتیپ
۵۸	۳-۴-۳ فراوانی آلی C و T در جمعیت بیمار و کنترل
۵۹	۴-۴-۳ آنالیز آماری نتایج بدست آمده برای پلی مورفیسم C/T در اینترون ۱۹
۵۹	۱-۴-۴-۳ اختلاف فراوانی ژنوتیپی و ارتباط آن با بیماری
۶۰	۲-۴-۴-۳ محاسبه ی نسبت بخت ها (OR) و فاصله ی اطمینان برای آنها (CI)
۶۱	۳-۴-۴-۳ رگرسیون لجستیک
۶۲	۵-۴-۳ فراوانی آلی در کل جمعیت
۶۴	۶-۴-۳ محاسبه فراوانی هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت مطالعه شده
۶۳	۱-۶-۴-۳ قانون هاردی-واینبرگ
۶۳	۲-۶-۴-۳ فاکتورهای بر هم زننده تعادل هاردی-واینبرگ
۶۴	۳-۶-۴-۳ فراوانی هتروزیگوسیتی مورد انتظار
۶۵	فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری
۶۶	۱-۴ اهمیت مطالعه بیماری هموفیلی
۶۷	۱-۱-۴ اهمیت مطالعه جهش واژگونی اینترون ۲۲ در ژن F8
۶۸	۲-۴ بررسی نتایج به دست آمده از تکثیر پرایمرهای نرمال (ID.IU) و موتانت (ID. 2U. 3U)
۶۸	۱-۲-۴ بررسی بهینه سازی IS-PCR
۶۸	۱-۱-۲-۴ کیفیت نمونه استخراج شده
۶۸	۲-۱-۲-۴ بررسی غلظت DNA نمونه
۶۹	۳-۱-۲-۴ بررسی عملکرد آنزیم BclII
۶۹	۴-۱-۲-۴ بررسی کیفیت ژنوم تخلیص شده بعد از برش با آنزیم BclII
۷۰	۵-۱-۲-۴ مرحله ساخت DNA حلقوی
۷۰	۶-۱-۲-۴ بررسی کیفیت ژنوم تخلیص شده بعد از مرحله حلقوی شدن DNA
۷۰	۷-۱-۲-۴ بررسی بهینه سازی PCR
۷۰	۳-۴ بررسی نتایج حاصل از توالی یابی قطعات تکثیر شده توسط IS-PCR

- ۴-۳-۱ بررسی تعیین توالی قطعه ۷۰۰ جفت بازی تکثیر شده توسط پرایمرهای نرمال..... ۷۰
- ۴-۳-۲ بررسی تعیین توالی قطعه ۵۰۰ جفت بازی تکثیر شده توسط پرایمرهای موتانت..... ۷۱
- ۴-۴ نتیجه گیری..... ۷۱
- ۴-۵ اهمیت مطالعه مارکر های ژن هموفیلی..... ۷۱
- ۴-۶ نتیجه گیری..... ۷۲
- ۴-۷ بررسی نتایج به دست آمده از همراهی مارکر C/T در جمعیت بیمار و کنترل..... ۷۳
- ۴-۸ مقایسه فراوانی دو آلل C و T در ایران و کشور های مختلف ۷۴
- ۴-۹ نتیجه گیری کلی..... ۷۵
- ۴-۱۰ پیشنهادات..... ۷۶
- فهرست منابع..... ۷۸

فهرست جدول ها

- جدول ۱-۱ طبقه بندی شدت هموفیلی A ۳
- جدول ۱-۲ دستگاهها و وسایل مورد استفاده در این مطالعه ۲۵
- جدول ۲-۲ لیست کامل مواد مورد استفاده در این مطالعه ۲۷
- جدول ۲-۳ ترکیبات مورد استفاده در استخراج و نحوه ساخت آنها ۲۸
- جدول ۲-۴ دستورالعمل تهیه محلول برش دهنده DNA ۳۶
- جدول ۲-۵ تهیه محلول اتصال با آنزیم T4 DNA Ligase به روش اول ۳۸
- جدول ۲-۶ تهیه محلول اتصال با آنزیم T4 DNA Ligase به روش دوم ۳۸
- جدول ۲-۷ پرایمرهای مورد استفاده در روش IS-PCR ۴۱
- جدول ۲-۸ مواد و مقادیر آنها در مخلوط PCR ۴۱
- جدول ۲-۹ برنامه دستگاه ترموسایکلر برای Inverse-Shifting PCR ۴۳
- جدول ۲-۱۰ ترکیبات مورد استفاده در الکتروفورز و نحوه ساخت آنها ۴۴
- جدول ۲-۱۱ پرایمرهای رفت و برگشت مارکر Hind III ۴۷
- جدول ۲-۱۲ مواد و مقادیر آنها در مخلوط PCR ۴۷
- جدول ۲-۱۳ برنامه دستگاه ترموسایکلر برای HindIII ۴۸
- جدول ۲-۱۴ مواد و مقادیر لازم برای آنزیم HindIII ۴۸
- جدول ۳-۱ فراوانی آللی و ژنوتیپی پلی مورفیسم اینترون ۱۹ ۵۸
- جدول ۳-۳ فراوانی های مورد انتظار برای آلل C و T بر اساس فرض استقلال ۵۹
- جدول ۳-۴ فراوانی آللی پلی مورفیسم C/T در اینترون ۱۹ و مقادیر χ^2 و p-value ۶۰
- جدول ۳-۵ جدول محاسبه آماره نسبت بخت ها (OR) ۶۰
- جدول ۳-۶ فراوانی آللی C/T و محاسبه OR با فاصله اطمینان ۹۵ درصد ۶۱
- جدول ۳-۷ رگرسیون لجستیک برای پلی مورفیسم C/T ۶۲
- جدول ۳-۸ فراوانی آللی در جمعیت مورد مطالعه ۶۲

فهرست نمودارها و شکل ها

- شکل ۱-۱ مسیر داخلی و خارجی آبشار انعقادی..... ۷
- شکل ۱-۲ ژن F8 و کپی های 1-Int-22h..... ۱۴
- شکل ۱-۳ نوترکیبی درون کروموزومی 1-Int-22h..... ۱۶
- شکل ۱-۴ بررسی جهش های هموفیلی به روش مستقیم..... ۱۸
- شکل ۱-۵ پلی مورفیسم های درون ژن F8..... ۲۰
- شکل ۱-۲ نمونه ای از پلات دستگاه nanodrop spectrophotometer nd-1000..... ۳۵
- شکل ۲-۲ دستورالعمل مورد استفاده جهت Run کردن محصولات PCR..... ۴۵
- تصویر ۱-۳ نتایج الکتروفورز نمونه های استخراج شده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد..... ۵۱
- تصویر ۲-۳ الکتروفورز ژنوم هضم شده توسط آنزیم BclII..... ۵۲
- تصویر ۳-۳ گرادیانت دمایی برای PCR به روش IS-PCR..... ۵۲
- تصویر ۳-۴ الکتروفورز محصولات به دست آمده از IS-PCR در روش IS-PCR..... ۵۳
- تصویر ۳-۵ طول قطعات تکثیر شده برای پرایمر های نرمال و موتانت در روش IS-PCR..... ۵۳
- تصویر ۳-۴ Thalassaemia PCR برای بررسی کیفیت DNA خاص سازی شده..... ۵۳
- تصویر ۳-۵ PCR نمونه با روش IS-PCR بدون انجام عملیات برش و اتصال..... ۵۳
- تصویر ۳-۶ الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر پلی مورفیسم اینترون ۱۹..... ۵۴
- تصویر ۳-۷ الکتروفورز محصولات PCR پلی مورفیسم اینترون ۱۹ پس از هضم با آنزیم..... ۵۵
- تصویر ۳-۸ الکتروفورز محصولات PCR پلی مورفیسم اینترون ۱۹ پس از هضم با آنزیم..... ۵۶
- نمودار ۲-۳ فراوانی آلی در جمعیت بیمار و کنترل استان کرمانشاه..... ۵۶
- نمودار ۱-۳ فراوانی آلی C و T در کل جمعیت مورد مطالعه..... ۶۲

فصل اول

کلیات و مروری بر مطالعه دیگران

۱-۱ تاریخچه هموفیلی

اولین منابع نوشته شده در مورد هموفیلی، به دست نوشته های اقوام یهودی در قرن دوم برمی گردد؛ قانونی که بر اساس آن، خاخام یهودی، رئیس خاندان یهود، فرزند سوم یک زن را که دو پسر قبلی اش بر اثر شدت خونریزی بعد از ختنه جان باخته بودند، از ختنه معاف کرد (۲)، (۱).

اولین توصیفات که احتمالاً به بیماری هموفیلی اشاره دارد به اواخر قرن ۱۸ برمی گردد که افرادی با شرح حال از درگذشت افراد فوت شده به توصیف این بیماری پرداخته اند؛ Zoll در سال ۱۷۹۱، Consbruch در سال ۱۷۹۳ و ۱۸۱۰ و Rave در سال ۱۷۹۶ همگی خانواده هایی را توصیف کرده اند که مردان خانواده بر اثر ناهنجاری خونریزی طولانی مدت پس از جراحی فوت کرده اند (۳).

الگوی ژنتیک و وراثت هموفیلی در سال ۱۸۰۳ توسط پزشک آمریکایی Jhon Conrad Otto توصیف شد. دو فرم بیماری هموفیلی A و B در سال ۱۹۵۲ توسط Pavlosky شناسایی شد؛ هر دو بیماری وابسته به جنس هستند و در مردان رخ می دهد (۴).

۲-۱ انواع هموفیلی و نحوه توارث آن

۱-۲-۱ هموفیلی A

هموفیلی A^۱ (HA : OMIM306700) یا نقص در فاکتور ۸ انعقادی رایج ترین شکل ناهنجاری خونی است که ۱ در هر ۵۰۰۰ مرد و ۱ در هر ۱۰۰۰۰ زن رخ می دهد. (۵) هموفیلی A بیماری خونی وابسته به X مغلوب است که توسط موتاسیون در ژن فاکتور ۸ (F8) ایجاد می شود (۶).

۲-۲-۱ هموفیلی B

هموفیلی B یا بیماری کریسمس^۲، بیماری وابسته به X مغلوب است که در اثر نقص در فاکتور ۹ انعقادی (ژن F9) رخ می دهد (۷). شیوع آن ۱ در ۳۰۰۰۰ تولد زنده در مردان است (۸).

^۱ hemophilia A

^۲ Christmas disease

۳-۲-۱ هموفیلی C

هموفیلی C یا روزنتال^۳ بیماری اتوزوم مغلوب است که در اثر نقص یا فقدان در فاکتور ۱۱ انعقادی رخ می دهد. میزان شیوع این بیماری بسیار کمتر از دو فرم A و B است. حدود ۱ در هر ۲۰۰۰۰۰ تولد می باشد (۹).

۳-۱ طبقه بندی شدت هموفیلی A

طبقه بندی شدت هموفیلی A بر اساس عملکرد فاکتور انعقادی در محیط *in vitro* است که در جدول ۱-۱ نشان داده شده است. تقریباً ۷۰ درصد افراد هموفیل A از نوع شدید هستند (۱۰).

جدول ۱-۱ طبقه بندی شدت هموفیلی A (۱۰)

Severity	Clotting factor level % activity (IU/ml)	Symptoms	Usual age of diagnosis
Severe	< 1% (< 0.01)	Spontaneous bleeding, predominantly in joints and muscles	1st year of life
Moderately severe	1-5% (0.01-0.05)	Occasional spontaneous bleeding. Severe bleeding with trauma, surgery	Before age 5-6 years
Mild	> 5-40% (0.05-0.40)	Severe bleeding with major trauma or surgery	Often later in life

Clinical severity does not always correlate with the *in vitro* assay result.

۴-۱ ژن فاکتور ۸ (F8)

ژن فاکتور ۸ در سال ۱۹۸۴ توسط Gitschier و Coleagues کلون شد. ژن F8 تنها ژن مرتبط با هموفیلی A است و در انتهای دور بازوی بلند کروموزم X (Xq28) قرار دارد و ۱۸۶ کیلو باز از DNA ژنومی را در بر می گیرد (۱۲).

³ Rosenthal syndrome

ژن F8 شامل ۲۶ اگزون است که اندازه ۲۴ اگزون آن ۶۹ جفت باز تا ۲۶۲ جفت باز است؛ ۲ اگزون باقیمانده (اگزون ۱۴ و ۲۶) تقریباً طویل هستند و به ترتیب ۳۱۰۶ جفت باز و ۱۹۵۹ جفت باز طول دارند (۱۳). بزرگترین توالی های اینترونی ۲۰، ۲۲، ۱۴، ۱۳، ۶، ۱ هستند که از ۱۴ کیلو باز بزرگتر هستند و بزرگترین آن ها اینترون ۲۲ است. اینترون ۲۲ به خاطر سایز بزرگش قابل توجه بوده و دارای توالی های تکراری هست که هر کپی در جایی دیگر روی کروموزوم X حضور دارد (۱۴).

۵-۱ بیوسنتز و ترشح فاکتور ۸

محصول اولیه ژن F8 یک mRNA بالغ به اندازه ۹ کیلوباز است که یک پلی پپتید منفرد ۲۳۵۱ آمینو اسیدی می سازد؛ ۱۹ آمینو اسید اول آن پپتید نشانه آب دوست است و در طی ترشح حذف می گردد. (۱۵) پروتئین بالغ فاکتور FVIII تشکیل شده از سه همولوگ دومین A، دو همولوگ دومین C و تک دومین B که به ترتیب A1-A2-B-A3-C1-C2 از انتهای آمینی به انتهای کربوکسیل قرار گرفته اند. (۱۶). دومین B با ۹۰۸ آمینو اسید بزرگترین دومین پروتئین فاکتور ۸ می باشد. اندازه دومین های A3-A2-A1 به ترتیب ۳۳۶، ۳۴۵ و ۳۳۵ آمینو اسید است و دومین های C1 و C2 به ترتیب ۱۵۵ و ۱۵۲ آمینو اسید دارد (۱۴).

دومین های متفاوت نقش مهمی در عملکرد FVIII ایفا می کنند، زیرا هر دومین شامل قسمت های اتصالاتی خاص برای محصولات متفاوت در مسیر آبشاری انعقاد است (۱۶). فاکتور ۸ که در سلول های کبدی ساخته می شود، به جریان خون ترشح می شود و آماده برای اتصال به فاکتور ون ویلبراند می شود. فاکتور ۸ علاوه بر فاکتور ون ویلبراند^۴ می تواند با پروتئین های متنوع دیگری مانند ترومبین و FX میانکشی دهد. این میانکشی ها نقش مهمی در هموستازی موثر دارند (۱۷).

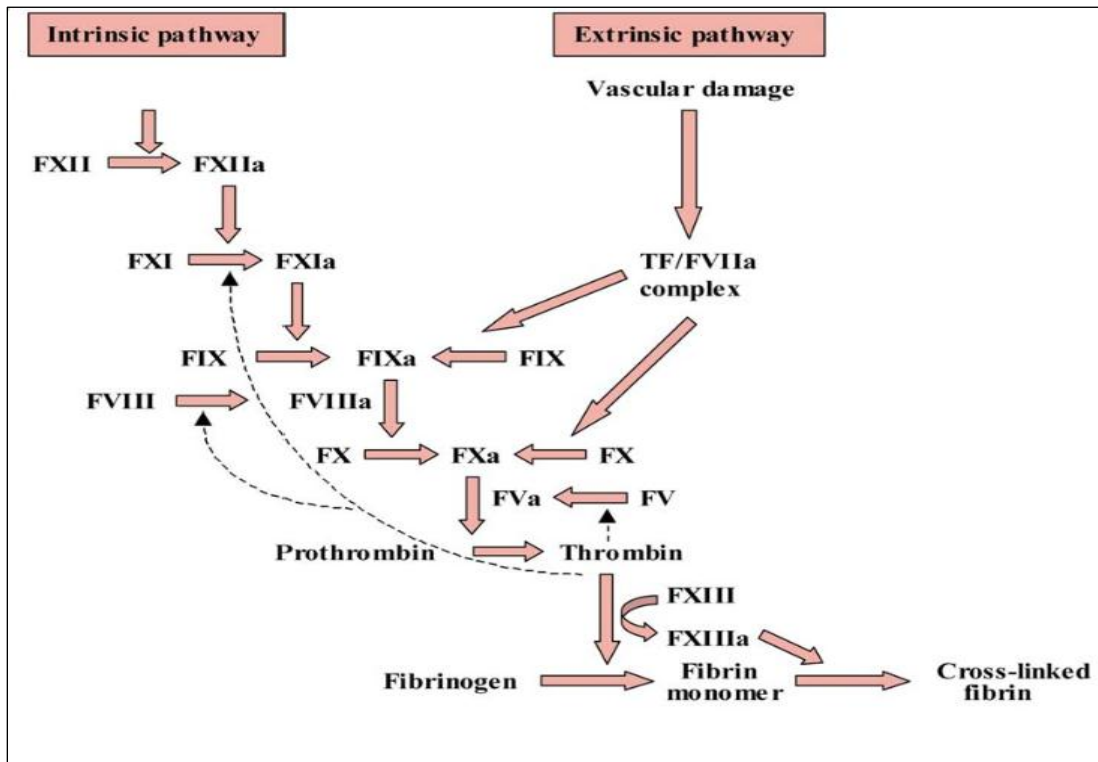
۱-۶ مسیر آبشاری انعقاد

مسیر آبشاری انعقاد شامل آنزیم ها و سوبستراهایی است که در نهایت باعث ایجاد کلاف فیبرین می شود. در این واکنش ها Ca^{2+} و فسفو لیپید (PL) به عنوان کو فاکتور عمل می کنند.

⁴ Von Willebrand factor

FVIIa با غلظت 0/1 nm در پلاسما در جریان خون حضور دارد. (۱۸) فاکتور بافتی (TF) گلیکو پروتئینی است که در اکثر بافت ها بیان می شود و به عنوان کو فاکتور برای FVIIa عمل می کند. TF به صورت غیر قابل دسترس از عوامل انعقادی در بافت ها وجود دارد و هنگامی که بافت آسیب می بیند ، در معرض فاکتورهای انعقادی قرار می گیرد. FVIIa به TF متصل شده (فعال شدن مسیر خارجی) و به عنوان کمپلکسی برای تبدیل FIX به FX عمل می کنند. فاکتور FIXa ، کمپلکس FIXa /FVIIIa /PL را تشکیل داده و FX را به FXa تبدیل می کند. همچنین فاکتور FXa کمپلکس PL / FVa /FXa را برای تبدیل پروترومبین ایجاد می کند در نتیجه پروترومبین به ترومبین تبدیل شده و باعث به اوج رسیدن تبدیل فیبرینوژن به فیبرین می شود. ترومبین باعث فعال شدن FXI به فرم فعال FXIa شده و در نتیجه FIX فعال شده (فعال شدن فید بکی مسیر داخلی) و منجر به تبدیل فیبرینوژن به فیبرین خواهد شد (۱۸,۱۹).

در بیماران هموفیلی که مهار کننده بر علیه FVIII دارند، مسیر داخلی کاملا بسته شده است . بنابراین لازم است که مسیر خارجی انعقاد شدت یابد. در سال ۱۹۹۶، درمان با rFVIIa ، در بیماران هموفیلی دارای مهار کننده انجام گرفت (۲۰).



شکل ۱-۱: مسیر داخلی و خارجی آبشار انعقادی (۲۰)

۷-۱ تشخیص بیماری به وسیله تست های آزمایشگاهی

ارزیابی افراد مشکوک به ناهنجاری خونی شامل شمارش پلاک های خونی و بررسی عملکرد پلاکت ها^۵ (PFA)، زمان فعال شدن نسبی ترومبوپلاستین^۶ (APTT) و زمان پروترومبین^۷ (PT) است. در افراد هموفیل A، همه موارد بالا، بجز آزمایش APTT نرمال است: در بیماران هموفیل شدید و متوسط، APTT طولانی تر است. مقادیر PT باید نرمال باشد؛ مگر در سایر بیماری های کبدی. در بعضی از آزمایشگاه ها APTT به اندازه کافی برای تشخیص هموفیلی خفیف حساس نیست. (۲۱)

^۵ Platelet Function Assay

^۶ Activated Partial Thromboplastin Time

^۷ Prothrombin time