جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خون
دوره ۵ شماره ۲ تابستان ۸۷ (۸۰-۷۳)

بررسی موتاسیون‌های ناحیه پروموتوری ژن فاکتور IX در هموفیلی B

مهدی الهبخشیان[۱]، محمد حسین محمدی[۲]، دکتر قاسم رستگار لاری[۳]، دکتر احمد کاظمی[۴]، دکتر فریدون علا[۵]،

شیرین روانبد[۶]، عاطفه الهبخشیان[۷]

چکیده

سابقه و هدف

هموفیلی B لیدن یک بیماری خونریزی دهنده ارثی است که با بیان تغییر یافته فاکتور IX شرح داده می شود. این شکل از هموفیلی در ارتباط با موتاسیون‌های نقطه‌ای متنوع در محدوده‌ای ۴۰ نوکلئوتیدی از ناحیه پروموتوری ژن فاکتورIX رخ می‌دهد. بیماران کلاسیک هموفیلی B لیدن دارای سطح فاکتور IX پلاسمایی ۰/۱ Units/ml(کمتر از ۱۵٪) در دوران قبل از بلوغ هستند اما متعاقب بلوغ، سطح فاکتور IX در گردش آن‌ها افزایش می‌یابد و در اواسط زندگی به ۶۰٪ سطح نرمال می‌رسد. این مطالعه برای اولین بار به ارزیابی شیوع موارد هموفیلیB لیدن در بین بیماران مبتلابه هموفیلی B در ایران پرداخته است.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی گذشته نگر بود. تعداد ۴۳ بیمار هموفیلی B که به درمانگاه جامع کودکان هموفیل ایران مراجعه کرده بودند مورد ارزیابی قرار گرفتند. استخراج DNA با استفاده از روش پروتئیناز K انجام شد. سپس اگزون شماره ۱ فاکتور IX انعقادی در همه بیماران به وسیله روش PCR تکثیر شد و بعد از آن محصول برای جداسازی موارد دارای موتاسیون در این ناحیه با استفاده از روش CSGE مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها

از بین بیماران دو نفر الگوی هترودوبلکس مرتبط با جهش را روی ژل CSGE از خود نشان دادند. برای تعیین نوع دقیق موتاسیون در این بیماران، DNA این نمونه ها تعیین توالی(sequencing) شد و دو بیمار هموفیلB لیدن شناسایی شدند.

نتیجه گیری

نتایج فوق نشان می دهد که شیوع بیماری هموفیلی B لیدن در بیماران هموفیل B بررسی شده حدوداً ۴/۶ ٪ است و شیوع بالاتر این بیماری را در ایران در مقایسه با سایر مناطق جغرافیایی گزارش شده مطرح می سازد.

کلمات کلیدی: هموفیلی B لیدن، فاکتور IX ، ناحیه پروموتوری

تاریخ دریافت : ۸۶/۵/۲۴
تاریخ پذیرش : ۸۷/۳/۱۳

۱ـ مؤلف مسؤول: کارشناس ارشد هماتولوژی ـ دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ صندوق پستی: ۵۳۳۱-۱۴۱۱
۲ـ کارشناس ارشد هماتولوژی ـ دانشگاه علوم پزشکی ایران و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳- PhD هماتولوژی ـ دانشگاه علوم پزشکی ایران ـ کانون هموفیلی کودکان
۴- PhD هماتولوژی ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران
۵ـ فوق تخصص خون و انکولوژی ـ کانون هموفیلی کودکان
۶ـ کارشناس شیمی ـ کانون هموفیلی کودکان
۷ـ کارشناس ارشد پرستاری ـ مربی دانشکده پرستاری دانشگاه علوم پزشکی تبریز

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

موتاسیون‌های نقطه‌ای در یک ناحیه ۴۰ نوکلئوتیدی از پروموتور فاکتور IX منجر به فرم نادری از هموفیلی B تحت عنوان هموفیلی B لیدن می‌شود. این بیماری حدود ۲٪ موارد هموفیلی B را به خود اختصاص می‌دهد و گزارش‌هایی که تاکنون در ارتباط با هموفیلی B لیدن موجود است، میزان شیوع بیماری را در سوئد حدود ۲/۶٪ اعلام نموده است(۱). مطالعه دیگری که توسط جیانلی و همکاران(۱۹۹۳) در همین رابطه انجام شده است، عدد مشابهی را گزارش کرده است(۲). این بیماری ابتدا در سال ۱۹۷۰ به وسیله ولتکامپ و همکارانش توضیح داده شد و نام خود را از شهر لیدن در هلند گرفت، جایی که اولین بیمار با این اختلال در آن‌جا شناسایی شد(۳). این افراد در طی دوران کودکی از بیماران هموفیلی B غیر قابل افتراق هستند و متعاقب افزایش بیان ژن فاکتورIX پس ازدوران بلوغ علایم بیماری ناپدید می‌شود(۴، ۳). بیماران هموفیلی B لیدن کلاسیک دارای سطح فاکتور IX پلاسمایی ۰/۱ Units/ml در دوران قبل از بلوغ هستند اما متعاقب بلوغ سطح فاکتور IX در گردش خون آن‌ها افزایش می‌یابد و در اواسط زندگی به ۶۰٪ سطح نرمال می‌رسد(۵، ۳).

تا به امروز ۱۸ موتاسیون نقطه‌ای در ۸ نوکلئوتید مختلف(۱۳+، ۸+، ۶+، ۵-، ۶-، ۲۰-، ۲۱-، ۲۶-) در ناحیه پروموتور فاکتور IX تعیین شده است که همه موارد به جز موتاسیون در ناحیه ۲۶- می‌توانند منجر به ایجاد فنوتیپ لیدن شوند. اگر چه بیماران کلاسیک لیدن، هموفیلی شدیدی را در طی دوران کودکی تجربه می‌کنند فنوتیپ بالینی آن‌ها ممکن است بسته به موقعیت و نوع موتاسیون، علایمی را در یک طیف خفیف تا شدید نشان دهد. موتاسیون‌های لیدن در سه ناحیه Cis-acting element از ژن فاکتور IX واقع شده‌اند که به عنوان محل‌های ۳-۱ نامیده می‌شوند و اتصال فاکتورهای رونویسی را به این نواحی مختل می‌کنند. موتاسیون در ناحیه یک، شامل نوکلئوتید (۱+ تا ۲۰+) اتصال Enharciny binding (C/EBP) protein CCAAT/، موتاسیون در ناحیه دو (شامل نوکلئوتیدهای ۱- تا ۱۵-) اتصال HNF-۴ یا Hepatocyte nuclear factor-4 و موتاسیون در ناحیه سه (۱۷- تا ۳۰-) اتصال HNF-4 و گیرنده آندروژن (AR) را مختل می‌کند (۵-۷).

احتمالاً افزایش بیان رونویسی ژن فاکتورIX در حین بلوغ، به دلیل تغییر در اتصال فاکتورهای رونویسی اتفاق می‌افتد. به نظر می‌رسد که اثر هم‌افزایی بین C/EBP و D-site binding protein (DBP)در محل '۵ پروموتور ژن فاکتور IX و واکنش بین گیرنده آندروژن و لیگاندآن در بهبود کلینیکی این بیماران نقش ایفا کند(۸، ۶، ۵). گیرنده آندروژن قادر به ترانس اکتیوکردن پروموتور ژن فاکتور IX است که به وسیله واکنش دادن با عنصر پاسخ‌دهنده به آندروژن Androgen responsive element (ARE) که در ناحیه بین نوکلئوتیدهای ۲۲- و ۳۶- است عمل می‌کند. اتصال گیرنده آندروژن به ARE وابسته به Correct consensus sequence است و همان طور که پیش‌بینی می‌شود تغییرات در این توالی از ترانس‌اکتیویشن به وسیله این گیرنده ممانعت به عمل می‌آورد(۵). هدف از این مطالعه، تعیین میزان بروز موتاسیون‌های ناحیه پروموتوری ژن فاکتور IX در میان جامعه هموفیلی B ایرانی و اجرایی کردن روش‌های تشخیص این جهش‌ها برای شناسایی این افراد، جهت مدیریت بهتر بیماری تا رسیدن به زمان بلوغ می‌باشد.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی گذشته نگر بود. نمونه‌گیری در درمانگاه جامع کودکان هموفیل انجام شد. در بدو ورود بیمار به بخش ژنتیک، پرسش‌نامه ویژه‌ای به او داده شد و شجره‌نامه فرد بیمار نیز با توجه به اطلاعات جمع‌آوری‌شده از فرد هموفیل ترسیم و در پرونده وی بایگانی شد تا با استفاده از شجره‌نامه به دست آمده با سهولت بیشتری بتوان به شناسایی افراد حامل ژن بیماری در آن خانواده پرداخت. با هدف بررسی جهش‌های موجود در ژن فاکتورIX در اگزون‌های ۸-۱، نمونه‌های خون از تعداد ۴۳ نفر از بیماران هموفیلی نوع B ایرانی با شدت‌های مختلف تهیه و DNA آنها با روش پروتئیناز K استخراج شد(۹). جهت ارزیابی کیفیت و کمیت DNA از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. در گام اول اگزون

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده برای PCR فاکتور IX

	آغازگر معکوس	آغازگر مستقیم
آغازگر اگزون ۱	3'- TTT AGT GAA GAA GAC AGC ATC AG-5'	3'-AGC TAC AGG CTG GAG ACA ATA-5'
آغازگر اگزون ۲	3'- AAA GAT TTT CAT TTC TAT GCT CTG C-5'	3'-TTG GCT TTC AGA TTA TTT GGA T-5'
آغازگر اگزون ۳	3'- TAT GGG TTA GAG GGT TGG ACT-5'	3'-TTC ACA AAA CCA TAA CTA AAG GAT A-5'
آغازگر اگزون ۴	3'-TCC AGT TTC AAC TTG TTT CAG A-5'	3'-AAT CAG ACT CCC ATC CCA AT-5'
آغازگر اگزون ۵	3'-AAG GAA GCA GAT TCA AGT AGG-5'	3'-GAC CCA TAC ATG AGT CAG TAG TT-5'
آغازگر اگزون ۶	3'-AAT AGC CTC AGT CTC CCA CCT-5'	3'-TAC TGA TGG GCC TGC TTC TC-5'
آغازگر اگزون ۷	3'- CGA CGT GGG TTC TGA AAT TA-5'	3'-CTA TTC CTG TAA CCA GCA CAC A-5'
آغازگر اگزون ۸	3'-GGA AAG TGA TTA GTT AGT GAG-5'	3'-GTC AGT GGT CCC AAG TAG TC-5'

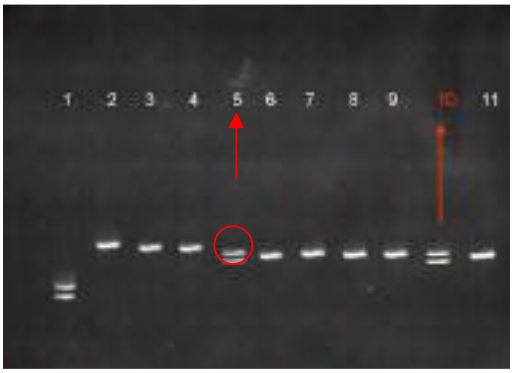
شماره یک بیماران که حاوی ناحیه پروموتوری بود از نظر موتاسیون‌های احتمالی در این قسمت مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس در صورت وجود موتاسیون در این ناحیه، سایر اگزون‌های ژن فاکتور IX مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. توالی ژن فاکتورIX از ژن بانک به شماره(183979970) استخراج شد و سپس آغازگرهای فوق برای ۸ اگزون پروموتور فاکتورIX با استفاده از نرم افزار 3Prime طراحی شدند(جدول ۱).

طبق برنامه PCR ، حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه،۶۰ درجه سانتی‌گراد ۱دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه در ۳۰ سیکل انجام شد. پس از تکثیر، محصولات PCR بر روی پلی اکریل آمید ۸ ٪ با ولتاژ ۱۵۰V و زمان مناسب بر حسب اندازه قطعه الکتروفورز شده و بعد از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید به وسیله تابش نور UV مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس بر اساس روش(conformational sensitive gel electrophoresis) CSGE ، محصولات PCR فوق در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت دناچوریشن و ۶۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ دقیقه برای آنیلینگ، تشکیل DNA هترودوبلکس می‌دهند(۱۰). در ساختار ژل حلال‌هایی نظیر گلیکول و فرمآمید به کار می‌رود به صورتی که در غلظت مناسب تغییرات جزیی را در DNA طی الکتروفورز نشان می‌دهد. اگراین فرضیه که حلال‌ها می‌توانند خمیدگی را افزایش دهند درست باشد، افزایش غلظت حلال‌های دناتوره‌کننده باعث جابجایی در دو باز Mismatch از محور مارپیچ DNA شده و تولید یک حباب می‌کند در نتیجه مانع از تفاوت حرکت DNAهمودوبلکس از DNA هترودوبلکس می‌شود. هم چنین با استفاده از دستگاه ALF express ، نمونه‌های دارای موتاسیون تعیین توالی شدند و موفق به شناسایی موتاسیون A/T در ناحیه ۵+ و موتاسیون A/G در ناحیه ۱۳+ شدیم. سپس همولوژی توالی‌های به دست آمده را با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف مانند بلاست و ژن رانر با نوع طبیعی مطابقت دادیم و موتاسیون ایجادشده را شناسایی کردیم. پس از آن با استفاده از پایگاه داده های بین‌المللی مانند EMBL و ژن بانک، DDBJ (DNA Data Bank of Japan) جهش‌ها را بررسی و جهش‌های یافت‌شده با جهش‌های موجود در این پایگاه داده‌ها مقایسه شد.

یافته ها

در بین ۴۳ نمونه بررسی شده در این مطالعه با توجه به تصویر ژل زیر، باندهای مشاهده شده در ستون‌های شماره ۵ و۱۰، الگوی هترودوبلکس را دارا بودند که مربوط به بیماران B ۲۰ وB ۴۳ می‌باشند و بیانگر این موضوع هستند که این بیماران به احتمال زیاد دارای جهش در ناحیه پروموتوری هستند. در مرحله بعد جهت مشخص نمودن نوع دقیق جهش، این نمونه‌ها تعیین توالی(sequencing) شدند. جایگاه جهش در کروماتوگرام توالی‌های اگزون ۱ بیماران مورد بررسی تشخیص داده شد

که بدین شرح بود: در بیمار B ۴۳ در ناحیه ۱۳+ گوانین جایگزین آدنین شده بود و در بیمار B ۲۰ در ناحیه ۶+ آدنین جایگزین تیمین شده بود. پس از شناسایی جهش در ناحیه پروموتوری در دو بیمار B ۲۰ و B ۴۳ به دلیل این که در ۱٪ بیماران هموفیل B دو جهش متفاوت در دو ناحیه مختلف ژنی اتفاق می‌افتد (۱۱) . از این رو



شکل ۱ : باندهای حاصل PCR , CSGE ازناحیه پروموتوری اگزون ۱ مشاهده می‌شود. در این تصویر نمونه ۱ کنترل مثبت هترودوبلکس می‌باشد که به خوبی می‌توان الگوی نوارهای دو گانه هترودوبلکس را در مورد آن مشاهده نمود. هم چنین در مورد نمونه ۵ و ۱۰ الگوی بارز هترودوبلکس مشاهده می‌شود که مربوط به بیماران B۲۰ وB ۴۳ می‌باشند. نمونه ۱۱هم کنترل منفی است.

سایر اگزون‌ها و دم پلی A (poly A tail) ابتدا به وسیله آغازگرهایی که برای آنها طراحی کرده بودیم تکثیر شدند و سپس برای تایید تکثیر قطعه مورد نظر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪ الکتروفورز شدند. باندهای حاصل را با مارکری که همراه آنها الکتروفورز شده بود مقایسه و از صحت هر یک اطمینان حاصل شد. سپس محصولات PCR مربوط به هر اگزون جهت بررسی وجود یا عدم وجود جهش به وسیله روش CSGE مورد ارزیابی قرار گرفتند در نتیجه این بررسی هیچ‌گونه جهش دیگری علاوه بر جهش در ناحیه پروموتوری اگزون ۱ مشاهده نشد. این موضوع اثبات می‌کرد که بیماران هموفیل B لیدن هستند.

بحث

با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی توسط چندین گروه تحقیقاتی به نظر می‌رسد که ناحیه‌ای که جهش‌های ۱۳+ و ۶+ در آن قرار می‌گیرند(جهش‌هایی که در دو نمونه مثبت مورد مطالعه ما هم شناسایی شدند) اهمیت کمتری نسبت به ناحیه‌ای دارد که جهش‌های ۲۱-، ۲۰- و۶- در آن رخ می‌دهند که باز تایید کننده این موضوع است که موتاسیون‌های ایجاد شده در ناحیه پروگزیمال LSR با فنوتیپ خفیف‌تری همراه می‌باشند(۱۳، ۱۲، ۷).

با نگاه به ناحیه پروموتوری ژن فاکتور IX و هم چنین با رجوع به موتاسیون‌های مرتبط با هموفیلی B لیدن دو احتمال مطرح می‌شود؛ اول این که همه نقاط پروموتورژن فاکتور IX از نظر بیان ژن فاکتور IX حایز اهمیت هستند اما ناحیه ۴۰ نوکلئوتیدی که موتاسیون‌های منحصر به فرد مرتبط با هموفیلی B لیدن در آن جا اتفاق می‌افتند بیشتر مستعد بروز جهش است. احتمال دیگر این که همه نقاط پروموتورژن فاکتور IX از نظر استعداد بروز موتاسیون یکسان هستند اما اهمیت این ناحیه ۴۰ نوکلئوتیدی در عملکرد ناحیه پروموتوری بیشتر از سایر نواحی است و رخداد جهش در این ناحیه مرتبط با بروز علایم بالینی خواهد بود که به نظر می‌رسد احتمال دوم صحیح‌تر باشد ولی احتمال اول هم ممکن است تا حدودی در این موضوع نقش داشته باشد. ناحیه‌ای که موتاسیون در آن اتفاق می افتد تحت عنوان Leyden Specific Region یا ناحیه خاص لیدن شناخته می‌شود. نوکلئوتیدهای ۶-، ۲۱- و ۲۲- ناحیهLSR در بین پستانداران گوناگون محافظت شده است که نشان دهنده اهمیت زیاد LSR می‌باشد(۱۵، ۱۴، ۶).

افراد مبتلا به این بیماری در سنین کودکی سطوح بسیار پایینی از بیان ژن فاکتور IX را دارند که این موضوع نشان می‌دهد اتصال فاکتورهای رونویسی به این ناحیه یا سایر ناحیه‌های پروموتوری به طور کامل مختل نشده است(۷).

از سوی دیگر میزان بیان ژن فاکتور IX در بیشترین مقدار خود به بالای ۸۰٪ نمی‌رسد که این نشان می‌دهد ناحیه جهش یافته دارای نقش مهمی در بیان ژن مربوطه است و سایر مکانیسم‌های جبرانی نمی‌توانند به طور کامل اختلال در اتصال فاکتورهای رونویسی به آن ناحیه را جبران نمایند. علاوه بر افزایش سطح فاکتورIX در افراد هموفیل B لیدن، در افراد طبیعی هم سطح فاکتور IX به

طور ملایم پس از بلوغ افزایش می‌یابد که این خود دو احتمال را مطرح می‌کند، یا تغییرات هورمون‌های آندروژنی بالاخص تستوسترون به صورت مستقیم بیان ژن فاکتور IX را با اتصال به گیرنده آندروژن افزایش می‌دهد و یا این که به صورت غیرمستقیم و از طریق افزایش بیان سایر فاکتورهای رونویسی این کار انجام می‌شود(۱۶، ۷). گر چه هنوز هیچ‌کدام از موارد فوق اثبات نشده، اما افزایش سطح فاکتورهای رونویسی در مراحل مختلف بلوغ و تکامل نیز نشان داده شده است که این خود می‌تواند تحت تاثیر آندروژن باشد. اما این احتمال هم وجود دارد که هر دو فرایند فوق به صورت مشترک حایز اهمیت باشند.

کراس لی وهمکارانش در سال ۱۹۹۰ بیماری دو برادر را با موتاسیون G(-6)A شرح دادندکه در دوران کودکی به فرم خفیفی از هموفیلی B لیدن مبتلا بودند.در یکی از آنها در سن ۹ سالگی سطح فاکتورIX به حدود ۱۳ درصد مقادیر نرمال افزایش یافته و در سن ۳۰ سالگی نیز سطح فاکتور به حدود ۷۰ درصد مقادیر نرمال رسیده بود. الگوی مشابهی در برادر دوم مشاهده می‌شد (۵). بر خلاف تحقیقات کراس لی و همکارانش، در سال ۱۹۹۳ ویداد وهمکارانش دو بیمار هموفیل B را شرح دادند که دارای موتاسیون در A (-6) G بودند و فرم خفیفی از هموفیلی B لیدن را در مقایسه با هموفیلی B لیدن کلاسیک تجربه می‌کردند. با این وجود بر خلاف بیماران مطالعه شده توسط کراس لی، در این افراد حتی در سن ۱۵ سالگی نشانه هایی در بهبودی آشکار نگردید (۱۷، ۱۵، ۵). در کل به نظر می رسد موتاسیون در ۶- با علایم بالینی خفیف‌تری نسبت به سایر انواع همراه می‌باشد. با توجه به مطالب فوق این موضوع پیشنهاد می‌شود که مکانیسم‌های دیگری علاوه بر تغییرات هورمونی ناشی از بلوغ، محل و نوع موتاسیون در بهبودی افراد مبتلا به هموفیلی B لیدن نقش ایفا می‌نمایند. یکی از عوامل مهمی که بر روی شدت بیماری تاثیر می‌گذارد نوع جایگزینی است. برای مثال موتاسیون A (-6) G با علایم بالینی خفیف همراه است در حالی که موتاسیونC (-6) G با علایم بالینی شدید همراه است به علاوه افراد دارای موتاسیون G(-6)C در بهبودی پس از بلوغ تاخیر داشته و سطوح پائین تری از فاکتور IX را در دوران بهبودی دارند. با بهره‌گیری از روش CSGE که در درمانگاه جامع کودکان هموفیل ایران راه‌اندازی شده، با استفاده از ژل‌های کوچک و اعمال تغییراتی در روش آزمایش توانستیم در وقت و هزینه به طور قابل توجهی صرفه‌جوئی کنیم. این تغییرات، تفاوتی را در صحت آزمایش ایجاد نکرد.

این مطلب که افزایش بعد از بلوغ سطح فاکتور IX ویژگی بیماران هموفیل B لیدن است به تدریج پذیرفته شده است. در این بررسی دو بیمار با جهش‌های (A/T) در۶+ و (A/G) در ناحیه ۱۳+ در دوران کودکی به عنوان یک هموفیل B شناسایی شده بودند که به تدریج و با رسیدن به دوران پس از بلوغ بهبود یافته‌اند و هر دو بیمار دارای سطوح پایینی از فاکتور IX (حدود ۵ درصد) در دوران کودکی بوده‌اند که به تدریج و در طی مراحل مختلف رشد سطح فاکتور افزایش یافته و هم اکنون حدود ۵۰ تا ۶۰ درصد مقادیر نرمال است. این بیماران در دوران قبل از بلوغ به طور نامتناوب و تنها در موارد نیاز، کنسانتره فاکتور IX دریافت کرده‌اند و پس از بلوغ هیچ گونه کنسانتره انعقادی دریافت ننموده‌اند که با اطلاعاتی که ما در مورد این بیماری داریم کاملاً همخوانی دارد و نشان می‌دهد که این افراد در دوران پس از بلوغ به بهبودی دست یافته‌اند. به علاوه این افراد فرم خفیفی از هموفیلی B لیدن را در دوران کودکی تجربه کرده‌اند.

نتیجه‌گیری

ما در این بررسی موفق به یافتن دو بیمار متفاوت مبتلا به هموفیلی B لیدن شدیم. تشخیص و افتراق هموفیلی B لیدن از نوع کلاسیک سبب می‌شود که در بیمارانی که مورد تشخیص هموفیلی B قرار گرفته‌اند امید به آینده و زندگی ایجاد گردد. در حالی که با علم ابتلا به بیماری هموفیلی B لیدن وتوجه به قابلیت بهبود آن، نگرانی بیمار و والدین وی به میزان زیادی منتفی خواهد گردید. با مشاوره‌های پیش از تولد و قبل از ازدواج می‌توان اولاً خانم‌های بارداری را که جنین آن‌ها با روش‌های غیرمستقیم مبتلا به هموفیلی B تشخیص داده شده است، از نوع خاص این بیماری آگاه ساخت و از سقط جنین‌های احتمالی و پنهانی جلوگیری

نمـود، همچنـین اگـر ایـن افـراد در دوران پـس از تولـد تـشخیص داده شـوند والـدین را آگـاه نمـود تـا در دوران کودکی به خوبی تحت درمان‌های حمایتی قـرار گیرنـد. در پایـان ایـن کـه کـاملاً روشـن اسـت مکانیـسم عملکـرد پروموتـور ژن فـاکتور IX پیچیـدگی بـالایی دارد کـه بـا دستکاری نواحی با اهمیت پروموتوری، می‌توان میزان بیـان این ژن را افـزایش داده و در تولیـد صـنعتی فـاکتور IX در حوزه بیوتکنولوژی پزشـکی از آن بهـره‌بـرداری نمـود. بـا نتایج به دست آمده در این مطالعه (شیوع حـدود۴/۶٪) بـه نظر می‌رسد کـه همـوفیلی B لیـدن در ایـران دارای شـیوع بیشتری نسبت به مقادیر گزارش شـده از سـایر نقـاط دنیـا باشد که اثبات این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مدیریت وکارکنـان مرکـز همـوفیلی کودکان وگروه هماتولوژی دانـشگاه علـوم پزشـکی ایـران نهایت تشکر وقدردانی را دارند.

References :

1- Ljung R, Petrini P, Tengborn L, Sjörin E. Haemophilia B mutations in Sweden: a population-based study of mutational heterogeneity. British Journal of Haematology 2001; 113 (1): 81-6.
2- Giannelli F, Green PM, High KA, Sommer S, Poon MC, Ludwig M. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions. Nucleic Acids Research 1993; 21(13): 3075-87.
3- Briet E, Betina RM, Van Tilburg NH, Veltkamp JJ. Hemophilia B leyden: a sex linked hereditary disorder that improved after puberty. N Engl J Med 1982;306(1):788-95.
4- Kurachi S, Funrkawa M, Salier JP, Wu CT, Wilson EJ, French FS, *et al*. Regulatory mechanism of human factor IX gene: protein binding at leyden specific region. Biochemistry 1994;33(6):1580-1591.
5- Crossley M, Ludwig M, Stowell KM, De Vos P, OLek K, BrownIee GG. Recovery from hemophilia B leyden: an androgen-responsive element in factor IX promoter. Science 1992;257(5068):377-379.
6- Reijnen MJ, Peerlinch K, Maasdam D, Bertina RM, Reitsma PH. Hemophilia B leyden: substitution of thymine for guanine at position-21 results in a disruption of hepatocyte nuclear factor 4 binding site in factor IX promoter. Blood 1993;82(1):151-158.
7- Picketts DJ, Lillicrap DP, Mueller CR. Synergy between transcription factor DBP and C/EBP compensates for a hemophilia B leyden factor IX mutation .Nature Genet 1993;3(2):175-179.
8- Naka M, Brownlee GG. Transcription regulation of the human factor IX promoter by the orphan receptor super family factor, HNF4, ARP and COUP/Ear3. British Journal of Hematology 1996;92(1):231-237.
9- Rastegar lari G, Enayat MS, Arjang Z, Lavergne J, Ala F. Identification of intron 1 and 22 inversion mutations in the factor VIII gene of 124 iranian families with severe hemophilia A. Hemophilia 2004;10(4):410-411.
10- Hinks JL, Winship PR, Makris M, Preston FE, Peake IR, Goodeve AC. A rapid method for haemophilia B method detection using conformation sensitive gel electrophoresis. Br J Haematol. 1999; 104 (4): 915-919.
11- Ravij K, Pruthi, MBBS. Hemophilia: A practical approach to genetic testing. Mayo Proc. 2005; 80 (11): 1485-1499.
12- Reijnen MJ, Sladek FM, Bertina RM, Reitsma P H. Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. Natl Acad Sci USA 1992;89(14):6300-6303.
13- Picketts DJ, Mueller CR, Lillicrap DP. Transcription control of factor IX gene : analysis of five cis-acting elements and deleterious effects of naturally occurring hemophilia B leyden mutations. Blood 1994;84(9): 2994-3000.
14- Yoshitake S, Scbach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi W. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX . Biochem J 1985 ;24(14):3736-3750.
15- Vidaud D, Tartary M, Costa JM, Bahnak BR, Gispat Sanchez S, Fressinaud E, *et al*. Nucleotide substitution at 6 position in the promoter region of the factor IX gene result in different severity of hemophilia B leyden: consequence for genetic counseling. Hum Genet 1993 ;91(2):241-246.
16- Boccia LM, Lillicrap D, Newcombe K, Mueller CR. Binding of the Ets factors GA-binding protein to an upstream site in the factor IX promoter is a critical event in transcription. Mol cell Biol 1996;16(5):1929-1935.
17- Crossley M, Winship PR Austen DEG, Rizza CI, Brownlee GG. A less severe form of haemophilia B leyden. Nucleic Acids Research 1990;18(15):4633-4639.

Mutation detection in promoter region of coagulation factor IX in hemophilia B

Allah Bakhshian M.[1](MS), Mohammadi M.H.[2,3](MS), Rastegar lari Gh.[2,4](PhD), Kazemi A.[2](PhD), Ala F.[4](MD), Ravanband Sh.[4](BS), Allah Bakhshian A.[5](MS)

[1]Medical School of Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
[2]Iran Uuniversity of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center, Tehran, Iran
[4]Center of Pediatric Hemophilia, Tehran, Iran
[5]Tabriz University of Medical Sciences,Iran

Abstract

Background and Objectives

Hemophilia B Leyden is an X chromosome-linked bleeding disorder characterized by an altered developmental expression of blood coagulation factor IX. This form of hemophilia has been found to be associated with a variety of single point mutations encompassing a 40-nucleotide region in factor IX promoter region. Mutations in factor IX gene promoter though relatively rare (about 2% of total) are important because they can give rise to the unique hemophilia B Leyden phenotype.

Materials and Methods

Our objective was to study mutations in exon-1 in 43 Iranian hemophilia B patients to recognize possible cases of hemophilia B Leyden. Exon-1 of factor IX gene was amplified by PCR; then, conformational sensitive gel electrophoresis (CSGE) was used to distinguish cases having mutations in this region.

Results

Two cases showed band shifts on CSGE. Exon-1 of the patients was directly sequenced. We found two different mutations in exon-1: the A/T mutation at +6 and the A/G mutation at +13.

Conclusions

The prevalence of hemophilia B leyden in B hemophilia patients (4.6%) in our results shows a higher frequency rate in Iran compared to that of other reported countries.

Key words: Hemophilia B leyden, Factor IX, Promoter region
SJIBTO 2008; 5(2): 73-80

Received: 18 Aug 2007
Accepted: 2 June 2008

Correspondence: Allah Bakhshian M., MS of Hematology. Medical School of Tarbiat Modarres University. P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88011001; Fax : (+9821)88011001
E-mail: *Mbakhshian360@yahoo.com*