

بررسی موتاسیون در فاکتور ۵ - انعقادی و ژن پروترومبین در جنوب ایران

چکیده :

مقدمه و هدف: موتاسیون ارثی فاکتور ۵ و پروترومبین اگر چه شایع نیستند، ولی از عوامل دخیل در ترومبوز کودکان به شمار می‌روند. این پژوهش به منظور بررسی موتاسیون در فاکتور ۵ - انعقادی و ژن پروترومبین در بین بیماران بستری انجام گردید .

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی - مقطعی ۱۹۵ نفر بیمار شامل: ۹۷ زن و ۹۸ مرد به صورت تصادفی از بین بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های نمازی و دستغیب شیراز که به عللی غیر از حوادث ترومبوآمبولی بستری شده بودند در سال ۱۳۸۳ انتخاب و پس از اخذ ۵ میلی‌لیتر خون سیتراته، دی‌ان‌آ ایشان استخراج و تلخیص گردید. سپس دی‌ان‌آ را با پرایمرهای خاص فاکتور ۵ - لیدن یا پلی‌مرفیسیم ژن پروترومبین مورد بررسی قرار داده و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز انجام گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با شاخص‌های توصیفی بررسی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه شیوع موتاسیون هتروزیگوت در فاکتور ۵ - لیدن ۴/۱ درصد و در ژن پروترومبین ۳/۰۷ درصد بود. ۱ مورد واجد هر دو موتاسیون به صورت توأمان بود. در هیچ یک از بیماران فرم هموزیگوت برای فاکتور ۵ - لیدن یا موتاسیون در ژن پروترومبین یافت نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، ژن‌های موتاسیون یافته مستعد کننده ترومبوفیلی در جامعه مورد مطالعه در مقایسه با نتایج حاصل از شرق آسیا مشخصاً شیوع بالاتر داشت.

واژه‌های کلیدی: موتاسیون ، فاکتور ۵ - لیدن، ژن پروترومبین

دکتر مهران کریمی *

دکتر علیرضا پناهنده **

دکتر عبدالرضا افراسیابی ***

*فوق تخصص خون و انکولوژی کودکان، استاد دانشگاه علوم پزشکی شیراز ، بیمارستان نمازی، بخش کودکان

**دستیار تخصصی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی

شیراز ، بیمارستان نمازی، بخش کودکان

***دکترای ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز،

بیمارستان شهید دستغیب شیراز،

مرکز تحقیقات هماتولوژی

تاریخ وصول: ۱۳۸۵/۳/۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۵/۸/۲۹

مؤلف مسئول: دکتر مهران کریمی

پست الکترونیک: Karimim@sums.ac.ir

مقدمه

اگر چه حوادث ترومبوآمبولی غالباً به عنوان بیماری بزرگسالان در نظر گرفته می‌شود، اما در سالهای اخیر به دنبال توسعه روش‌های درمانی متنوع نظیر جراحی‌های تسکینی یا ترمیمی، بیماری‌های مادرزادی قلبی، مراقبت‌های شدید در بخش مراقبت‌های ویژه به همراه استقرار کاتترهای طولانی مدت وریدی یا شریانی، استفاده از روش‌های هورمونی در درمان بعضی بیماری‌های دختران و زنان و اقدامات جراحی با بیهوشی طولانی مدت، شیوع حوادث ترومبوآمبولی در نوزادان و شیرخواران و کودکان و نیز نوجوانان را افزایش داده است. نکته قابل ذکر در این زمینه ابتلاء بعضی از بیماران در شرایط مساعد کننده ذکر شده در بالا به حوادث ترومبوآمبولی و مصون بودن بعضی دیگر است که پاسخ آن تا حد زیادی با در نظر گرفتن فاکتورهای ژنتیکی مساعد کننده ترومبوآمبولی قابل فهم است(۱).

موتاسیون فاکتور ۵ - انعقادی که به عنوان فاکتور ۵ - لیدن شناخته می‌شود و موتاسیون در ژن پروترومبین از جمله شایع‌ترین اختلالات ارثی مرتبط با حوادث ترومبوآمبولیک به شمار می‌آیند که شیوع متفاوتی در کشورهای مختلف دارند(۲).
موتاسیون در فاکتور ۵ - لیدن در اکسون شماره ۱۰ مربوط به ژن فاکتور ۵ انعقادی رخ می‌دهد که بر روی کروموزوم شماره یک قرار دارد، نتیجه آن جایگزینی نوکلئوتید گوانین به وسیله آدنین در جایگاه یک هزار

و ششصد و نود و یکمین (۱۶۹۱) نوکلئوتید و نتیجه آن جایگزینی اسید آمینه گلیسین به جای آرژینین در موقعیت پانصد و ششم (۵۰۶) زنجیره آمینواسیدی حاصله است. در حاملین این موتاسیون غیرفعال‌سازی فاکتور ۵ به نحو بارزی کاهش یافته و سطح ترومبین افزایش می‌یابد، لذا به طور مشخصی خطر لخته شدن افزایش می‌یابد(۳).

در موتاسیون در ژن پروترومبین آدنین به جای گوانین در ناحیه ۳ ژن پروترومبین در موقعیت ۲۰۲۱۰ می‌نشیند. در نتیجه سطح پروترومبین پلاسما و ریسک لخته شدن خون افزایش می‌یابد. اگر چه خواستگاه این ژن را در قفقازی‌های اروپا می‌دانند و بروز آن در آسیای‌ها بسیار نادر گزارش شده است(۴)، با وجود این با توجه به این که ایران سرزمینی است که به لحاظ جغرافیایی حد واسط اروپا و آسیا قرار گرفته است، لذا شیوع موتاسیون‌های ذکر شده در بالا لازم است در آن مورد بررسی قرار گیرد. این موضوع به ویژه از آن جهت مهم است که توصیه در خصوص غربالگری بیماران در شرایط ریسک بالا برای ترومبوآمبولی مستلزم شناخت ویژگی‌های ژنتیکی مستعد کننده لخته شدن خون در افراد می‌باشد.

هدف از این مطالعه بررسی موتاسیون در فاکتور ۵ - انعقادی و ژن پروترومبین در بین بیماران بستری شده در بیمارستان‌های شیراز برای اولین بار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی - مقطعی ۱۹۵ نفر شامل ۹۷ زن و ۹۸ مرد به صورت تصادفی از بین بیماران بستری شده در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های نمازی و دستغیب شیراز که به عللی غیر از حوادث ترومبوآمبولی بستری شده بودند در سال ۱۳۸۳ انتخاب شدند. میانگین سنی افراد مورد مطالعه ۲۹/۶۸ سال و در محدوده سنی ۱ ساله تا ۶۴ ساله قرار داشتند. در گروه مورد مطالعه ۸۵ درصد متولد استان فارس، ۵/۶ درصد استان خوزستان، ۱ درصد بوشهر، ۲/۶ درصد کهگیلویه و بویراحمد، ۴/۱ درصد هرمزگان و ۰/۵ درصد لرستان بودند. فرم رضایت قبل از خونگیری از بیماران یا والدین آنان گرفته شد.

در مرحله اول برای تهیه پلاک گلبول‌های سفید و حذف گلبول‌های قرمز از بافر A شامل؛
0.32 Soucrose + 1M Tris HCl+ 1M MgCl2+ Tritron 100
 استفاده شد. پس از افزودن ۵۰ میلی‌لیتر بافر A به نمونه و سانتریفوژ کردن آن در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار، پلاک گلبول سفید به دست آمد و گلبول‌های قرمز حذف گردید.

در مرحله دوم پلاک ایجاد شده با استفاده از بافر B حل گردید. بافر B شامل؛
400mM NaCl +2 mμEDTA+10 mM Tris-HCl
 است. پس از افزودن بافر B به پلاک تهیه شده از گلبول‌های سفید و سانتریفوژ کردن، گلبول‌های سفید

را پاره کرده و با کمک پروتئیناز کا^(۱)، دی‌ان‌آ^(۲) را جدا کرده، مورد شستشو قرار داده و با کمک اتانول خالص‌سازی انجام شد و دی‌ان‌آ را خشک کرده یا در بافر TE در فریزر نگهداری گردید. سپس با استفاده از پرایمرهای خاص فاکتور ۵ - لیدن یا پلی‌مرفیسم ژن پروترومبین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز^(۳) انجام شده و سپس با کمک آنزیم‌های امان‌ال‌وان^(۴) و اندونوکلائاز^(۵) برش داده و پس از انکوباسیون در دمای خاص مجدداً محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز بررسی گردید و حامل یا نرمال بودن ژن بررسی و دسته‌بندی گردید.

اساس کار واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و پرایمرها در فاکتور ۵ - لیدن به شرح زیر است؛
 جابجایی G 1691 A در این ژن می‌تواند باعث تغییر اسیدآمین آرژینین به گلوتامین در محل ۵۰۶ گردد. این موتاسیون سبب کاهش اثر پروتئین C فعال شده روی فاکتور ۵ فعال می‌شود. توالی پرایمرها به قرار زیر بود؛

Forward: 5`- TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3`
 Reverse: 5`- TTCGGCAGTGATGGTACTGA- 3`

مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در مورد فاکتور ۵ - لیدن بدین شرح می‌باشد؛

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (۱ سیکل)، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه

1-Proteinase
 2-DNA
 3-Polymerase Chain Reaction (PCR)
 4-MNLI
 5- Restrictive Endo Nuclease MboI

سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (۲ سیکل).

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (۳۴ سیکل).

۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه (۱ سیکل).

سپس محصول را روی ژل ۲ درصد برده و پس از حصول اطمینان از کیفیت محصول مراحل برش آنزیمی با استفاده از آنزیم امانال وان انجام شد. پس از آنکوبه کردن به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه محصول را روی ژل استاندارد ۲/۵ درصد برده و نتایج حاصل در حضور مارکرها و کنترل‌های بیمار و نرمال مورد ارزیابی قرار داده شد.

اساس کار واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و پرایمرها در مورد ژن پروترومبین به شرح زیر است؛ جابجایی G 20210A در ژن پروترومبین با افزایش پروترومبین خون همراه است و بدین وسیله یکی از عوامل مهم در ایجاد لخته‌های وریدی است. با کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و با استفاده از یک جفت پرایمر و تکثیر قطعه‌ای از ژن پروترومبین حاوی باز شماره ۲۰۲۰۱۰ می‌تواند محل مناسبی را جهت برش آنزیم ایجاد نماید.

توالی پرایمرها در مورد ژن پروترومبین بدین شرح است:

Forward: 5' TTA, CAA, GCC, TGA, AGG, GA 3'

Reverse: 5' CCA, TGA, ATA, GCA, GTG, GGA, GCA, TTG, AAG, C3'

روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به مانند فاکتور ۵ - لیدن می‌باشد، ولی در برنامه دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز درجه حرارت‌های سیکل‌ها متفاوت و به شرح زیر می‌باشد:

۱ سیکل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه.

۲۵ سیکل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه.

۱ سیکل: ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

محصول با ژل ۲ درصد آگارز چک و سپس با آنزیم هیند^(۱) برش داده شد. سپس بعد از ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه می‌توان محصول را روی ژل ۲ درصد در مقابل مارکر بررسی نمود.

یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد که شیوع موتاسیون در فاکتور ۵ - انعقادی (فاکتور ۵ - لیدن) در ۸ نفر از ۱۹۵ بیمار (۴/۱ درصد) و موتاسیون در ژن پروترومبین در ۶ نفر از ۱۹۵ نفر (۳/۰۷ درصد) مشاهده گردید. هیچ موردی از فرم هموزیگوت برای فاکتور ۵ - لیدن یا موتاسیون در ژن پروترومبین یافت نشد و در ۱ بیمار هر ۲ موتاسیون به صورت توأمان دیده شد.

در خصوص میزان موتاسیون در ژن پروترومبین، آمار به دست آمده قابل مقایسه با جنوب اروپاست (۸). با توجه به میزان این موتاسیون در ترکیه و اروپا و نادر بودن آن در شرق آسیا (۹) می‌توان سیر حرکتی مشابهی نظیر آنچه در باره فاکتور ۵ - لیدن گفته شد تصور نمود. اگرچه در این زمینه لازم است مطالعه بیشتری انجام گیرد. همچنین گزارش قبلی از موتاسیون‌های فاکتور ۵ و ۲ در مرکز و شمال ایران نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین شمال و جنوب ایران وجود ندارد (۱۰).

در مجموع نتیجه‌گیری می‌شود که شیوع بالای فاکتور ۵ - انعقادی در ایران و نیز موتاسیون در ژن پروترومبین که معادل اروپا می‌باشد، ایده حرکت این ژنها در طی هزاران سال به سمت ایران را تقویت می‌نماید. با توجه به شیوع بالای ژن‌های موتاسیون یافته مستعد کننده تشکیل لخته در جامعه مورد مطالعه، علی‌رغم این که در این تحقیق مشخص گردید هتروزیگوت بودن برای فاکتورهای ارثی فوق شانس حوادث مرتبط به ترومبوآمبولی را افزایش نمی‌دهد، با وجود این در شرایط زیر غربالگری در خصوص ترومبوپیلی ارثی توصیه می‌شود؛ وابستگان حاملین ژن‌های ترومبوپیلی ارثی، کلیه بیماران مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی صرفه‌نظر از سن ابتلا، قبل از مصرف قرص‌های پیشگیری از بارداری، هورمون درمانی یا بارداری در زنان با سابقه ترومبوآمبولی وریدی در خانواده و نوزادان و شیرخواران شدیداً بدحال نیازمند کاتترهای مرکزی طولانی مدت.

در میان ۸ نفر حاملین فاکتور ۵ - لیدن ۶ نفر زن (۷۵ درصد) و ۲ نفر مرد (۲۵ درصد) و حاملین موتاسیون در ژن پروترومبین ۳ نفر زن (۵۰ درصد) و ۳ نفر مرد (۵۰ درصد) بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

اختلالات ترومبوآمبولیک باعث مرگ و میر جدی در بیماران در معرض خطر خواهد شد. از عوامل مهم ارثی ترومبوز فاکتور ۵ - لیدن و موتاسیون در پروترومبین می‌باشد که بررسی شیوع آن در جمعیت سالم که دچار لخته یا بیماری‌های آمبولیک و یا سکتة مغزی و قلبی نبودند برای اولین بار در شیراز مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه میزان شیوع فاکتور ۵ - لیدن معادل ۴/۱ درصد برآورد شد که از میزان آن در ترکیه به عنوان همسایه غربی که بین ۸/۹-۱۰/۳ درصد برآورد شده (۶ و ۵) کمتر، ولی از میزان برآورد شده در پاکستان و هند به عنوان همسایگان شرقی بین ۴/۳ - ۰ درصد (۷ و ۲) بیشتر است. این میزان در آذربایجان همسایه شمالی ایران، ۱۴ درصد (۶) و در عربستان در جنوب ایران ۲/۵ درصد (۵) به دست آمده است، لذا یک کاهش شیوع موتاسیون از غرب به شرق و از شمال به جنوب در شیوع فاکتور ۵ - لیدن (موتاسیون در ژن ۵ - انعقادی) دیده می‌شود. این مطلب مؤید این نظریه است که موتاسیون نخست در قفقازی‌های اروپا رخ داده و طی هزاران سال از غرب به شرق گسترش یافته است (۴).

تصمیم‌گیری در خصوص درمان پروفیلاکسی ضدانعقادی در این شرایط بستگی به سنجش‌های بالینی و در نظر گرفتن لزوم اقدامات ذکر شده و مقایسه آن با عوارض مصرف طولانی مدت داروهای ضد انعقادی دارد. در خاتمه شناسایی افراد در معرض خطر ترومبوز و پیشگیری از وقوع آن و در نتیجه جلوگیری از مرگ و میر بیماران از اهمیت زیادی برخوردار است، بنابراین در صورت وجود ترومبوز در فرد یا فامیل درجه یک و همچنین وجود سکته قلبی یا مغزی در سن زیر ۵۰ سال در فامیل درجه یک، لزوم انجام غربالگری عوامل ارثی ترومبوز در فرد از جمله فاکتور ۵ - لیدن و موتاسیون پروترومبین جهت جلوگیری از مرگ و میر ضروری به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

از مرکز توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان نمازی به خاطر راهنمایی در تهیه این مقاله و همکاری مریم غلامی و سمیه قربانی تشکر و قدردانی می‌گردد.

Factor V Leiden and Prothrombin Mutations in South of Iran

Karimi M^{*},
Panahande GH^{**},
Afrasiabi AR^{***}.

^{*} Professor of Pediatric, Department of Pediatric, Namazi Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

^{**} Assistant of Pediatric, Department of Pediatric, Namazi Hospital, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

^{***} PhD in genetic, Dastgheib Hospital, Hematology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

KEYWORDS:

Mutation,
Factor V Leiden,
Prothrombin

Received: 7/3/1385

Accepted: 29/8/1385

Corresponding Author: Karimi M
E-mail: Karimim@sums.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Factor V Leiden and prothrombin mutation are not common but they are involved in pediatric thrombosis. The aim of this study was to evaluate the frequency of factor V Leiden & prothrombin mutation in healthy population of Shiraz, south of Iran.

Materials & Methods: In this cross-sectional study 195 healthy people (97 female and 98 male) were randomly selected. Peripheral white blood cells obtained from 5 ml blood contained 1-2 mg/ml K₂- EDTA. Genomic DNA extraction was performed following the protocol described by Miller et al. PCR amplification was carried out in 25µl reaction volume containing 0.5 units Taq polymerase, 200µM dNTP, 500 µM of each of the previously described primers. After initial denaturation, 35 cycles at 95°C for 30s, and 72°C for 20s and followed extension by 72 for 10 min were performed. About 10µl of PCR product was digested with MNI I or Mbo restriction enzymes.

Results: In this study we determined factor V Leiden in 8 (4.1%) and prothrombin mutation in 6 individual (3.07%) of 198 cases in heterozygous form. No homozygous was seen for any of the mutations. Only one case presented a double heterozygous for factor V and prothrombin in this cohort.

Conclusion: Several studies of factor V Leiden and prothrombin mutations in the East of Asia showed the higher frequency of these mutations in Iran.

REFERENCES:

1. Luyendyk JP, Tilley RE, Mackman N. Genetic susceptibility to thrombosis. *Curr Atheroscler Rep* 2006; 8(3): 193-7.
2. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346: 1133-4.
3. Rees DC. The population genetics of factor V Leiden (Arg 506 Gln). *Br J Haematol* 1996; 95: 579-86.
4. Akar N, Akar E, Dalgin G, Sozouz A, Omurlu K, Cin S. Frequency of factor V Leiden (1691 G-A) Mutation in Turkish population. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1527-8.
5. Gul A, Ozbek U, Ozturk C, Balta G. Coagulation factor V gene mutation increase the risk of venous thrombosis in Behcet's Disease. *Br J Rheum* 1996; 35: 1178-80.
6. Gurgey A, Rustemou R, Parlak H, Inunc M, Konice M, Ozclik T. Prevalence of factor V Leiden and methylene tetrahydrofolate reductase C677T mutation in Azerbaijan. *Thromb Haemost* 1998; 80: 520-1.
7. Gou D, Naipal A, Reitsma PH. World distribution of factor v Leiden mutation. *Lancet* 1996; 347: 59.
8. Antoniadis T, Hatzis T, Kroupis C, Economou-Petersen E, Petersen MB. Prevalence of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations in a Greek population of blood donors. *Am J Hematol* 1999; 61(4): 265-7.
9. Gurgey A, Hicsonmez G, Parlak H, Balta G, Celiker A. Prothrombin gene 20210 G-A mutation in Turkish patients with thrombosis. *Am J Hematol* 1998; 59(2):179-180.
10. Zeinali S, Duca F, Zarbakhsh B, Tagliabue L, Mannucci PM. Thrombophilic mutations in Iran. *Thromb Haemost* 2000; 83(2): 351-2.