بازآموزی

ژنتیک ملکولی و ژن درمانی در مبتلایان به هموفیلی

دکتر محمدرضا نوری‌دلویی
گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر ماندانا محمودی
پزشک عمومی

خلاصه

هموفیلی یک بیماری خون ریزی دهنده ارثی ـ مغلوب وابسته به X ـ و مادرزادی است که از نقص در ژن سازنده عامل ۸ یا عامل ۹ ناشی می‌شود. مقاله حاضر به بحث در مورد هموفیلی A (نقص در عامل ۸) ـ که شیوع آن ۱ در ۵۰۰۰ مرد تخمین زده می‌شود پرداخته است.

بدین ترتیب که با استفاده از منابع معتبر و جدید فراوان و نیز تخصص و تجارب علمی ـ پژوهشی شخصی، پس از بیان توضیحاتی فشرده پیرامون تاریخچه هموفیلی، در محورهای ساختار عامل ۸ و ژن سازنده آن و آسیب‌شناسی مولکولی، اطلاعات ارزشمندی ارائه شده است. به دنبال آن، بحث بسیار مهم شناسایی حاملین و تشخیص پیش از تولید هموفیلی A مورد توجه قرار گرفته است و موضوع بسیار حساس ژن درمانی در مبتلایان هموفیلی و چشم انداز آن. بخش پایان مقاله را به خود اختصاص داده است. عامل ۸ یک گلیکوپروتئین پلاسمایی بزرگ تک زنجیره‌ای است که به طور عمده در سلول‌های کبدی ـ بدون نیاز به ویتامین K ـ تولید می‌شود و در پلاسما به یک پروتئین حامل، به نام Von Willebrand متصل می‌گردد. ژن سازنده عامل ۸ در انتهای تحتانی بازوی بلند کروموزوم X (Xq28) قرار دارد. طول ژن عامل ۸، ۱۸۶ کیلو باز بوده و یکی از بزرگترین ژن‌های انسانی شناخته شده به حساب می‌آید و تمام ردیف‌های بازی اگزون‌های آن شناخته شده است. امروزه انواع اختلالات ژنتیکی به ویژه چهار نوع، وارونگی، جهش نقطه‌ای، افتادگی یا حذف و اضافه شدن در ژن هموفیلی شناسایی شده و تا ژانویه ۱۹۹۹ تعداد کل جهش‌های گزارش شده در نقاط مختلف ژن به ۴۶۴ مورد می‌رسد. به دنبال کلون سازی موفقیت‌آمیز ژن عامل ۸ در سال ۱۹۸۴، روند تشخیص و درمان مبتلایان به هموفیلی A، متحول شد. به ویژه ابداع و استفاده از فناوری‌های قدرتمند مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی مانند PCR، VNTR, RFLP و نیز روش‌های ژن درمانی ـ Exvivo و Invivo ـ در راستای تشخیص و درمان این بیماران به ویژه تشخیص به موقع زنان حامل و نیز تشخیص زود هنگام هموفیلی در جنین ـ افق بسیار مهم و جدیدی گشوده شد. طبیعتاً، روش‌های تشخیص ژنتیکی مناسب‌ترین روش‌ها برای تشخیص پیش از تولد می‌باشد. به طور نمونه کاربرد RFLP، تشخیص زود هنگام بیماری را در حدود هفته دوازدهم بارداری امکان‌پذیر کرده است. کاربرد آزمایشی ژن درمانی در حیوانات ـ مانند موش و سگ ـ در درمان هموفیلی در مراکز مختلف، آینده روشنی را در درمان این بیماری نوید می‌دهد به ویژه که هموفیلی به دلایل متعددی نامزد مناسبی برای ژن درمانی به حساب می‌آید.

واژگان کلیدی: هموفیلی A، ژنتیک مولکولی، ژن درمانی، جهش ژنی.

بازاموزی

مقدمه و تاریخچه کلی

هموفیلی یک بیماری خونریزی دهنده ارثی و مادرزادی است که از نقص در ژن سازنده عامل ۸ یا عامل ۹ ناشی می‌شود (۱). کمبود عامل ۸ موجب هموفیلی A و کمبود عامل ۹ موجب هموفیلی B می‌گردد. اولین گزارش مکتوب این بیماری در قرن دوم میلادی در تلمود آمده است (۱). اگر چه که تاریخچه علمی تجربی مستمر آن در سده ۱۹ با گزارش Otto در سال ۱۸۰۳ آغاز می‌شود، این دانشمند حدود نیم قرن پیش از عنوان شدن اصول ژنتیک مندل، به الگوی توارث وابسته به جنس این بیماری پی برده بود. هر چند که تا پیش از سال ۱۹۲۰ عامل بیماری چندان شناخته نشده بود و عموماً به عنوان نوع خاصی از نقرس شناسایی می‌شد. در این سال نقص انعقادی به‌عنوان دلیل اصلی این سندرم شناخته شد. تفاوت بین دو بیماری هموفیلی A , B اولین بار در سال ۱۹۵۲ با شناخت عامل ۸ و عامل ۹ (که برخی به آن عامل کریسمس هم می‌گویند) مشخص گردید (۱). در حدود ۱۹۷۰، پروتئین حامل عامل ۸ یعنی فون ویله برند (Von Willebrand) از عامل ۸ جدا شد (۱) و بدین ترتیب ماهیت جداگانه دو بیماری فون ویله برند و هموفیلی A مشخص گردید. بنابراین، بسته به فقدان یا کمبود نوع عامل انعقادی هموفیلی انواع متفاوتی دارد که رایج‌ترین آنها نوع A , B و فون ویله برند است. فون ویله برند، معمولاً به شدت هموفیلی A , B نیست و فراوانی آن در مجموع، در مردان و زنان یکسان است.

هموفیلی نوع A (نوع کلاسیک) شایع‌ترین نوع هموفیلی است. شدت هموفیلی در افراد مختلف یکسان نیست و بسته به مقدار عامل انعقادی در خون افراد مبتلا، هموفیلی به سه شکل شدید، متوسط و خفیف وجود دارد. به طور مثال، در هموفیلی شدید، مقدار عامل انعقادی ۸ در خون افراد مبتلا ۱٪ یا حتی کمتر از ۱٪ حد طبیعی است. یادآوری می‌شود که در شرایط طبیعی در خون افراد سالم حداقل ۱۳ عامل انعقادی شناخته شده است که مسئول ایجاد لخته خون بوده و از خون ریزی درونی یا بیرونی جلوگیری می‌کنند.

طولانی‌ترین اینترون، اینترون ۲۲ می‌باشد که داخل آن ژنی به نام ژن A وابسته به عامل ۸ یا F7A وجود دارد که در جهت عکس ژن عامل ۸، رونویسی می‌شود.

در سال ۱۹۸۳ توسط Rotblot و همکاران برای اولین بار، عامل ۸ به صورت خالص جدا گردید (۲) و یک سال بعد (۱۹۸۴) ژن عامل ۸ توسط Gitschier و همکاران با موفقیت کلون شد (۳). این رخداد مهم، میدان جدیدی را در روند تشخیص و درمان این بیماری گشود. امروزه با ابداع و استفاده از فن آوری‌های قدرتمند جدید مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ـ جهت تکثیر اختصاصی DNA یا RNA ـ یا به اختصار PCR (Polymerase chain reaction)، روش‌های

تشخیص ژنتیکی مانند چند شکلی یا تغییر شکل در قطعات حاصل از هضم با آنزیم‌های برشگر خاص و محدودگر یا به اختصار RFLP (Restriction fragment length polymorphism) (۴)، نوعی ویژه از فن RFLP که روی ردیف‌های بازی تکراری انجام می‌گیرد به نام اختصاری VNTR (Variable number of tandem repeats) (۵ و ۶) و نیز روش‌های ژن درمانی، در مسیر تشخیص و درمان این بیماران امیدهای زیادی ایجاد گردیده است.

ساختار عامل ۸

عامل ۸، یک گلیکوپروتئین پلاسمایی بزرگ تک زنجیره‌ای است که به طور عمده در سلول‌های کبدی و بدون نیاز به ویتامین K تولید می‌شود (۷) و در پلاسما به یک پروتئین به نام VWF (Von Willebrand factor) به عنوان حامل متصل می‌شود. این پروتئین از یک پپتید ۲۳۳۲ اسید آمینه‌ای تشکیل می‌شود که یک زنجیر ۱۹ اسید آمینه‌ای به عنوان پپتید راهنما در ابتدای آن قرار می‌گیرد. این پپتید از سه قلمرو: A, B, C تشکیل شده است (۹ و ۸ و ۷) که از هر یک از قلمروهای C, B, A به ترتیب سه، یک و دو رونوشت وجود دارد که به صورت A_1 A_2 BA_3 C_1 C_2 قرار می‌گیرد (۹). اما از آنجا که این پروتئین به هضم آنزیمی بسیار حساس است، تنها بخش کوچکی از آن به صورت تک رشته باقی می‌ماند و بقیه به شکل یک زنجیره سنگین که از A_1 A_2 با قسمتی از B و زنجیره‌های سبک که از A_3 ، C_1 ، C_2 تشکیل می‌شوند، در می‌آید که با هم پیوند غیر کووالان برقرار می‌کنند (۹). عامل ۸ برای فعال شدن دوباره تحت اثر ترومبین، هضم می‌شود و در نتیجه پیوند بین A_1 و A_2 و نیز A_2 و B شکسته می‌شود که این واکنش برای فعال شدن این عامل ضروری است (۱۰).

حدود ۴۰٪ بیماران شناخته شده هموفیلی شدید دارای وارونگی در اینترون شماره ۲۲ ژن هموفیلی می‌باشند.

از بین قلمروهای عامل ۸ به نظر می‌رسد وجود قلمرو A_2 برای کارکرد آن ضروری است. قلمرو B با وجود اندازه بزرگش به عنوان یک پپتید فعال کننده بزرگ عمل می‌کند و به نظر می‌رسد حذف این قلمرو با ساختن ژن فاقد قلمرو B در کارکرد ژن تأثیری نخواهد داشت که از این مطلب در ژن درمانی هموفیلی استفاده می‌شود (۱۱). قلمرو کوتاه اسیدی واقع بین A_2 و A_1 و نیز در انتهای کربوکسیل B نزدیک به A_2 نیز در کار عامل ۸ مؤثرند. به نظر می‌رسد بخش اسیدی بین B و A_2 در اتصال عامل ۸ به پروتئین VWF مؤثر باشد. این عامل که به عنوان عامل کمکی با عامل ۹ در تبدیل عامل ۱۰ به عامل 1.a فعال، همکاری می‌کند، توسط فرآورده‌های انعقاد و پروتئین‌های خون مانند ترومبین، پروتئین C و عامل ۱۰ و ۹ فعال، غیر فعال می‌گردد. (۱۲).

بازآموزی

ساختار ژن عامل ۸

ژن سازنده عامل ۸ در انتهای تحتانی بازوی بلند کروموزوم X یعنی در xq28 قرار دارد (۷، ۸ و ۱۳). ژن عامل کوررنگی و ژن آنزیم G6PD نیز در نزدیکی این ژن قرار دارند. طول ژن عامل ۸، ۱۸۶ کیلو باز بوده و حدود ۰/۱ درصد طول کروموزوم x را شامل می‌شود. این ژن که یکی از بزرگترین ژنهای انسانی شناخته شده می‌باشد، دارای ۲۶ اگزون (Exon) و ۲۵ اینترون (Intron) با اندازه‌های مختلف می‌باشد. اندازه اگزونها بین ۶۹ جفت باز تا ۳۱۰۶ جفت باز (با میانگین ۱۶۴ جفت باز) و اندازه اینترونها از ۲۰۷ جفت باز تا ۳۲۴۰۰ جفت باز در نوسان است. دو اگزون ۱۴ (با ۳۱۰۶ جفت باز) و ۲۶ (با ۱۹۵۸ جفت باز) بزرگترین اگزونها بوده و بیش از ۵۰٪ طول رونوشت RNA را تشکیل می‌دهند. چنانچه معمولاً انتظار می‌رود، بیشتر طول ژن را اینترونها تشکیل می‌دهند به نحوی که در مقایسه با ۱۸۶ کیلو باز طول ژن، طول mRNA حدود ۹ کیلو باز می‌باشد (۷ و ۸).

طولانی‌ترین اینترون، اینترون ۲۲ می‌باشد که داخل آن ژنی به نام ژن A وابسته به عامل ۸ یا F_8A وجود دارد که در جهت عکس ژن عامل ۸ رونویسی می‌شود (۱۴). این ژن در بسیاری از سلولها فعال بوده و به نظر می‌رسد که یک نقش "house keeping" را برعهده داشته باشد. دو نسخهٔ دیگر از ژن A در فاصله حدود ۴۰۰ کیلو باز از ژن هموفیلی قرار دارد که در همان جهت ژن عامل ۸ رونویسی می‌شود. این ژن در بیماریزایی هموفیلی نقش مهمی دارد که در بخشهای پیش رو به تفضیل به آن پرداخته شده است. علاوه بر ژن A وابسته به عامل ۸، در نزدیکی آن ژن دیگری به نام ژن B وابسته به عامل ۸ وجود دارد (به نام F_8B) که در جهت ژن عامل ۸ رونویسی می‌شود. شایان تأکید است که این ژن از نظر بالینی اهمیت ویژه‌ای ندارد (۱۴).

فرآیند افتادگی یا حذف اگر شامل قطعه‌ای بیش از ۱۰۰ جفت باز شود، افتادگی ژنی بزرگ و اگر کوچکتر از ۱۰۰ جفت باز باشد، افتادگی ژنی کوچک نامیده می‌شود.

آسیب‌شناسی مولکولی

شیوع بیماری هموفیلی، یک در ۵۰۰۰ مرد تخمین زده می‌شود. میزان رخداد جهشهای denovo حدود یک سوم می‌باشد. بدین معنی که $\frac{1}{3}$ بیماران هموفیلی A، خویشاوند مرد مبتلایی ندارند (۷). به علاوه، جهش با فراوانی بسیار بیشتری در افراد مذکر (در مقایسه با افراد مؤنث) رخ می‌دهد. اطلاعات جمع‌آوری شده در زمینه جهشهای ژن عامل ۸ شامل جایگزینیهای تک بازی، کمبودها، اضافه شدن و نو ترکیبی اولین بار در سال ۱۹۹۱ توسط Tuddenham و همکاران و سپس در سال ۱۹۹۴ به طور جامع منتشر گردیده است (۱۵). حدود ۹۵٪ از جهش‌های ژن عامل ۸، از نوع نقطه‌ای است و در

حدود ۵٪، کمبودهای کوچک و بزرگ را شامل می‌شود. هم اکنون یک جایگاه ویژهٔ هموسیلی در شبکه اینترنت (Internet) ایجاد شده است که آخرین اطلاعات روز مربوط به جهشهای ژن عامل ۸ را در اختیار علاقمندان قرار می‌دهد (۱۶). در مجموع، جهشهای ژنی هموفیلی را به چهار رده زیر می‌توان تقسیم کرد (۱۷ و ۱۶ و ۱۵ و ۷):

۱ـ وارونگی (Inversion).

۲ـ جهش نقطه‌ای (Point mutation).

۳ـ افتادگی یا حذف یا کمبود (Deletion).

۴ـ اضافه شدن یا درون پیوستگی (Insertion).

۱ـ وارونگی

حدود ۴۰٪ بیماران شناخته شده هموفیلی شدید دارای وارونگی در اینترون شماره ۲۲ ژن هموفیلی می‌باشند. چنانچه پیشتر اشاره شد، در اینترون ۲۲، یک ژن ثانوی به نام ژن ۸ وابسته به عامل ۸ وجود دارد که رونویسی آن در خلاف جهت ژن عامل ۸ می‌باشد (۱۴). نوترکیبی هم ساخت (homogenous recombination) درون کروموزومی که بین این ژن و ژن ۸ موجود در خارج ژن عامل ۸ صورت می‌گیرد، موجب وارونگی این ناحیه و جداشدن اگزونهای ۱ تا ۲۲ از اگزونهای ۲۳ تا ۲۶ می‌شود. این رخداد، به طور معمول در جریان تقسیم میوز به ویژه در فرآیند اسپرم زایی (spermatogenesis) در مردان صورت می‌گیرد. به دلیل وجود دو نسخه ژن و احتمال نوترکیبی با هر یک از آنها، احتمال ایجاد وارونگی‌های دور و نزدیک وجود دارد. نوع دور در ۳۷٪ موارد و نوع نزدیک در ۷٪ موارد دیده شده است. این گروه از بیماران را می‌توان با استفاده از یک آنزیم مناسب برش دهنده خاص و محدودگر (restrictive endonuclease enzyme) و نیز یک کاوشگر (Prode) مناسب و با توجه به تفاوت اندازه قطعات حاصل از عمل آنزیم در فرد طبیعی، فرد مبتلا به وارونگی دور و فرد مبتلا به وارونگی نزدیک، به طور دقیق تشخیص داد (۱۷).

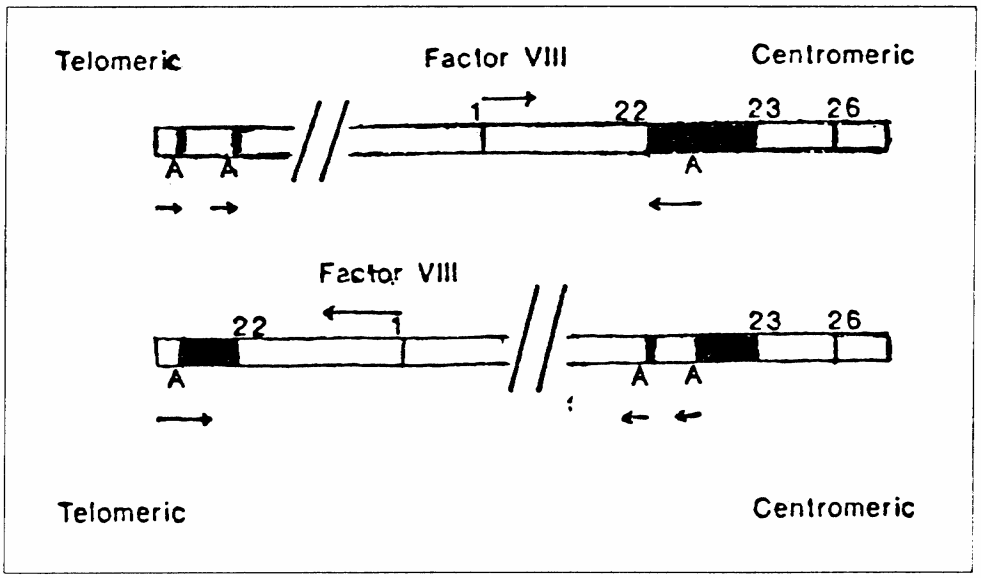
امروزه ژن درمانی در درمان بیماری‌های مختلفی چون سرطانها، عفونت‌ها و بیماری‌های ارثی استفاده می‌شود.

در این گروه از بیماران تولید بازدارنده (Inhibitor) به دلایلی که تاکنون به درستی مشخص نشده است، بیشتر از حد طبیعی است (۱۶). این اختلال هموفیلی از نوع شدید را ایجاد می‌کند. یادآوری می‌شود که نقص عامل ۸ را براساس درصد فعالیت این عامل سنجیده شده نسبت به پلاسمای طبیعی به صورت شدید (۱٪>)، متوسط (۵ـ۱)٪ و خفیف (۳۰ـ۵)٪ رده‌بندی می‌کنند.

۲ـ جهش نقطه‌ای

تا ژانویه ۱۹۹۹ نزدیک به ۲۷۰ جایگزینی تک بازی گزارش شده است که از این تعداد ۲۱۸ مورد (۸۱٪) موجب تغییر یک اسید آمینه به

بازاموزی



شکل ۱ ـ موقعیت ژن A در داخل ژن عامل ۸ و مکانیسم وارونگی.

اسید آمینه دیگر می‌گردند (Missense mutation)، ۳۹ مورد جهش نامفهوم (Nonsense mutation) بوده و موجب توقف زودرس ساخت پپتید، از طریق ایجاد کلید رمز توقف گر (Stop codon) می‌شود، در حالی که در ۱۸ مورد با اثر روی جایگاه پیوند دهنده (Splice donor) یا پیوند گیرنده (Splice acceptor) موجب تغییر محل یا اساساً از بین رفتن آن می‌شوند. از ۱۸ مورد اخیر، پنج مورد دارای تغییر در اسید آمینه نیز می‌باشند (۱۶). شایان تأکید است که بیشتر بیماران دارای جهش nonsense، هموفیلی از نوع شدید را نشان می‌دهند. اغلب این بیماران بازدارنده عامل ۸ نیز تولید می‌کنند (جدول ۱). به نظر می‌رسد که در بیشتر موارد جهش در دی‌نوکلئوتید GpG رخ می‌دهد (۱۶).

۳ ـ افتادگی

فرآیند افتادگی یا حذف اگر شامل قطعه‌ای بیش از ۱۰۰ جفت باز شود، افتادگی ژنی بزرگ و اگر کوچکتر از ۱۰۰ جفت باز باشد، افتادگی ژنی کوچک نامیده می‌شود. افتادگی‌های بزرگ: ناشی از نو ترکیبی غیر هم ساخت (non - homogenous recombination) می‌باشند که تاکنون ۹۲ مورد از آن گزارش شده است و بر روی هم مسؤول ۵٪ کُلِ موارد هموفیلی شدید می‌باشند. در این نوع جهش، به طور معمول

پروتئین تولید شده یا ناقص تولید می‌شود یا به سرعت از بین می‌رود. بنابراین، در اندازه‌گیری‌ها، میزان فعالیت و پادگن عامل ۸ بسیار پایین گزارش می‌شود. در این بیماران احتمال تولید بازدارنده بالا است (جدول ۱).

لیپوزوم‌ها، حباب‌های کوچک کروی از چربی دو لایه هستند که ساختار دو لایه غشای سلولی را تقلید می‌کنند.

افتادگی‌های کوچک معمولاً همیشه در اگزون‌ها صورت می‌گیرند. تاکنون ۶۴ مورد از این نوع کمبود گزارش شده است. این نوع کمبود موجب تغییرات در قالب ژن (frameshift changes) می‌گردند، از این رو، اغلب هموفیلی نوع شدید ایجاد می‌کنند اما به دلایل ناشناخته میزان تولید بازدارنده در آنها پایین می‌باشد (۱۶).

۴ـ اضافه شدن

تاکنون ۲۳ مورد اضافه شدن یا درون پیوستگی برای ژن عامل ۸ گزارش شده است که بیشتر این موارد تک بازی هستند. با وجود این، اضافه شدن بیشتر از یک باز و نیز مضاعف شدن نیز گزارش شده است. اضافه شدن بازی به طور معمول، در شکل هموفیلی شدید تظاهر می‌کند (۱۶).

به علاوه، مواردی از اضافه شدن یک عنصر بلند (Long interspersed repetitive sequences) یا LINES نیز گزارش شده است. به نظر می‌رسد که تعداد زیادی از ردیف‌های LINES در سرتاسر ژنوم پخش شده و آنان با فرآیندی شبیه جابجا شدگی در رترو ویروسها، منتقل می‌شوند (۱۷ و ۱۸).

اشاره می‌شود که DNAهای تکراری از جمله رده‌های مهم و اصلی DNAی ژنوم انسان هستند که در شکل ردیف‌های کوتاه یا بلند تکراری که در بین قطعات دیگر جا گرفته‌اند، حضور دارند. خانواده‌ای به نام اختصاری Alu، خانواده اصلی، عمده و معمولی‌ترین ردیف‌های تکراری (Short interspersed repetitive sequences) SINES را در ژنوم انسان شامل می‌شوند. همچنین، خانواده اصلی LINES انسانی ردیف ابقا شده مشتمل بر ۶۴۰۰ جفت باز است. پایانه‌های 5 این ردیف‌های بازی متفاوت است. اما اکثراً در پایانه '3 خود، همساختی دارند.

پایانه '5 به تعداد تقریبی ۴ هزار تا ۲۰ هزار در ژنوم حضور دارد در حالی که پایانه '3 با فراوانی به مراتب بیشتر ـ ۵۰ تا ۱۰۰ هزار ـ حضور دارد. نقش‌های احتمالی این ردیف‌های بازی و دیگر ویژگی‌های ساختاری و مولکولی آنها، خارج از محدودهٔ این مقاله می‌باشد.

شناسایی حاملین و تشخیص پیش از تولد

برای تشخیص هوفیلی در افراد مشکوک به طور معمول از اندازه‌گیری فعالیت عامل ۸ با روش میزان تولید لخته یا میزان تغییر رنگ معرف استفاده می‌شود (۱). همچنین برای افتراق هموفیلی A از بیماری فون ویلبراند، پادگن عامل

بازاموزی

جدول ۱ ـ هموفیلی A: خلاصه‌ای از جهش‌های مختلف گزارش شده تا هفتم ژانویه ۱۹۹۹.

	Point Mutations			Deletions		
Exon	Missense [1]	Nonsense (Stop)	Splicing [2]	Small	Large	Insertions
1	9	1	1	1	11	-
2	2	-	-	2	2	1
3	13	-	1	2	4	-
4	10	2	2	1	3	-
5	6	-	3	-	7	-
6	1	-	2	1	6	-
7	19	1	-	4	4	-
8	12	3	-	7	-	-
9	3	1	1	2	-	-
10	5	-	-	1	2	-
11	10	1	3	-	1	1
12	8	3	1	-	-	1
13	12	2	-	3	3	1
14	22	9	1	24	9	13
15	5	1	1	-	8	-
16	11	3	1	3	3	-
17	10	1	-	2	2	2
18	11	3	-	2	1	3
19	4	1	-	1	2	-
20	2	1	-	-	-	-
21	2	1	-	-	-	-
22	8	1	-	-	3	-
23	11	1	-	2	6	-
24	6	1	-	4	1	1
25	8	1	1	1	-	-
26	8	2	-	1	14	-
TOTAL	218	39	18	64	92	23

را اندازه می‌گیرند (۱).

اگر چه مسأله اصلی در هموفیلی تشخیص به موقع زنان حامل و نیز تشخیص زودهنگام هموفیلی در جنین است، روش‌های بیوشیمیایی تشخیص هموفیلی در افراد حامل در صورتی که از مواد و و سائل آزمایشگاهی با کیفیت بالا و کارشناسان و تکنیسین‌های ورزیده و نیز دستگاههایی با قدرت افتراق بالا استفاده کنند، توان تشخیص بالایی دارند، اما متأسفانه چنین امکاناتی همیشه فراهم نیست (۱۴). اضافه می‌شود که برای تشخیص پیش از تولد هموفیلی، زودترین هنگامی که می‌توان از روش‌های بیوشیمیایی استفاده نمود، زمانی است که امکان نمونه برداری از خون جنین فراهم می‌شود (حدود هفته بیستم) (۱). از این رو، ضرورت ابداع روش‌های جدیدتر و کارآتر به شدت احساس شده است. این روش‌ها، همانا روش‌های ژنتیک مولکولی است. تشخیص ژنتیکی هموفیلی در جنین با استفاده از روش‌های مستقیم یا غیر مستقیم از نمونه برداری از پرزهای کوریونی یا به اختصار CVS (Chorionic Villus Sampling) در حدود هفته دهم تا دوازدهم بارداری و با استفاده از نمونه برداری از مایع آمنیون (amniocentesis) در حدود هفته پانزدهم بارداری امکان‌پذیر است (۱). میزان خطر عوارض در مادر و جنین در روش CVS بین ۰/۵٪ تا ۱٪ و در روش نمونه برداری از مایع آمنیون ۱ تا ۲٪ تخمین زده می‌شود (۱)، بنابراین، به نظر می‌رسد روش‌های تشخیص ژنتیکی در حال حاضر مناسب‌ترین روش‌ها برای تشخیص پیش از تولد باشند. علاوه بر استفاده از تشخیص پیش از تولد، با پیشرفت روش‌های ژن درمانی، دانستن دقیق و در سطح مولکولی ـ نوع مشکل ژنتیک فرد مبتلا، می‌تواند کمک قابل توجهی در درمان وی بنماید. همچنین، با دانستن نوع اختلال ژنتیکی، تا حدود زیادی می‌توان احتمال تولید بازدارنده در آینده را پیش بینی کرد. روش‌های تشخیص ژنتیکی در تشخیص حاملین هموفیلی به ویژه در مواردی که دست کم یک بیمار در افراد خانواده فرد مورد نظر در دسترس باشد، قابل استفاده می‌باشند.

با توجه به اندازه بزرگ ژن عامل ۸، گستردگی و تنوّع اختلالاتی که منجر به هموفیلی می‌شوند (هتروژنی) و نیز درصد بالای جهش‌های denovo؛ طبیعتاً استفاده از روش‌های مستقیم تشخیص ژنتیکی (که با بررسی تک تک نوکلئوتیدها، نوع دقیق جهش را مشخص می‌کند)، در سطح بالینی، کارآیی ندارد. مگر این‌که‌به نوع جهش کاملاً مشخصی مشکوک بوده و ناحیه ویژه‌ای مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین، با امکانات کنونی چنین به نظر می‌رسد که استفاده از روش‌های غیر مستقیم (مانند RFLP و VNTR) از نظر بالینی ارزش به مراتب بیشتری در بردارد و از آنجا که با کلون کردن عامل ۸، نقاط دارای چند شکل (Polymorphism) ژنی متعددی در داخل و خارج ژن عامل ۸ شناسایی شده‌اند، این امر اهمّیت بیشتری می‌یابد.

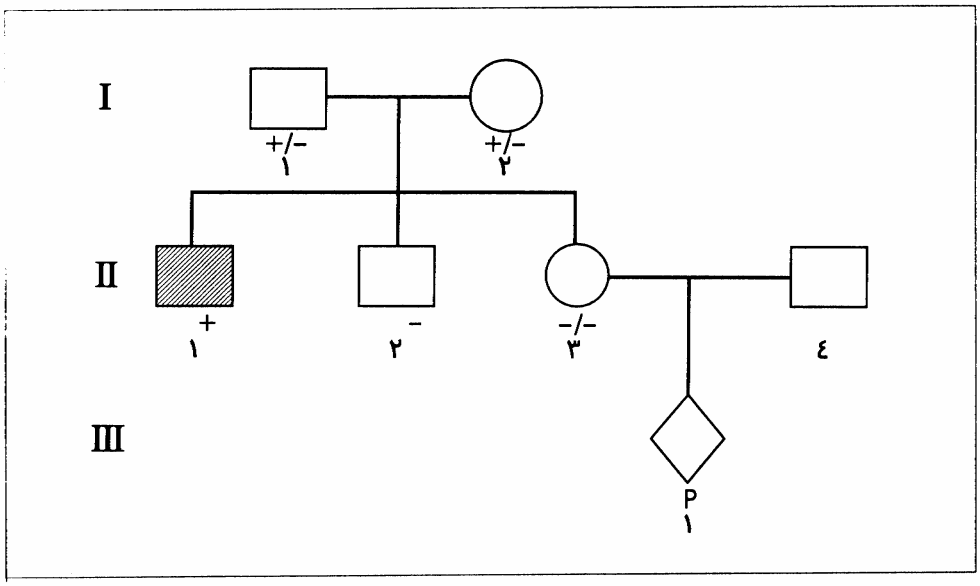
در فن RFLP (۶) قطعه‌ای از DNA؛ به طور نمونه ژن عامل هموفیلی توسط روشی مانند

PCR تکثیر می‌یابد و به کمک یک آنزیم برش دهنده خاص و محدودگر مناسب که در یک یا چند نقطه شناخته شده دارای چند شکل ژنی از آن قطعه DNA است. عمل برش صورت می‌گیرد. البته و به دلیل وجود چند شکل ژنی، ممکن است نقطه عمل آنزیم جا به جا شده یا اساساً از بین برود. بر این اساس، اندازه قطعات DNAی تولید شده متفاوت خواهد بود. یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهد که بیشترین نقاط چند شکلی مورد استفاده در درون ژن، نقاط مربوط به محل برش آنزیم‌های محدودگر Xbal , Hind III و BCl هستند که در نژاد سفید به ترتیب ۴۴٪، ۴۲٪ و ۴۲٪ موارد ناخالصی (هتروزیگوت) می‌باشند (۸ و ۵ و ۴). بدیهی است که تنها فرد مؤنثی می‌تواند در روش RFLP با یک آنزیم ویژه، آگاهی دهنده (Informative) تلقی شود که دو کروموزوم X او از نظر آن آنزیم ناخالص باشند (۸). برای افزایش قدرت آگاهی دهی به طور معمول از چند آنزیم در درون و نزدیک ژن استفاده می‌شود که بدین ترتیب احتمال این که فرد مورد آزمایش دست کم نسبت به یکی از آنها ناخالص باشد، بسیار بیشتر خواهد بود. در اینجا مناسب است به عامل پیوستگی ترجیحی (Linkage disequilibirum) اشاره شود (۱۷) که به معنای تمایل دو آلل (واقع در دو موضع ژنی به هم پیوسته)، به همراهی، با یکدیگر است. بنابراین، در انتخاب آنزیم‌ها باید به وجود چنین رابطه‌ای بین آنها نیز دقت کرد چرا که موجب پایین آمدن پاسخ دهی و آگاهی بخشی می‌گردد. اگر استفاده از آنزیم‌های عمل کننده بر درون ژن، آگاهی دهنده نباشد، به طور معمول از نواحی برون ژنی با پیوستگی بالا (مانند $Dx_{۱۳}$ و $St_{۱۴}$) استفاده می‌شود. $Dx_{۱۳}$ در ۵۰٪ و $St_{۱۴}$ در ۷۰٪ افراد نژاد سفید آگاهی بخشی و پاسخ دهی دارند (۱۶ و ۸ و ۶). VNTR همان فن RFLP است که روی نقاطی از کروموزوم که حاوی قطعات یکسان تکرار شونده است (مانند قطعات ۶۰ جفت بازی که علاوه بر آنکه بارها پشت سر هم تکرار شده‌اند، تعداد دفعات این تکرار نیز چند شکلی نشان می‌دهند. از این چند شکلی چندین آلل وجود دارد)، انجام می‌گیرد و در نتیجه قطعاتی با اندازه‌های مختلف تولید می‌شود (۱۷).

با استفاده از فن RFLP یا VNTR در صورتی که افراد خانوادهٔ فرد مورد نظر در دسترس باشند، با احتمال بالایی می‌توان نحوهٔ وراثت ژن معیوب را در خانواده دنبال کرد. برای فهم بهتر مسأله، شجره نامه ساده شکل ۲ را به عنوان نمونه مورد توجه قرار می‌دهیم.

در خانواده مربوط به این شجره‌نامه که با آنزیم Hind III , RFLP شده است (از آنجا که Hind III با عمل بر ژن هموفیلی دو آلل بیشتر ایجاد نمی‌کند، این دو آلل با + و - نشان داده می‌شوند.)

مادر بزرگ (I.۲) احتمالاً حامل ژن هموفیلی است چرا که یک فرزند مبتلا دارد. از نظر RFLP,Hind III هتروزیگوت به شمار می‌رود (-/+). آلل + با ژن بیماری همراهی دارد چرا که فرزند هموفیل او نیز همان آلل (+) را دریافت کرده است. مادر حامله (II.۳) که برای تعیین وضعیت جنین



شکل ۲

مراجعه کرده است، آلل دیگر (-) را از مادر گرفته و در نتیجه به احتمال قوی حامل نیست و احتیاجی به انجام نمونه برداری پرزهای جفتی ندارد. از آنجا که ریسک یا میزان خطر نوترکیبی بین محل Hind III و ژن معیوب کمتر از ۱٪ است، تشخیص به احتمال ۹۹٪ صحیح است. چنانچه ملاحظه می‌شود برای استفاده از RFLP لازم است که تعداد افراد کافی (از خانواده) در دسترس باشند، علاوه بر این، چند شکلی برخی ژن‌ها نادر است و یا به دلایلی چون پیوستگی ترجیحی، شماری از مواضع ژنی یا آگاهی دهی پایین در برخی از خانواده‌ها و مانند آن استفاده از این روش امکان‌پذیر نیست. با این حال دقت این روش (بسته به مورد مطالعات مختلف) از ۴۰٪ تا ۹۹٪ متفاوت است (۱ و ۱۶). البته احتمال مواردی مانند عدم ابوت (پدربودگی) یا موزائیسم سلول‌های جنسی را هم باید در نظر گرفت. با همه اینها، چشم‌انداز این فن، در مورد تشخیص بالینی بیماری هموفیلی بسیار نوید دهنده به نظر می‌رسد.

ژن درمانی در مبتلایان به هموفیلی و چشم انداز آن

ژن درمانی تغییر ژنتیکی سلول‌های بیمار به منظور غالب شدن بر بیماری است. به عبارت دیگر، ژن درمانی، انتقال مواد ژنتیکی به درون سلول‌های یک موجود برای مقاصد درمانی

می‌باشد که به روش‌های متفاوت و متنوّع (فیزیکی، شیمیایی و زیستی) صورت می‌گیرد (۲۸ـ۱۹ و ۷).

امروزه ژن درمانی در درمان بیماری‌های مختلفی چون سرطان‌ها، عفونت‌ها و بیماری‌های ارثی استفاده می‌شود. در بین بیماری‌های ارثی به نظر می‌رسد بیماری‌هایی با وراثت تک ژنی که ژن مربوط به آنها کلون شده باشد، بهترین نامزدها برای ژن درمانی محسوب می‌شوند زیرا به طور مثال در مورد بیماری‌های با وراثت چند عاملی چنان شبکهٔ در هم پیچیده علت و معلولی وجود دارد که به ندرت می‌توان اختلال ویژه‌ای را یافت که اصلاح آن به تنهایی به درمان بیماری بیانجامد. در بین بیماری‌های با وراثت تک ژنی، بیماری‌های با الگوی توارثی مغلوب آتوزومی که در آنها جهش موجب از دست رفتن عملکرد یک ژن خاص می‌شود، مناسب‌ترین موارد برای ژن درمانی هستند، زیرا که در این اختلالات، زمانی بیماری ظاهر می‌شود که هر دو آلل موجود در فرد معیوب باشند یعنی نبود فرآورده‌های ناشی از یک ژن خاص، موجب بیماری می‌گردد. به همین دلیل افراد ناخالص که ۵۰٪ فعالیت طبیعی را دارند، معمولاً فنوتیپ طبیعی را نشان می‌دهند. بنابراین، وارد کردن مناسب ژن سالم به این بیماران، به هر اندازه که تولید فرآورده‌های طبیعی را موجب شود، در تابلوی بالینی مبتلایان تأثیر مثبت خواهد گذاشت. به همین دلیل است که اولین کارآزمایی بالینی موفقیت‌آمیز ژن درمانی در ۱۴ سپتامبر ۱۹۹۰ روی Ashanti Desilva صورت گرفت. این کودک که اندکی کمتر از چهار سال داشت، از کمبود ایمنی شدید و مرکب که به طور معمول کشنده است، رنج می‌برد. این دختر بچه دچار کمبود آنزیم آدنوزین‌دآمیناز (ADA) بود که برای عملکرد صحیح سیستم ایمنی لازم است. این بیماری با الگوی توارثی مغلوب آتوزومی به ارث می‌رسد.

پس از نخستین ژن درمانی، تاکنون این شیوه در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند، Gaucher، Cystic Fibrosis و Familial hypercholesterolemia نتایج مثبتی در پی داشته است (۲۴ و ۲۲ ـ ۲۰).

بیماری هموفیلی یک بیماری مغلوب وابسته به X است که به دلایل متّعدد، نامزد مناسبی برای استفاده از ژن درمانی می‌باشد. از جملهٔ این دلایل، به ویژه موارد زیر قابل تأکید است: ژن مربوط به هموفیلی در انسان و بسیاری دیگر از پستانداران کلون شده است. افزایشِ کمی در مقدار عامل ۸ خون (حتی حدود ۱۰ـ۵٪ میزان طبیعی)، علایم بالینی بیمار را به نحو شگفت‌آوری بهبود می‌بخشد (بدین نحو که هموفیلی شدید را به متوسط و هموفیلی متوسط را به خفیف تبدیل می‌کند). از آنجا که پروتئینِ مربوط به عامل ۸ برای اندام خاصی سمی نیست، احتیاجی به ایجاد محدودیت در تولید آن وجود ندارد. علاوه بر این مقادیر اضافی پروتئین تولید شده که نتوانند در خون به پروتئین VWF متصل شوند، خود به خود هضم شده و از بین می‌روند. البته، در روند ژن درمانی هموفیلی مشکلاتی نیز وجود دارد که اندازه بزرگ ژن عامل ۸ (یادآوری: cDNA مربوط

به آن حدود ۹ کیلو باز می‌باشد) که یافتن ناقل (Vector) مناسب را مشکل می‌کند؛ حساسیت زیاد پروتئین آن به پروتئولیز و لزوم ترشح عامل ۸ به خون یا داخل صفاق از آن جمله است که بایستی راه حل‌های مناسبی برای آنها یافت شود.

به طور کلی در بیماری‌هایی مانند هموفیلی از فنِ ژن درمانی In vivo یا Ex vivo می‌توان استفاده کرد. در روش Ex vivo سلول‌ها از بدن بیمار جدا می‌شوند و در شرایط مناسب آزمایشگاهی تغییرات ژنتیکی لازم در آنها داده می‌شود و سلول‌هایی که از هر جهت مناسب باشند، دوباره به بدن بیمار وارد می‌شوند. در این روش تنها از سلول‌هایی از بدن می‌توان استفاده کرد که صلاحیت‌های لازم را داشته باشند، به ویژه بتوان آنها را به راحتی از بدن خارج کرد و دوباره به بدن بازگرداند. سلول‌های پوست یا سلول‌های دستگاه خون ساز نمونه‌هایی مناسب از این سلول‌ها، هستند. رتروویروس‌ها از ناقلین مهم مورد استفاده در این روش هستند.

لازم به تأکید است که استفاده از ناقلین مناسب برای ژن درمانی، از اهمیّت ویژه‌ای برخوردار است. ناقل مناسب، ناقلی است که بتواند با کارآیی مطلوب، ژن مورد نظر را در سلول ویژه‌ای که هدف است، قرار دهد. رتروویروس‌ها، زمانی که به درون سلول تزریق می‌شوند با استفاده از آنزیم نسخه برداری معکوس (Reverse transcriptase) از روی RNA خود، DNA تولید می‌کند که وارد DNAی سلولی می‌شود و به این دلیل تغییر حاصل شده، دایمی بوده و تا زمان مرگ سلول ادامه خواهد داشت.

علی رغم مزایای متعدد، رتروویروس‌ها به عنوان ناقل، واجد محدودیت‌هایی نیز هستند، که موارد زیر از مهم‌ترین آنها به حساب می‌آیند:

از آنجا که DNAی این ویروس‌ها به طور تصادفی در کروموزوم میزبان ادغام می‌شود، نمی‌توان تعیین کرد که این DNA به طور دقیق در کدام قسمت DNAی سلولی وارد می‌شود و به همین دلیل این عمل باید در محیط کشت و شرایطی صورت بگیرد که سلول‌های نامناسب را بتوان پیش از وارد کردن به بدن میزبان جدا کرد. رخدادِ ادغام تصادفی DNAی ویروسی، همچنین می‌تواند موجب انهدام ژنی ضروری یا تغییر آن را به سمت سرطانی گردیدن، فراهم آورد.

رتروویروس‌ها، تنها قادر هستند سلول‌هایی را آلوده کنند که در حال تقسیم سلولی باشند و در واقع تنها زمانی توانایی وارد شدن به کروموزوم سلول را کسب می‌کنند که غشای هسته ناپدید شود. علاوه بر این رتروویروس‌ها توانایی حمل ژن‌هایی بزرگتر از حدود ۸ کیلو باز را ندارند. در ژن درمانی هموفیلی، برای حل این مشکل، قلمرو مربوط به B از ژن حذف می‌شود و در آزمایش‌های انجام شده، پروتئین حاصله به خوبی عمل کرده و وضع انعقادی طبیعی ایجاد کرده است. از آنجا که سلول‌های کبدی که محل تولید اصلی عامل ۸ هستند، سلول‌هایی در حال تقسیم فعال نیستند، در حال حاضر، از سلول‌هایی مانند فیبروبلاست‌ها استفاده

می‌شود. اگر چه مطالعات انجام شده روی موش‌ها تاکنون نسبتاً موفقیت‌آمیز بوده است و در تمام این موارد، پیشرفت‌های مهمی حاصل گردیده است اما این شیوه تاکنون روی انسان آزمایش نشده است (۲۴، ۲۲ و ۲۱).

در روش In vivo، مادهٔ ژنتیکی با ناقل مناسب، به طور مستقیم به بدن تزریق می‌شود. از این روش به طور معمول در بافت‌هایی (مانند سلول‌های مغز) استفاده می‌شود که امکان خارج کردن و کشت دادن آنها در خارج از بدن وجود ندارد. در این روش، معمولاً از آدنوویروس‌ها (Adenovirus)، ویروس‌های هرپس (Herpes Simple virus)، ویروس مجتمع با آدنو (Adeno-associated virus) یا لیپوزوم‌ها ـ به عنوان ناقل ـ استفاده می‌شود. از جمله ایرادهای قابل ذکر این روش آن است که نمی‌توان سلول‌هایی که ژن را دریافت کرده‌اند، بر اساس تظاهر مناسب یا نامناسب ژن انتخاب کرد. بنابراین، لزوم استفاده از فن آوری‌های مناسب انتقال ژن مشخص می‌گردد. چنانچه اشاره شد، یکی از ناقلین مهم در روش In vivo، آدنو ویروس‌ها هستند. ژنوم این ویروس‌ها در کروموزوم میزبان وارد نشده و تنها در سیتوپلاسم سلول آن هم به شکل موقت فعالیت می‌کنند. این ویروس‌ها، تمام انواع سلول‌ها را آلوده می‌کنند، بنابراین برای تظاهر آنها احتیاجی به تقسیم سلولی وجود ندارد. تأکید می‌گردد از آنجا که DNA این ویروس‌ها به صورت اپی‌زومی قرار می‌گیرد، در جریان تقسیم سلولی، DNA ویروسی به تمام سلول‌های حاصل از تقسیم نمی‌رسد. در نتیجه، تغییر حاصله در DNAی سلول طولانی مدت نمی‌باشد. از این رو، دوره درمانی باید به طور مرتب تکرار شود. این امر، خود موجب برانگیخته شدن پاسخ ایمنی بدن بر علیه ویروس می‌گردد.

امروزه، از آدنو ویروس‌ها ـ به عنوان ناقل ـ در درمان هموفیلی استفاده می‌شود و برای افزایش ترشح پروتئین، آغازگر (Promoter) مربوط به ژن آلبومین به ژن هموفیلی اضافه می‌شود که ساخت عامل ۸ را به تعداد زیاد ممکن می‌کند. علاوه بر این، به دلیل آنکه این آغازگر، تنها در سلول‌های کبدی فعال می‌شود، موجب ساخت انتخابی پروتئین در سلول‌های کبدی می‌گردد. تاکنون این روش‌ها در سگ و موش امتحان گردیده و پس از یک تزریق، ترشح موفقیت‌آمیز پروتئین تا ۱۴ ماه گزارش شده است. این کار ازمایی‌ها، در انسان تنها به شیوه In vitro انجام شده است و نتایج رضایت بخشی در برداشته است. چالش اساسی در مسیر این درمان برانگیخته شدن پاسخ ایمنی بدن است. امروزه، جهت حل این مشکل از روش‌هایی چون سعی در حذف ژن‌های ساختاری ویروس جهت به حداقل رساندن ایمنی زایی آن، سرکوب ایمنی و ایجاد تحمل و مقاومت استفاده می‌شود. علاوه بر آدنو ویروس‌ها، از رتروویروس‌ها، لنتی ویروس‌ها (Lentivirus) و ویروس مجتمع با آدنو نیز استفاده شده است و با به کارگیری این ویروس‌ها، پژوهش‌های ارزشمند گسترده‌ای در حال انجام است. خطرات ـ نسبی ـ استفاده از

بازآموزی

ویروس‌ها موجب شده است که استفاده از روش‌های غیر ویروسی مانند لیپوزوم هم ـ به عنوان ناقل ـ مد نظر قرار گیرد.

لیپوزوم، حباب‌های کوچک کروی از چربی دو لایه هستند که ساختار دو لایه غشای سلولی را تقلید می‌کنند. این حبابها به عنوان بسته‌بندی DNA عمل می‌کنند و موجب می‌شوند DNAی وارد شده به بدن، سالم به سلول‌ها برسد. در سطح سلول، لیپوزوم به سلول می‌چسبد و توسط سلول آندوسیتوز می‌شود. البته قدرت انتقال ژن یا بازدهی آن در این روش در مقایسه با ناقلین ویروسی، بسیار پایین است. به علاوه، DNAی وارد شده به DNAی داخل سلول وارد نمی‌شود، در نتیجه تظاهر ژن به طور موقت انجام می‌گیرد و نیاز به درمان‌های مکرر وجود دارد. در درمان هموفیلی از روش مشابه لیپوزوم یعنی ترکیب DNA/Polylysine/asialoglycoprotein همراه با گیرنده‌هایی برای سلول‌های کبدی استفاده می‌شود. استفاده از این روش هم اکنون در شرایط Invivo، بیان کوتاه مدت نشان داده است، اگر چه هنوز در مراحل ابتدایی است.

این شیوه و شیوه‌های مشابه در درمان هموفیلی (که مراحل آزمایشی را طی می‌کند)، به طور حتم در آیندهٔ هموفیلی به طرز ویژه و در کل پزشکی مولکولی به طور عام، نقش تعیین کننده‌ای بر جای خواهند گذاشت. برای کسب اطلاعات بیشتر پیرامون ناقلین مورد استفاده در ژن درمانی و انتخاب و طراحی ناقلین مناسب، خوانندگان ازجمند می‌توانند به منابع متعدد، به ویژه منابع ۲۱ و ۲۲ و ۲۶ مراجعه کنند.

با اذعان بر این واقعیت که ژن درمانی هنوز دوران جنینی را می‌گذراند و با توجه به این مهم که در محدودهٔ موفقیت‌های جاری خود، روشی پر هزینه بوده و به فنون پیشرفته و مهارت‌های علمی بسیاری وابسته است و از این رو امروزه به طور عمده استفاده از آن در سطح بالینی به مراکز پژوهشی و پزشکی معتبر جهانی محدود است؛ اما انبوهی از شواهد به روشنی نمایانگر آن است که ژن درمانی، به زودی در پزشکی مولکولی تحولی اساسی را رقم خواهد زد.

منابع:

1. Di Michele D, "Hemophilia 1996, A new approach to an old disease", Pediatric hematology, . **43**, No.3, 709 - 735, June 1996.
2. Rotblot F, Goodall AH, O'Brian DP, et al "Monoclonal antibodies to human procoagulant factor VIII", Journal of laboratory and clinical medicine, **101**, 736 - 746, 1983.
3. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al "Characterization of the human factor VIII gene", Nature,**312**, 326 - 330, 1984.
4. Rudzki Z, Rodgers SE, Sheffield L,J et al "Detection of Carriers of hemophilia A: use of bioassays and restriction fragment length polymorphisms (RFLP)", Australia and NewZealand Journal of medicine, **26**, 195 - 205, 1996.
5. Dangerfield TG, Manga P, Field SP, et al "Feasibility of prenatal diagnosis and carrier detection in south African hemophilia patiens", British Journal of Haematolgy, **97**, 558 - 560, 1997.
۶. الیوراستفن جی، وارد جان ام، "فرهنگ مهندسی ژنتیک" (ترجمه همراه با اضافات: دکتر محمدرضا نوری دلویی،

دکتر سامیه خسروی نیا، فرهت مجیدفر)، انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، چاپ اول، پاییز ۱۳۷۳.
۷. علی بخشی رضا، "بررسی مولکولی جهش‌های ژن عامل VIII در اگزون ۲۴ در یک صد فرد مبتلای ایرانی"، پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۴.
8. Gokmen Yesim, "Molecular diagnosis of two heritable bleeding disorders: hemophilia A and hemophilia B", Ph.D thesis, Bogazici University, 1993.
9. Vehar GA, Keyt B, Eaton D, et al "Structure of human factor VIII", Nature, **312**, 337 - 342, 1984.
10. Hill - Eubanks DC, Parker CG, Lollar P" Differential proteolytic activation of factor VIII - Von Willebrand factor complex' by thrombin" Proclamation of national Academy of Science of U.S.A, **86**, 6508 - 6812, 1989.
11. Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA, "Proteolytic processing of human factor VIII, correlation of speciffic cleavages by thrombin, factor Xa and activated protein C with activation and inactivation of factor coagulant activity", Biochemistry, **25**, 505 - 512, 1989.
12. Mann KG, Nesheim ME, Roberts J, et al "Surface - dependent reactions of the vitamin - k dependent enzyme complexes", Blood, **76**, 1 - 16, 1990.
13. Poustka A, Dietrich A, et al, "Physical map of human Xq 27 - q ter: Localizing the region of the fragile X mutation", Proclamation of national Academy of science of U.S.A, **56**, 8302 - 8306, 1988.
14. Levinson B, kenwrick S, Thomson J, et al "A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene", Genomics, **7**, 1 - 11, 1990.
15. Tuddenham EG, Schwaab R, Seehafer J, et al "Hemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertion and rearrangements of the factor VIII gene", Second edition, Nucleic acids research, **22**, 4851 - 4868, 1994.
16. Hamster site, httP:// europium. mrc.rpms.ac.uk/
17. Friedman JM, Dill FJ, Hayden MR, et al "Genetic" Second edition, Williams and Wilkins, chapter **5**, 83 - 86, 1996.
18. Kazazian HH, Youssoufian H, "hemophilia A resulting from the novo Insertion of L 1 Sequences represents a novel mechanism for mutation in man", Nature, **332**, 164 - 166, 1988.
19. Connelly S, Kaleko M, "Gene therapy for hemophilia A," Thrombosis and haemostasis, **78** (1), 31 - 36, 1997.
20. Strachen T, Read AP, "Human molecular Genetics" BIOS Scientific Publisher, chapter **20**, 551 - 585, 1997.
۲۱. نوری دلویی محمدرضا، "نظری بر ژن درمانی و چشم انداز آن"، مجله ارولوژی ایران، سال دوم، شماره ۵ و ۶، بهار و تابستان ۱۳۷۴، صفحات ۲۱ ـ ۱۳.
۲۲. نوری دلویی محمدرضا، "نظری بر ژن درمانی و چشم انداز آن"، مجله ارولوژی ایران، سال اول، شماره ۴، زمستان ۱۳۷۳، صفحات ۷۵ ـ ۶۵.
۲۳. نوری دلویی محمدرضا، حسینی مونا، "ژنتیک مولکولی، ژن درمانی و چشم اندازهای آن در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال"، مجله طب و تزکیه، پاییز ۱۳۷۷، شماره ۳۰، صفحات ۸۰ ـ ۵۷ (مقاله بازآموزی).
۲۴. نوری دلویی محمدرضا، فریور شیرین، "ژنتیک مولکولی و ژن درمانی در مبتلایان به کره هانتینگتون"، مجله رازی، فرودین ۷۷، سال نهم، شماره ۳، صفحات ۵۳ ـ ۴۴.
۲۵. نوری دلویی محمدرضا، فریور شیرین، "ژنتیک مولکولی و ژن درمانی در مبتلایان به دیستروفی ماهیچه‌ای دوشن"، مجله رازی، اردیبهشت ۷۷، سال نهم شماره ۴، صفحات ۳۰ ـ ۸ (مقاله بازآموزی).
۲۶. قسمت اول، نوری دلویی محمدرضا، نیک پور برزو، "ژن درمانی در سرطان و پیشرفت‌های آن"، مجله رازی، خرداد ۷۸، سال دهم، شماره ۵، صفحات ۲۸ ـ ۹.
۲۷. نوری دلویی محمدرضا، "ژنتیک مولکولی، نظری بر ژن درمانی و چشم اندازهای آن در بیماران مبتلا به ملانومای بدخیم"، (پذیرفته شده برای چاپ)، ۱۳۷۸ مجله طب و تزکیه، شماره ۳۳، تابستان ۱۳۷۸، صفحات ۷۱ ـ ۶۳.
۲۸. نوری دلویی، محمدرضا، حسینی، مونا، ژنتیک مولکولی، ژن درمانی و چشم اندازهای آن در بیماران مبتلا به ملانومای بدخیم؛ قسمت دوم، مجله طب و تزکیه، شمارهٔ ۳۴، پاییز ۱۳۷۸، صفحات ۷۱ ـ ۶۰.