Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 18(103): 64-72

Analysis of Genetic Variation of rs4898352 Marker in F8 Gene Region as a Highly Informative Marker for Stidy of Hemophilia A in the Isfahanian Population

Zahra Soroush[1], Amin Karimi[1], Sadegh Valian Boroujeni[2*]

1- MSc in Molecular Genetics, Department of Biology, Isfahan University, Isfahan, Iran.
2- Professor, PhD in Midical Genetics, Department of Biology, Isfahan University, Isfahan, Iran.

Received: 4 May 2015, Accepted: 9 Sep 2015

Abstract

Background: Hemophilia A is an X-linked bleeding disorder caused by heterogenous mutations in factor VIII gene that encodes coagulation factor VIII (F8) protein. Due to the high heterogeneity of mutations, large size (186 kb) and structural complexity of the F8 gene, direct mutation analysis is costly and time consuming. Alternatively, linkage analysis using informative polymorphic markers such as single nucleotide polymorphism (SNP) markers has been introduced as a rapid and cost effective method for hemophilia A carrier detection in families with an affected individual. Several SNP markers associated with the F8 gene region have been studied.

Materials and Methods: In this exprimental study, the characteristics of A/T SNP (rs4898352) as an informative marker located in intron 18 of F8 gene region was investigated in Isfahanin population. rs4898352 marker was genotyped using tetra primer ARMS PCR method followed by agarose gel electrophoresis in 140 unrelated control healthy females in mentioned population. New primers were designed for rs4898352 marker using the oligo 7 software. The allele frequency, degree of heterozygosity and Hardy-Weinberg equilibrium were estimated by use of Genepop program. The polymorphism information content (PIC) value was estimated using the Powermarker software.

Results: The results showed that the allele frequency of rs4898352 polymorphism for A and T alleles was 0.482 and 0.518, respectively. The observed heterozigosity rate was 60%. Analysis of Hardy-Weinberg Equilibrium demonstrated that the Isfahan population was in equilibrium ($p>0.05$) for rs4898352 marker. Moreover, analysis of PIC value revealed that this marker could be considered as a highly informative marker in the mentioned population.

Conclusion: Together, the data suggested that rs4898352 could be introduced as an informative marker for molecular diagnosis of hemophilia A in Isfahan Population

Keywords: Factor VIII, Genetic linkage, Hemophilia A, Isfahan population, Single nucleotide polymorphism

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Email: svallian@biol.ui.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۸، شماره ۱۰ (شماره پیاپی ۱۰۳)، دی ۱۳۹۴، ۷۲-۶۴

بررسی تنوع ژنتیکی مارکر rs4898352 در ناحیه ژنی F8 به عنوان یک مارکر گویا در مطالعه بیماری هموفیلی A در جمعیت اصفهان

زهرا سروش[۱]، امین کریمی[۱]، صادق ولیان بروجنی[۲*]

۱- کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استاد، دکترای ژنتیک پزشکی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: هموفیلی A یک اختلال خون‌ریزی دهنده وابسته به جنس مغلوب است که به علت جهش‌های گوناگون در ژن فاکتور ۸ که پروتئین انعقادی فاکتور ۸ را کد می‌کند، رخ می‌دهد. با توجه به درجه بالای هتروژنی جهش‌ها، بزرگی اندازه (۱۸۶kb) و پیچیدگی ساختار ژن فاکتور ۸، آنالیز مستقیم جهش‌ها پرهزینه و زمان‌بر است. بنابراین آنالیز پیوستگی با استفاده از مارکرهای پلی‌مورفیسم اطلاع دهنده مانند مارکرهای پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP)، به عنوان روشی سریع و مقرون به صرفه برای تشخیص حاملین هموفیلی A در خانواده‌های بیمار معرفی شده است. مارکرهای چند شکلی تک نوکلئوتیدی متعددی در ناحیه ژنی F8 گزارش شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، خصوصیات و هم‌چنین اطلاع دهندگی مارکر A/T SNP (rs4898352) واقع در اینترون ۱۸ ناحیه ژنی F8 در جمعیت اصفهان مورد مطالعه قرار گرفت. تعیین ژنوتیپ مارکر rs4898352 با استفاده از تکنیک tetra primer ARMS PCR و به دنبال آن الکتروفورز با ژل آگارز در ۱۴۰ زن سالم غیرخویشاوند در جمعیت مزبور انجام شد. آغازگرهای جدید با استفاده از نرم افزار الیگو ۷ برای مارکر rs4898352 طراحی شدند. برای تعیین میزان فراوانی آللی، درجه هتروزیگوسیتی و تعادل هاردی-وینبرگ از نرم افزار GenePop و برای تخمین مقدار فاکتور ظرفیت اطلاعاتی پلی مورفیسم (PIC) از نرم افزار Powermarker استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دادندکه فراوانی آللی پلی‌مورفیسم rs4898352 برای آلل A و T به ترتیب ۰/۴۸۲ و ۰/۵۱۸ می‌باشد. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۶۰ درصد بود و مشخص شد که جمعیت اصفهان برای مارکر rs4898352 در تعادل هاردی-وینبرگ می‌باشد($p>0/05$). به علاوه، بررسی مقدار PIC مارکر مزبور حاکی از اطلاع دهندگی شدید آن در جمعیت اصفهان می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی، داده‌ها نشان دادند که مارکر rs4898352 را می‌توان به عنوان یک مارکر آگاهی‌دهنده در بررسی مولکولی بیماری هموفیلی A در جمعیت اصفهان معرفی کرد.

واژگان کلیدی: فاکتور ۸، پیوستگی ژنتیکی، هموفیلی A، جمعیت اصفهان، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی

***نویسنده مسئول:** ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، گروه زیست شناسی

Email:svallian@sci.ui.ac.ir

مقدمه

هموفیلی A شایع‌ترین اختلال مربوط به فاکتورهای انعقادی با وراثت وابسته به جنس مغلوب است. شیوع آن ۱ در هر ۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ مرد بدون تفاوت نژادی در سراسر دنیا می‌باشد. علت این بیماری کمبود یا نقص ساختاری پروتئین فاکتور ۸ است. شدت بیماری هموفیلی A به میزان کمبود فاکتور ۸ بستگی دارد این بیماری به سه گروه شدید (سطح فاکتور۸ کمتر از ۱ درصد)، متوسط (بین ۱ تا ۵ درصد) و خفیف (۵ تا ۴۰ درصد) تقسیم‌بندی می‌شود. این گروه‌ها به ترتیب ۴۳، ۲۶ و ۳۱ درصد بیماران با هموفیلی A را شکل می‌دهند. توالی ژنومی و cDNA مربوط به ژن فاکتور VIII برای اولین بار در سال ۱۹۸۴ کلون یابی و توالی‌یابی شد. فاکتور ۸ به واسطه‌ی ژن بزرگی با اندازه تقریبی ۱۸۶Kb که شامل ۲۶ اگزون است رمزگذاری می‌شود که این ژن در انتهای بازوی بلند کروموزوم X روی رشته منفی قرار گرفته است (Xq۲۸). طولmRNA فاکتور ۸ حدود ۹ Kb است که یک پروتئین بالغ با ۲۳۳۲ اسیدآمینه با وزن مولکولی تقریباً ۹۰۰ کیلودالتون را رمز می‌کند(۱، ۲).

جهش‌های عامل بیماری هموفیلی A شامل: ۱) جهش‌های ساختاری و یا تغییر در توالی ژن فاکتور ۸، ۲) جهش‌هایی در رابطه با میان‌کنش پروتئین فاکتور ۸ با فاکتورهای داخل سلولی و یا خارج سلولی و ۳) جهش‌های ناشناخته‌ای در رابطه با نبود یا کمبود بیان یا تجزیه سریع mRNA پروتئین فاکتور ۸ می‌باشند. تاکنون بیش از ۲۰۰۰ نوع جهش ژنی مرتبط با هموفیلی A شناسایی شده است که عمده‌ترین جهش‌ها وارونگی است، به طوری که ۴۰ تا ۵۰ درصد افراد به هموفیلی A شدید ناشی از جهش واژگونی در اینترون ۲۲ مبتلا هستند. تقریباً در ۵ تا ۱۰ درصد افراد مبتلا به هموفیلی شدید، جهش ناشی از وارونگی در اینترون۱ است. سایر جهش‌ها مانند حذف‌های اگزونی و جهش‌های نقطه‌ای نیز برای هموفیلی A گزارش شده است(۳، ۴).

از نظر تشخیصی، افراد مبتلا به هموفیلی A شدید ابتدا برای وارونگی اینترون ۲۲ غربال‌گری می‌شوند. در صورت منفی بودن، بیمار از نظر وارونگی اینترون ۱ مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این مرحله، حدود نیمی از بیماران مبتلا به هموفیلی A شدید شناسایی می‌شوند. سپس بیماران فاقد وارونگی اینترون ۲۲ و اینترون ۱ نیاز به بررسی مولکولی بیشتری دارند که می‌تواند به صورت تشخیص مستقیم جهش یا آنالیز پیوستگی صورت گیرد. به دلیل متنوع بودن جهش‌ها، آنالیز مستقیم پرهزینه و وقت‌گیر می‌باشد. از این رو، انتقال جهش‌ها با روش آنالیز پیوستگی با استفاده از مارکرهای پلی مورفیسم DNA به طور ویژه مورد بررسی قرار می‌گیرد(۵).

پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در واقع به عنوان جهش در یک باز منفرد در توالی DNA که فراوانی آن در جمعیت بیشتر از ۱ درصد باشد تعریف می‌شوند که با توجه به پراکندگی زیاد آن‌ها در ژنوم، امروزه برای آنالیز پیوستگی و تشخیص حاملان بیماری‌ها بسیار مورد توجه می‌باشند(۶).

در این مطالعه و در مجموع، مارکرهای ژن‌های وابسته به X مرتبط با بیماری، عمدتاً از جمعیت زنان استفاده می‌شود، زیرا با تعیین ژنوتیپ هر زن اطلاعات مربوط به دو کروموزوم X به دست می‌آید. این بدان معناست که در یک مطالعه جمعیتی از هر فرد مونث دو برابر اطلاعات نسبت به مذکرها به دست می‌آید. هم‌چنین در بررسی مردان یک خانواده احتمال این که کروموزوم مشابه با آن‌ها به ارث رسیده باشد و دو بار یک کروموزوم X گزارش شده باشد و اطلاعات آن آنالیز شود وجود دارد. در واقع فقط زنان به عنوان مراجعان برای تشخیص ناقلان بیماری هموفیلی محسوب می‌شوند(هتروزیگوسیتی).

مارکر rs4898352 در ابتدای اینترون ۱۸ ژن F8 قرار گرفته است و دارای دو آلل A و T می‌باشد. این مارکر bclI/intron 18 نیز نامیده می‌شود، زیرا دارای جایگاه برش برای آنزیم محدودکننده bclI می‌باشد. خصوصیات جمعیتی و ژنتیکی این مارکر در جمعیت‌های مختلف بررسی

شده است. نتایج نشان دادند که در اکثر جمعیت‌ها مارکر مزبور می‌تواند به عنوان مارکری اطلاع‌دهنده در شناسایی جهش‌های عامل هموفیلی A به روش غیر مستقیم مورد استفاده قرار گیرد(۷). به علت آگاهی‌دهندگی مناسب مارکر rs4898352، این مارکر در آزمایشگاه‌های تشخیصی ژنتیک به منظور تشخیص حاملان بیماری هموفیلی A در شهرهای ایران و سایر کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد. فاکتورهای ژنتیک جمعیت مثل فراوانی آللی و میزان هتروزیگوسیتی در لوکوس‌ها به طور مستقیم در ارزیابی مناسب آگاهی‌دهندگی اهمیت دارند. با توجه به این که ویژگی‌های جمعیتی هر مارکر پلی‌مورفیسم بسته به نوع جمعیت متفاوت است، باید این مارکر مفید در تمام جمعیت‌ها مورد بررسی قرار گیرد. اطلاعاتی در خصوص مارکر مزبور در جمعیت اصفهان در دسترس نیست.

در این مطالعه، ژنوتیپ افراد برای مارکر rs4898352 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با روش تقویت تتراپرایمر مستقیم جهش نسوز واکنش زنجیره ای پلی مراز(T-ARMS-PCR) تعیین و مشخصات جمعیتی این مارکر در جمعیت زنان کنترل در جمعیت اصفهان معین گردید.

مواد و روش‌ها

با توجه به این که در مطالعات مربوط به عدم تعادل پیوستگی نمونه‌ای به اندازه حداقل ۱۰۰ فرد غیر خویشاوند ضروری است(۸)، در این مطالعه تجربی، نمونه‌گیری خون از ۱۴۰ زن غیرخویشاوند سالم از نظر بیماری هموفیلی A با کمک مرکز ژنتیک پزشکی اصفهان انجام شد. این جمعیت از زنان، در بازه زمانی مهر تا اسفند ۱۳۹۲ به طور تصادفی از جمعیت استان اصفهان انتخاب شد. به این ترتیب که پس از اخذ رضایت نامه کتبی از تمام افراد،۱۰میلی لیتر خون تام از افراد در لوله حاوی یک میلی‌لیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مول ریخته شد و پس از ثبت اطلاعات آن‌ها بر روی آن تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA نمونه‌های خون به روش استاندارد فنل-کلروفرم استخراج گردید. برای بررسی خلوص DNA ژنومی به روش کیفی از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد و مقدار نمونه مورد استفاده براساس شدت باندها جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد تخمین قرار گرفت. هم‌چنین ارزیابی کمی DNA ژنومی با استفاده از میزان جذب نور محلول حاوی DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر با اسکپتروفتومتر (Eppendroff AG) صورت گرفت.

طراحی پرایمرهای سیستم Tetra Primer ARMS PCR

در این مطالعه از روش T-ARMS PCR برای تعیین ژنوتیپ افراد برای مارکر rs4898352 استفاده شد که این روش نسبت به روش پلی مورفیسم قطعه طولی محدود (RFLP) بسیار کم هزینه‌تر، آسان‌تر و سریع‌تر است. این روش به دو پرایمر خارجی و دو پرایمر داخلی و اختصاصی آلل برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی نیاز دارد. برای افزایش اختصاصی بودن اتصال پرایمرهای داخلی در روش T-ARMS PCR، سومین باز از سمت '۳ دارای یک جفت باز اشتباه می‌باشد که این امر باعث می‌شود پرایمرهای داخلی که آخرین باز انتهای '۳ آن‌ها برای یک آلل خاص از پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی طراحی شده است، در صورتی که ژنوم فرد فاقد آلل مربوطه باشد، با وجود این جفت باز اشتباه اضافی اتصال صورت نگیرد و باند مثبت کاذب مشاهده نشود(۹).

طراحی تترا پرایمرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزار الیگو ۷ صورت گرفت. طراحی پرایمرها به گونه‌ای صورت گرفت که طول باند هر ۲ آلل SNP حداقل ۷۰ باز با یکدیگر تفاوت داشته باشد تا به راحتی در ژل آگارز قابل تشخیص باشند. چون هر چهار پرایمر در یک واکنش PCR استفاده می‌شوند دمای ذوب (Tm)آن‌ها با کمترین اختلاف (حداکثر ۲ درجه) طراحی می‌گردد. توالی پرایمرهای داخلی و خارجی پیش رو و پرایمرهای داخلی و خارجی پس رو به صورت جدول ۱ می‌باشد. با انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ۳ نوع باند برای فرد هتروزیگوت و ۲ نوع باند برای فرد هموزیگوت حاصل می‌شود. برای تایید

صحت عملکرد این سیستم برای مارکر مورد نظر، در اولین قدم چند نمونه زن هتروزیگوت با استفاده از روش ARMS PCR شناسایی شدند. به این صورت که برای هر نمونه دو ویال در نظر گرفته شد. سپس در هر ویال تنها یکی از پرایمرهای داخلی و یکی از پرایمرهای خارجی ریخته شد تا تنها یکی از آلل‌های مارکر مورد نظر در هر ویال تکثیر شود. سپس با استفاده از روش تعیین توالی یکی از نمونه‌های هتروزیگوت، صحت باندهای آلل‌های اختصاصی فرد هتروزیگوت تایید شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر قطعه پلی‌مورفیک

IF:پرایمر پیش رو داخلی، IR: پرایمر پس رو داخلی، OF: پرایمر پیش رو خارجی، OR: .پرایمر پس رو خارجی

پلی مورفیسم	آلل	اندازه قطعه تکثیر شده (جفت باز)	توالی آغازگر (جفت باز)
rs4898352	A	۲۴۸	OF: 5'- GGA TGA CTA CTG GTG CCC TAT GG -3' IR: 5' -GGC ACT GGG AAC ACA ATC AGT AAT -3'
	T	۱۳۷	IF: 5'- GAG CAT GGA GCT TGT CTG CTT CGT -3' OR: 5-'GGC ACT GTA CAA TCT CTA TCC AGG-3'
	اندازه قطعه کنترل: ۳۳۸bp		

مواد مورد استفاده جهت تکثیر ناحیه مورد نظر DNA از شرکت سیناژن خریداری شد. شرایط دمایی بهینه برای تکثیر DNA ژنومی از طریق دستگاه ترموسایکلر شرکت (پندورف، آلمان) بدین صورت بود: ۵ دقیقه تحت دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشت رشته، ۳۵ چرخه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها، ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور گسترش نهایی رشته شرایط واکنش T-ARMS PCR برای مارکر rs4898352 بعد از بهینه سازی‌های فراوان شامل موارد ذیل بود: ۰/۵ میکرولیتر از دو پرایمر خارجی، ۱ میکرولیتر از پرایمر پس رو داخلی (۱۰pm)، ۱/۵ میکرولیتر از پرایمر پس رو داخلی (۱۰pm)، ۰/۲۵ میکرولیتر از پلی مراز Taq DNA (۵ واحد بر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر از مخلوط dNTP (۱۰ میلی مول)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X)، ۱/۲۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ (۵۰ میلی مول) و ۲ میکرو لیتر از DNA (۸۰ نانوگرم) که با آب مقطر دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۵ دقیقه به ولتاژ ۸۰ ولت رسانده شدند. ژل به دست آمده با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی گردید و باندهای مربوطه با استفاده از دستگاه Geneflash زیر نور فرابنفش بررسی شدند.

تحلیل‌های آماری

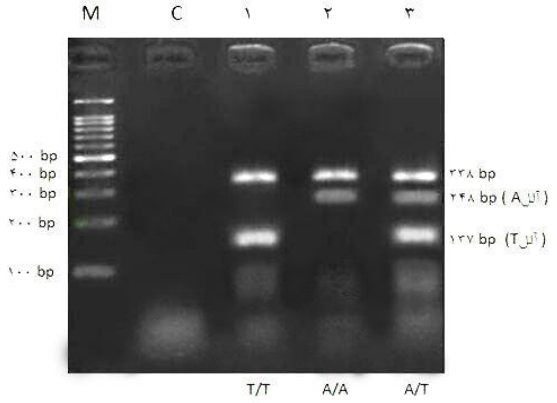
شایع‌ترین معیار اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در یک جمعیت، مقدار هتروزیگوسیتی است. افراد در گونه‌های دیپلوئید در یک لوکوس هموزیگوت یا هتروزیگوت هستند. وجود هتروزیگوسیتی نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی است. اطلاع‌دهندگی یک مارکر از طریق فاکتور میزان ظرفیت اطلاعاتی چند شکلی (PIC) اندازه‌گیری می‌شود. فاکتور PIC یک فاکتور محاسباتی برای تعیین اطلاع‌دهندگی مارکرها به منظور استفاده در آنالیز پیوستگی می‌باشد. این فاکتور برای جایگاه مارکرهای دارای تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت تعریف می‌شود که به تعداد و فراوانی آلل‌ها و هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت وابسته است، بنابراین در جمعیت‌های مختلف به دلیل ساختارهای ژنتیکی متفاوت متغیر می‌باشد. حداکثر میزان PIC برای ژن یا مارکرهای دوآللی ۰/۳۷۵ می‌باشد(۱۰، ۱۱). با در نظر گرفتن ماهیت دو آللی SNPs، مقدار PIC برای این نوع مارکرها در مقایسه با ریزماهواره‌ها کمتر است. اما با این حال بررسی‌ها نشان می‌دهند که ۰/۲۵

PIC> می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب برای گویا بودن یک مارکر تک نوکلئوتیدی در نظر گرفته شود. تعادل هاردی- وینبرگ بیان می‌کند که در جمعیتی با آمیزش تصادفی بدون انتخاب، جهش یا مهاجرت، فراوانی‌های آللی و فراوانی‌های ژنوتیپی از نسلی به نسل دیگر ثابت هستند. در صورتی که مقدار p کوچک‌تر از ۰/۰۵ به دست آید، فرضیه صفر رد می‌شود، یعنی تعادل هاردی-وینبرگ در لوکوس مورد نظر وجود ندارد(۱۲).

پس از تعیین ژنوتیپ، ژنوتیپ افراد مورد مطالعه با استفاده از برنامه Microsatellite tools به صورت فایل ورودی در نرم افزار Powermarker پایگاه اینترنتی tools GenePop مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از تعیین ژنوتیپ افراد شامل تخمین فراوانی آللی، فراوانی ژنوتیپی و درجه هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار مارکر rs4898352 و هم‌چنین تعادل هاردی- وینبرگ و میزان فاکتور PIC با استفاده از نرم افزار Powermarker نسخه‌ی ۳/۲ پایگاه Genepop از لحاظ آماری تحلیل شدند(۱۳).

یافته‌ها

به منظور بررسی پلی‌مورفیسم rs4898352، نمونه‌های ۱۴۰ زن غیرخویشاوند در جمعیت اصفهان، پس از ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده به وسیله ژل آگارز ۱ درصد تحت واکنش T-ARMS PCR قرار گرفتند. انواع ژنوتیپ‌های مشاهده شده در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.



شکل ۱. تعیین آلل‌های مارکر rs4898352 با استفاده از روش T-ARMS PCR

M ، مارکر و C کنترل منفی (بدون DNA ژنومی) می‌باشد. برای هر فرد یک ستون در نظر گرفته شده است. باند کنترل (۳۳۸bp) در محصولات PCR در ستون ۱، ۲ و ۳ مشاهده شده است. باندهای اختصاصی ۲۴۸ و ۱۳۷ جفت بازی هر یک به ترتیب نشان دهنده آلل‌های A و T می‌باشند. الگوی باندها بر روی ژل آگارز سه نوع ژنوتیپ را نشان می‌دهد. ستون ۱ مربوط به فرد هموزیگوت T/T ، ستون ۲ مربوط به فرد هموزیگوت A/A و ستون ۳مربوط به یک فرد هتروزیگوت A/T می‌باشد.

نتایج تحلیل آماری داده‌ها، فراوانی آللی مارکر rs4898352 را برای آلل A، ۰/۴۸۲ و برای آلل T، ۰/۵۱۸ نشان دادند. در نتیجه، آلل T به عنوان آلل غالب در جمعیت اصفهان شناخته شد. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای مارکر مورد مطالعه در جمعیت مزبور ۶۰ درصد به دست آمد که از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار بیشتر می‌باشد. نتایج میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده در جدول ۲ ارایه شده است.

جدول ۲. فراوانی آللی و میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای مارکر rs4898352 در جمعیت اصفهان

آلل	فراوانی آللی	میزان هتروزیگوسیتی		میزان هموزیگوسیتی	
		مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده
A	۰/۴۸۲	۰/۵۱	۰/۶۰	۰/۴۹	۰/۴۰
T	۰/۵۱۸				

نتایج به دست آمده نشان داد که از ۱۴۰ زن مورد مطالعه، ۸۴ نفر ژنوتیپ هتروزیگوت A/T، ۲۶ نفر ژنوتیپ هموزیگوت A/A و ۳۰ نفر ژنوتیپ هموزیگوت T/T

داشتند. نتایج به دست آمده از آزمون کای مربع نشان داد که مقدار p برای جمعیت اصفهان ۰/۲۳ است. هم‌چنین مقدار p براساس آزمون دقیق فیشر در نرم افزار Genepop برابر با ۰/۰۶۵ به دست آمد. با توجه به این که سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۵ در نظر گرفته شد، نتایج بیان‌گر وجود تعادل هاردی-وینبرگ برای این مارکر در جمعیت اصفهان است. در نهایت با توجه به وجود تعادل هاردی-وینبرگ، مقدار PIC برای مارکر ژنتیکی rs4898352 بررسی شد. نتایج به‌دست آمده از مطالعه نشان داد که مقدار PIC برای مارکر rs4898352 در جمعیت اصفهان ۰/۳۷ می‌باشد که نشان دهنده بالاترین میزان اطلاع دهندگی به عنوان یک مارکر تک نوکلئوتیدی دو آللی در جمعیت اصفهان است.

بحث

اصولا تشخیص مولکولی و شناسایی ناقلان در خانواده بیماران هموفیلی A به دو صورت بررسی مستقیم نقص ژنی و آنالیز پیوستگی صورت می‌گیرد. به علت تنوع زیاد جهش‌ها، بزرگی اندازه و پیچیدگی ساختار ژن فاکتور ۸، آنالیز تشخیص مستقیم دشوار، زمان بر و پرهزینه است. بنابراین با استفاده از روش غیرمستقیم (آنالیز پیوستگی)، با استفاده از مارکرهای پلی مورفیسم گویا، آلل جهش یافته در خانواده فرد بیمار دنبال می‌شود. مارکر گویا باید فراوانی آللی و درجه هتروزیگوسیتی بالا و عدم تعادل پیوستگی (LD) پایینی با سایر مارکرهای استفاده شده در جمعیت مورد نظر برای ردیابی جهش و تشخیص حاملان بیماری داشته باشد. هم‌چنین مارکرهای انتخاب شده اطراف ژن باید پیوستگی خوبی با ژن فاکتور ۸ داشته باشند. هم‌چنین مطالعات نشان داده که در تشخیص غیرمستقیم حاملان بیماری هموفیلی A بررسی دو مارکر که حداقل یکی از آن‌ها داخل ژنی باشد ضروری است. در این روش تشخیصی، هر چه تعداد مارکرهای گویای مورد استفاده بیشتر باشد، اطمینان بیشتری حاصل می‌شود. SNP و VNTR مارکرها از پرکاربردترین مارکرهای پلی مورفیک می‌باشند. البته لازم به ذکر است که در روش غیر مستقیم وجود یک فرد مبتلا به بیماری در خانواده ضروری است. هم‌چنین برای بیماری هموفیلی A ، مادر فرد بیمار باید هتروزیگوت باشد. در مواردی که بیماری ناشی از جهش جدید است استفاده از بررسی غیر مستقیم بی‌فایده است(۱۴، ۱۵).

در این مطالعه، یکی از شناخته شده مارکرهای پلی‌مورفیسم اطلاع دهنده برای تشخیص مولکولی هموفیلی A برای نخستین بار با استفاده از سیستم T-ARMS-PCR در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. این روش بسیار سریع و کم‌هزینه می‌باشد، اما مهم‌ترین محدودیت این روش بهینه سازی فاکتورهای دخیل در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز است. با توجه به اهمیت و کاربرد مارکر rs4898352 در آنالیز پیوستگی، ضریب هتروزیگوسیتی و میزان آگاهی‌دهندگی این مارکر در جمعیت ۱۴۰ زن غیرخویشاوند کنترل اصفهانی مورد بررسی قرار گرفت. درصد هتروزیگوسیتی این مارکر۶۰ درصد مشاهده شد که نسبت به مقدار قابل انتظار(۱۵) بیشتر بود. فراوانی آللی برای هر دو آلل A و T این مارکر تقریباً یکسان می‌باشد. پس از تعیین فراوانی آللی و ژنوتیپی افراد، وجود تعادل هاردی-وینبرگ از طریق محاسبه p براساس آزمون دقیق فیشر و آزمون کای مربع مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که مقدار p برای مارکر rs4898352 در جمعیت ایران بزرگ‌تر از ۰/۰۵ است که بیان‌گر وجود تعادل هاردی-وینبرگ برای این مارکر در جمعیت یاد شده است. به دلیل اهمیت مارکر rs4898352، این مارکر برای آنالیز پیوستگی و تشخیص حاملان هموفیلی A در جهان و شهرهای مختلف ایران استفاده می‌شود. در مطالعه‌ای در تهران، فراوانی آللی برای آلل A و T این مارکر در جمعیت ۸۶ زن کنترل به ترتیب ۰/۴۸ و۰/۵۲ گزارش شد که با نتایج حاصل از جمعیت اصفهان کاملا مشابه است. هم‌چنین درجه هتروزیگوسیتی برای مارکر مزبور ۰/۴۸ مشاهده شد که از مقدار مشابه در اصفهان(۰/۶۰) کمتر است(۱۶). در مطالعات دیگر در شهرهای خراسان جنوبی، مشهد و مازندران، درصد هتروزیگوسیتی به ترتیب ۲۸/۵، ۳۶/۳۶ و ۴۱ درصد گزارش

شد که همگی از مقدار مشابه در جمعیت اصفهان کمتر بود(۱۷، ۱۸). در مطالعه دیگر در سیستان و بلوچستان میزان هتروزیگوسیتی ۶۱/۴ درصد به دست آمد که از میزان مشابه در اصفهان و سایر شهرهای ایران بیشتر است(۱۹). هم‌چنین درصد هتروزیگوسیتی برای مارکر rs4898352 در جمعیت آذری ایرانی، مقدار ۴۷ درصد محاسبه شد(۲۰). با توجه به کل داده‌های حاصل از جمعیت ایران میانگین هتروزیگوسیتی برای مارکر rs4898352 در ژن فاکتور ۸، ۴۶/۴۳ درصد به دست آمد. به طور کلی، نتایج به دست آمده از مطالعات انجام شده در ایران نشان دهنده اطلاع دهندگی مناسب مارکر rs4898352 برای تشخیص حاملان بیماری هموفیلی A در خانواده‌های دارای فرد مبتلا می‌باشد.

با توجه به نتایج آماری در پایگاه داده Ensemble در مورد فراوانی آللی آلل‌های این مارکر در جمعیت آفریقایی، آلل T با فراوانی ۸۵ درصد آلل غالب محسوب می‌شود. اما در جمعیت‌های اروپایی، آسیایی و آمریکایی، آلل A به ترتیب با فراوانی ۰/۷۸، ۰/۸۲ و ۰/۶۳ آلل غالب می‌باشد. در ایران نیز آلل T با اختلاف اندک آلل غالب شناخته شد. با توجه به مطالعات گذشته، فراوانی آللی برای دو آلل A و T مارکر rs4898352 در ایران تقریبا مشابه با جمعیت هندوستان می‌باشد. میزان هتروزیگوسیتی این مارکر در ایران نیز تقریبا مشابه با جمعیت الجزایر و برزیل و مقدار هتروزیگوسیتی در جمعیت اصفهان کاملا مشابه با جمعیت‌های مصر و ایتالیا می‌باشد(۲۳-۲۱).

نتیجه گیری

در مطالعات مربوط به ژنتیک جمعیت، وجود تعادل هاردی-وینبرگ دلیل بر صحت اطلاعات به دست آمده می‌باشد. در این مطالعه نیز تعادل هاردی-وینبرگ برای مارکر rs4898352 در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون کای مربع و هم‌چنین آزمون دقیق فیشر نشان داد که تعادل هاردی-وینبرگ برای مارکر مزبور در جمعیت اصفهان وجود دارد.

در مجموع، این مطالعه به منظور تعیین خصوصیات ژنتیکی مارکر rs4898352 واقع در اینترون ۱۸ ژن فاکتور ۸ در جمعیت اصفهان انجام گرفت و نتایج حاصل نشان داد که مارکر مورد مطالعه با درجه هتروزیگوسیتی ۶۰ درصد، فراوانی آللی مناسب و میزان اطلاع دهندگی بالا می‌تواند در اصفهان نیز مانند سایر شهرهای ایران در تشخیص ناقلان بیماری هموفیلی A مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان است که با شماره ۷۹۰۲۰۵ توسط کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان به تصویب رسیده است. بدین وسیله نویسندگان از تمام افرادی که در جمع‌آوری نمونه‌های خون در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

منابع

1. Bolton-Maggs PH, Pasi KJ. Haemophilias a and b. The Lancet. 2003;361(9371):1801-9.
2. Tantawy AA. Molecular genetics of hemophilia A: Clinical perspectives. Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2010; 11(2): 105-14.
3. Oldenburg J, El-Maarri O. New insight into the molecular basis of hemophilia A. International journal of hematology. 2006; 83(2): 96-102.
4. Castaldo G, D'Argenio V, Nardiello P, Zarrilli F, Sanna V, Rocino A, et al. Haemophilia A: molecular insights. Clinical Chemical Laboratory Medicine. 2007; 45(4): 450-61.
5. Peyvandi F, editor. Carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia in developing countries. Seminars in thrombosis and hemostasis; 2005; 31(5): 544-54.[Persian]
6. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. Clinical genetics. 2000; 58(4): 250-64.

7. Singh M, Singh P. Role and Relevance of Factor VIII Gene Haplotyping for the Indirect Genetic Analysis of Carrier Diagnosis in Hemophilia. J Coagul Disord. 2010.
8. Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. TRENDS in Genetics. 2002; 18(1):19-24.
9. You FM, Huo N, Gu YQ, Luo M-c, Ma Y, Hane D, et al. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. BMC bioinformatics. 2008;9(1):253-4.
10. Hildebrand CE, David C, Torney C, Wagner P. Informativeness of polymorphic DNA markers. The Human Genome Project: deciphering the blueprint of heredity University Science Books, CA, USA. 1994:100-2.
11. Karimi A, Vallian S. Analysis of Genetic Variation of rs11658369 Marker in AIPL1 Gene as an Informative Marker for Molecular Diagnosis of Leber Congenital Amaurosis (LCA) in Isfahan Population. Genetics in the 3rd millennium. 2014:11(4); 3260-9.[Persian]
12. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics. 1992:361-72.
13. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of heredity. 1995; 86(3):248-9.
14. De Carvalho F, de Vargas Wolfgramm E, Paneto G, de Paula Careta F, Spagnol Perrone A, De Paula F, et al. Analysis of Factor VIII polymorphic markers as a means for carrier detection in Brazilian families with haemophilia A. Haemophilia. 2007;13(4):409-12.
15. Surin V, Lukianenko A, Luchinina YA. Analysis of the AluI polymorphism in intron 1 of the human coagulation factor VIII gene: A new marker for the hemophilia a carrier detection. Russian Journal of Genetics. 2007;43(4):451-7.
16. Azimifar SB, Seyedna SY, Zeinali S. Allele frequencies of three factor VIII gene polymorphisms in Iranian populations and their application in hemophilia A carrier detection. American journal of hematology. 2006; 81(5): 335-9.
17. Hashemi Soteh MB, Hosseini Khah Z, Bagherian MA, Mohseni R, Siami A, Valizadeh F, et al. Evaluation of Hemophilia A Families to Detect Carriers Using Gene Linkage in Mazandaran Province. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2010; 11(6): 64-70.[persian]
18. Abbaszadegan MR, Ziaee M, Khadivi-Zand F, Badiee Z, Khazaei B, Vahedian Z, et al. Carrier detection of hemophilia A in southern Khorasan using the 3 polymorphic sites of BclI, HindIII ,and AlwNI. Blood. 2007; 3(4): 291-8.[persian]
19. Zadeh-Vakili A, Eshghi P, Lari GR. Efficiency of BclI Restriction Fragment Length Polymorphism for Detection of Hemophilia A Carriers in Sistan and Baluchestan Province, Southeast of Iran. Iranian Journal of Medical Sciences. 2015; 33(1):33-6.
20. Moharrami T, Derakhshan SM, Pourfeizi AAH, Khaniani MS. Detection of Hemophilia A Carriers in Azeri Turkish Population of Iran Usefulness of HindIII and BclI markers. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 2014.
21. Raza ST, Husain N, Kumar A. Screening for Hemophilia A Carriers: Utility of PCR-RFLP-Based Polymorphism Analysis. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 2009; 15(1): 78-83.
22. Husain N. Carrier analysis for hemophilia A: ideal versus acceptable. Expert Rev Mol Diagn. 2009; 9(3):203-7.
23. Hussein I, El-Beshlawy A, Salem A, Mosaad R, Zaghloul N, Ragab L, et al. The use of DNA markers for carrier detection and prenatal diagnosis of haemophilia A in Egyptian families. Haemophilia. 2008;14(5):1082-7.