

فراوانی جهش ژن پروترومبین G20210A در بیماران ترومبوتیک

محمد حسین مقدسی^۱، شهرام سمیعی^۲، دکتر صدیقه امینی کافی آباد^۳، زهرا عطایی^۴، مهناز کواری^۴، مریم سبحانی^۵

چکیده

سابقه و هدف

ترومبوآمبولی وریدی یک بیماری شایع و خطرناک است. عواملی که سبب تمایل به ایجاد ترومبوز می شوند، ممکن است ارثی یا اکتسابی باشند. جهش پروترومبین G20210A که در منطقه ترجمه نشده ۳' ژن فاکتور II رخ می دهد، همراه با افزایش ابتلا به ترومبوز در جمعیت قفقازی دیده می شود، البته وجود این رابطه در جمعیت های دیگر هنوز مورد بحث است. سطح پروترومبین در افرادی که واریانت هتروزیگوت ژن پروترومبین G20210A را دارند تقریباً ۲۵٪ بیش از میانگین سطح پروترومبین در افراد طبیعی است. این مطالعه به منظور بررسی فراوانی جهش ژن پروترومبین G20210A در بیماران ترومبوتیک طراحی شده است.

مواد و روش ها

پژوهش حاضر از نوع توصیفی و مقطعی بود که بر روی نمونه ۲۹۹ بیمار مبتلا به ترومبوآمبولی انجام گرفت. بیماران مورد بررسی شامل ۱۱۶ مرد و ۱۸۳ زن بودند. ریسک فاکتورهای معمول در ترومبوز وریدی و ترومبوآمبولی ریوی از قبیل پروتئین C ، S ، کمبود آنتی ترومبین III و مقاومت به APC مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها

نتایج حاصل از این بررسی نشان می دهد که تنها ۱/۷٪ بیماران با ترومبوآمبولی، ناقل جهش پروترومبین G20210A بودند که یکی از جهش های شایع در جمعیت قفقازی می باشد (۱۸٪). فرم هموزیگوت PRT (پروترومبین) G20210A یافت نشد.

نتیجه گیری

این پژوهش نشان می دهد که جهش G20210A بر خلاف شیوع بالا در کشورهای غربی، در کشور ما از شیوع کمی برخوردار است (۱/۷٪). در حالی که مقاومت به پروتئین C فعال شده (APC) شایع می باشد.

کلمات کلیدی: پروترومبین، جهش، واکنش زنجیره ای پلیمرز، ترومبوآمبولی وریدی

تاریخ دریافت: ۸۶/ ۴/ ۲۷

تاریخ پذیرش: ۸۷/ ۲/ ۱۷

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک

۲- مولف مسئول: کارشناس ارشد بیوشیمی - مربی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

۳- متخصص آسیب شناسی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۴- کارشناس زیست شناسی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۵- کارشناس ارشد ژنتیک پزشکی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

مقدمه

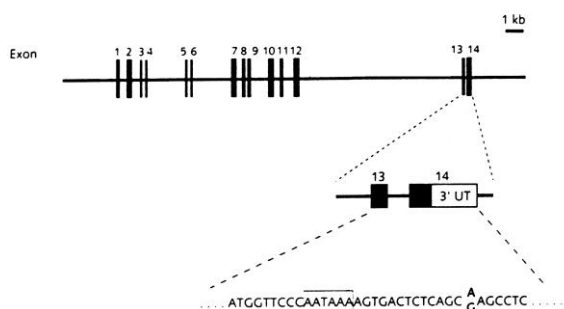
ترومبوز بیماری است که در سلامت عمومی اهمیت فراوانی داشته و یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر می‌باشد. در آمریکا سالانه حدود ۲ میلیون نفر در اثر ترومبوز وریدی یا شریانی جان خود را از دست می‌دهند. تاکنون در حدود ۹۰-۸۰ درصد علل ترومبوز شناخته شده است (۱). عواملی که سبب ایجاد ترومبوز می‌شوند، ممکن است ارثی یا اکتسابی باشند. عوامل ارثی شامل کمبود پروتئین C، پروتئین S، آنتی ترومبین III، فاکتور V لیدن، پروترومبین G20210A و ... است. عوامل اکتسابی شامل جراحی، مصرف داروهای ضدبارداری خوراکی (OCP)، حاملگی، بی‌حرکی طولانی مدت و ... می‌باشد.

نقایص ارثی در اتیولوژی ترومبوز نقش مهمی دارند. یکی از این نقایص ژنتیکی، جهش پروترومبین در موقعیت ۲۰۲۱۰ است که در ناحیه ترجمه نشده ۳' ژن فاکتور II رخ می‌دهد. در این جهش گوانین به وسیله آدنین جایگزین می‌شود (G20210A). این جهش سبب افزایش سطح پلاسمایی پروترومبین می‌شود و زمینه را برای ترومبوز وریدی فراهم می‌کند (۵-۲). علاوه بر پلی مورفیسم G20210A، پلی مورفیسم دیگری در ناحیه ۳' ژن پروترومبین با نام A19911G شناخته شده است. این پلی مورفیسم به تنهایی نقشی در ترومبوز ندارد ولی ژنوتیپ A/G ۱۹۹۱۱ خطر DVT را در دارندگان G20210A افزایش می‌دهد (۶).

ژن پروترومبین انسانی روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد و نزدیک سانترومر است (11P11-q12). پروترومبین به وسیله یک ژن بلند ۲۱ Kb کد می‌شود. این ژن از ۱۴ اگزون و ۱۳ اینترون تشکیل شده است (شکل ۱) (۲). این ژن دارای منطقه بالادست ترجمه نشده ۵' و منطقه ترجمه نشده ۳' است که این دو منطقه نقش تنظیمی در بروز ژن ایفا می‌کنند (۷، ۸).

با توجه به این که تاکنون در ایران مطالعه‌ای بر روی این جهش صورت نگرفته است، راه‌اندازی و بررسی شیوع جهش در بیماران نتایج حاصل از این پژوهش، می‌تواند در بررسی فاکتورهای خطر در بیماران ترومبوتیک کشور و در انتخاب روش درمانی مناسب،

طول درمان و پیشگیری ناقلین آلل G20210A فاکتور II در معرض خطر، موثر و مفید واقع گردد.



شکل ۱: ساختمان ژن فاکتور II انسان و جایگاه موتاسیون پروترومبین G20210A

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. بیماران مورد بررسی مبتلایان به ترومبوز وریدی بودند که در مراکز درمانی تهران از نظر بالینی، ترومبوز در آن‌ها به روش‌های مختلف از جمله سونوگرافی داپلر، ونوگرافی یا اسکن تشخیص داده شده بود و یا این که دارای سقط‌های مکرر و نازایی بودند و جهت انجام آزمایش‌های ترومبوتیک از جمله پروتئین C و S ... به آزمایشگاه سازمان انتقال خون ایران ارجاع داده شده بودند. DNA با روش Chelex-100 استخراج گردید و به کمک PCR تکثیر شد (۹). توالی بازی آغازگرهای استفاده شده به صورت زیر بود:

آغازگر رفت 5'-GCACAGACGGCTGTTCTCTT-3'

آغازگر برگشت 5'-ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC-3'
یک باند ۸۰۰ bp گویای استخراج صحیح و مناسب DNA نمایان شد. علاوه بر این، وجود یا عدم وجود مهارکننده Taq-Polymerase نیز تا حدودی مشخص گردید. سپس بافر هضم آنزیمی (Digestion Buffer) مربوط به RFLP را اضافه نموده و مقدار ۱ میکرولیتر (۱۰ Unit) آنزیم Hind III به این بافر افزوده شد. بعد از اضافه کردن محصول PCR، مخلوط به مدت ۲ ساعت در حرارت ۳۷°C (water bath) قرار داده شد و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵°C غیر فعال‌سازی آنزیم انجام شد، الکتروفورز ژل پروترومبین G20210A پس از RFLP روی ژل آگاروز ۳٪ انجام گرفت.

اندازه‌گیری پروتئین‌های C، S و آنتی‌ترومبین III بدین ترتیب بود که ۳۴٪ کمبود پروتئین C، ۱۷٪ کمبود پروتئین S و ۲۳٪ کمبود آنتی‌ترومبین III داشتند. در بین بیماران، ۹۷٪ نسبت به پروتئین C فعال مقاوم بودند. در بین بیماران بررسی شده، ۵ نفر (۱۷٪) دارای جهش ژن پروترومبین G20210A بودند. ۴۰٪ (۲ نفر) افراد دارای آلل موتانت، مرد و ۶۰٪ (۳ نفر) زن بودند و تفاوت مشاهده شده به کمک آزمون دقیق فیشر، بررسی گردید، تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۱).

جدول ۱: فراوانی مطلق و نسبی آلل موتانت پروترومبین G20210A در بیماران مورد مطالعه به تفکیک جنس

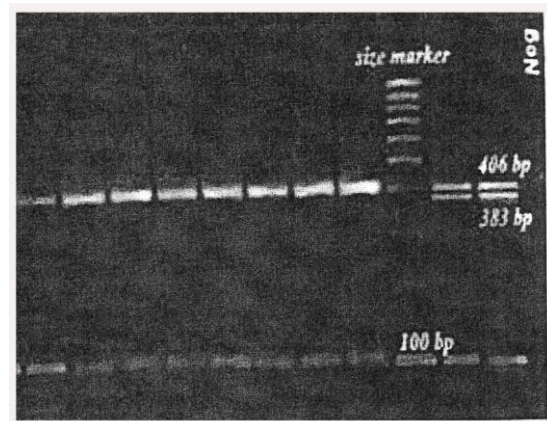
فراوانی	Wild – Type		Mutant – Type	
	نسبی	مطلق	نسبی	مطلق
مرد	۱۱۴	۳۸/۱٪	۲	۶۸/۰٪
زن	۱۸۰	۶۰/۲٪	۳	۱/۰۲٪
کل	۲۹۴	۹۸/۳٪	۵	۱/۷٪

داروی ضد بارداری خوراکی (OCP) به تنهایی بدون حضور دیگر فاکتورها، خطر ترومبوز را ۲ تا ۴ برابر افزایش می‌دهد و در حضور فاکتورهای خطر ژنتیک، نظیر فاکتور V لیدن و پروترومبین G20210A این ضریب افزایش حتی به ۸۰ برابر هم می‌رسد. پس وجود توام این فاکتورهای خطر بسیار اهمیت دارد. از این رو مصرف OCP نیز در زنان بررسی گردید.

از کل زنانی که در سن بارداری (۴۵-۱۵) قرار داشتند، ۱۸٪ مصرف کننده این داروها بودند. استروژن‌تراپی نیز از عوامل مساعد کننده ترومبوز و ریدی در زنان و افراد تحت درمان با این داروها بود. در حضور فاکتورهای خطر ژنتیک، شانس ترومبوز افزایش می‌یابد. استروژن‌تراپی در ۲/۲٪ زنان (۴ نفر) دیده شد ولی هیچ یک ناقل آلل موتانت G20210A نبودند. در بیماران با ترومبوز و ریدی انتخاب شده که دارای سابقه فامیلی ترومبوز یا سابقه شخصی و قبلی ترومبوز و ریدی بودند، احتمال حضور فاکتورهای خطر ژنتیک نظیر پروترومبین G20210A بیشتر است. در بین بیماران تحت مطالعه در

در تمام موارد (هم آلل موتانت و هم آلل طبیعی) قطعات ۱۰۰ bp ایجاد می‌شود. در موارد موتانت علاوه بر قطعه ۱۰۰ bp، یک قطعه ۳۸۳ bp و ۲۳ bp نیز ایجاد می‌شود.

در موارد طبیعی یک قطعه ۱۰۰ bp و یک قطعه ۴۰۶ bp ایجاد می‌شود. با این کنترل داخلی، دقت آزمایش RFLP به طور چشمگیری افزایش می‌یابد (شکل ۲). در مورد آزمون‌های آماری به کار گرفته شد در این پژوهش، مقدار P از طریق آزمون دقیق فیشر محاسبه گردید.



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن پروترومبین G20210A پس از هضم آنزیمی روی ژل آگاروز ۳٪

یافته ها

در این پژوهش ۲۹۹ بیمار شامل ۱۱۶ مرد (۳۸/۸٪) و ۱۸۳ زن (۶۱/۲٪) در محدوده سنی ۵ روز تا ۷۸ سال با میانگین سنی ۳۶/۳۷ (SD ± ۱۵/۰۹) سال مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد بیمار، ۲۶۶ نفر دچار ترومبوز ورید عمقی اثبات شده بودند که ۳/۰٪ (۱ نفر) دچار ترومبوز طحال، ۱۷/۱٪ (۵ نفر) ترومبوز ورید پورت، ۷/۷٪ (۲۳ نفر) ترومبوز ورید مغزی، ۸/۴٪ (۲۵ نفر) ترومبوز رتینال، ۸/۷٪ (۲۶ نفر) آمبولی ریوی (آمبولی ریوی در برخی به تنهایی گزارش شده بود) و ۶۲/۲٪ (۱۸۶ نفر) نیز دارای ترومبوز اندام‌های تحتانی بودند و ۱۱/۰۳٪ (۳۳ نفر) دیگر که مورد بررسی قرار گرفتند، دچار سقط جنین بودند. نتایج حاصل از

این بررسی، ۳۳ نفر (۱۱٪) دارای سابقه فامیلی ترومبوز بودند. ۵۸ نفر (۱۹/۴٪) افراد نیز سابقه قبلی ترومبوز داشتند. هیچ یک از افراد که سابقه فامیلی ترومبوز را داشتند، ناقل آلل موتانت PRT G20210A نبودند. ولی در بین بیماران دارای سابقه فامیلی ترومبوز، ۳/۰۳٪ (۱ نفر) این افراد دارای آلل موتانت PRT G20210A بودند.

بیمارانی که سقط جنین ایدیوپاتیک داشتند، ۱۸٪ زنان (۳۳ نفر) را تشکیل می دادند. یعنی فراوانی آلل موتانت در زنان دچار سقط جنین ۶/۰۶٪ و در کل زنان ۱/۱٪ بود. ۱/۶٪ کل زنان ناقل آلل موتانت بودند.

بحث

با پیشرفت های مولکولی در دهه های اخیر، ساختمان ژن های مربوط به فاکتورهای انعقادی و عوامل مهارکننده آن ها تا حدود زیادی شناخته شده است و بر این اساس، رویکرد به شناسایی پلی مورفیسم های (عوامل ژنتیک) موثر در ترومبوز افزایش یافته است. اکنون آزمون های شناخت پلی مورفیسم هایی که به عنوان فاکتور خطر ترومبوزند رایج شده است.

جهش PRT G20210A، خطر ترومبوز را در افراد دارای جهش ۳ برابر بیشتر می کند. با توجه به فراوانی های گوناگونی که از این جهش در دنیا گزارش شده است (از نادر در خاور دور تا بسیار شایع در جنوب غربی اروپا) این بررسی به عنوان اولین گام جهت تعیین فراوانی این جهش در ایران در نظر گرفته شد.

در پژوهش های گوناگون، این پلی مورفیسم به تنهایی و به صورت هم زمان با دیگر پلی مورفیسم ها نظیر فاکتور V لیدن، MTHFR (متیلن تترا هیدرو فولات ردوکتاز) در بیماران با بیماری های ترومبوتیک گوناگون نظیر ترومبوز ورید عمقی اندام های تحتانی، ترومبوز جفت، ترومبوز ورید مغزی، ترومبوز ورید پورت اختلالات شنوایی ... بررسی شده است.

در سال ۱۹۹۸ زیولین و همکارانش این پلی مورفیسم را در ۱۶۷۰ یهودی با تبارهای (Ethnic groups) گوناگون بررسی کرد. این افراد سابقه ترومبوز نداشتند (پرسنل بیمارستان، بیماران سرپایی مراجعه کننده به بیمارستان،

پرسنل ارتش). فراوانی این آلل در یهودیان اشکنازی اروپایی ۶/۷٪، در یهودیان شمال آفریقا (سفاردیک) ۵/۵٪، در یهودیان ایرانی تبار ۲٪ و در یهودیان اتیوپیایی ۰٪ تعیین شد (۱۰).

در سال ۱۹۹۸ مارتینلی و همکارانش جهش PRT G20210A را در ترومبوز ورید مغزی بررسی کردند. همین طور میزان شیوع مصرف OCP را در افراد مبتلا به ترومبوز ورید مغزی (CVT) مورد مطالعه قرار دادند. فراوانی این جهش را در افراد با ترومبوز ورید مغزی ۲۰٪ یافتند و هم چنین مصرف OCP ۹۶٪ در زنان دچار CVT دیده شد در حالی که این مقدار در گروه شاهد ۳۲٪ (۲۲/۱٪) بود (۱۱).

هم چنین این پژوهشگران ۸۰ بیمار دچار DVT اندام های تحتانی را تصادفی انتخاب نمودند و از نظر مصرف OCP و بروز جهش PRT G20210A مورد بررسی قرار دادند که ۱۸٪ این افراد دارای جهش G20210A بودند. ۶۱٪ آنان از OCP استفاده می کردند.

فینان و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در لبنان شیوع فاکتور V لیدن و پروترومبین G20210A را در زنان با سقط مکرر بررسی کردند. از ۱۱۰ زن مورد بررسی، ۱۵ نفر (۱۳/۶۴٪) ناقل پروترومبین G20210A بودند. همه موارد هتروزیگوت بودند. در جمعیت کنترل، ناقلین ۲/۹۹٪ (۲ مورد) بودند (۱۲).

فراوانی جهش G20210A در بیماران با ترومبوز وریدی و مشکلات ترومبوتیک در ایران ۱/۷٪ بود. در حالی که فراوانی آن در مطالعه انجام گرفته در اروپا و آمریکا ۶/۲٪ و حتی در جمعیت نرمال جنوب اروپا ۳٪ می باشد. این فراوانی در اسپانیا به ۶٪ جمعیت نرمال (بالاترین فراوانی) می رسد. مطلب فوق نشان می دهد که این جهش در ایران کم است.

البته این جهش در آفریقا، شمال هند و آسیای خاوری نادر گزارش شده است. در یک بررسی، شیوع جهش PRT G120210A در یهودیان ایرانی تبار اسرائیل ۲٪ اعلام شده است.

۱۹/۴٪ بیماران بررسی شده در این پژوهش دارای سابقه دست کم یک بار و حداکثر ۴ بار ترومبوز بودند و

نژادی (Ethnic group) گوناگون زندگی می کنند و فراوانی جهش PRT G20210A در نژادهای گوناگون فرق می کند بنابراین پیشنهاد می شود که با توجه به گوناگونی نژادی در ایران، این جهش در نژادها و قومیت های مختلف مورد مطالعه قرار گیرد.

با توجه به فراوانی کم جهش PRT G20210A در ایران، انجام این آزمون به صورت روتین در بیماران ترومبوتیک توصیه نمی گردد اما در بیمارانی که ترومبوز در آن ها در بخش های غیر معمول مانند مغز و مزاتر رخ می دهد و در افرادی که سابقه سقط مکرر دارند، بررسی این جهش پیشنهاد می گردد.

راه اندازی و بررسی اولیه جهش PRT G20210A می تواند زمینه ساز پژوهش های بعدی در زمینه ترومبوفیلیای ارثی گردد.

انتظار می رفت که شیوع جهش PRT G20210A بیشتر باشد ولی جهشی در این گروه دیده نشد.

در مطالعات گذشته در این گروه از بیماران فراوانی جهش (در نژاد قفقازی) به ۱۸٪ رسید. احتمالاً این امر به دلیل فراوانی کم این آلل در ایران باشد. فراوانی این جهش از نزدیک به صفر در خاور دور شروع می شود و به تدریج به سمت غرب، افزایش می یابد و بیشترین شیوع آن در جنوب اروپا می باشد که در بیماران ترومبوتیک ۱۸٪ و در نرمال ها به ۶٪ می رسد.

نتیجه گیری

این بررسی نشان می دهد که فراوانی جهش PRT G20210A در ایران نادر است، البته باید به این نکته توجه داشت که در سرزمین پهناور ایران گروه های

References :

- 1- Bick RL. Disorders of Thrombosis & Hemostasis Clinical and Laboratory Practice. In: Bick RL, Williams F, editors. Hereditary Thrombophilia Disorders. 3rd edition. Lippincott Williams Wilkins; 2002:283-302.
- 2- Schot HG, Jhon HG. Hereditary Thrombophilia. In: Lichtman MA, Beutler E, Kaushansky K, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal J, editors. Williams Hematology. 6th edition. McGraw Hill Professional Publishing; 2001; 1697-714.
- 3- Gray ER, Russel DH. Venous Thrombosis. In: Lichtman MA, Beutler E, Kaushansky K, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal J, editors. Williams Hematology. 6th edition. McGraw Hill Professional Publishing; 2001; 1735-42.
- 4- Mueller T, Marschon R, Dieplinger B, Haidinger D, Gegenhuber A, Poelz W, et al. Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations are not associated with chronic limb ischemia: the Linz Peripheral Arterial Disease (LIPAD) study. J Vasc Surg 2005;41(5):808-15.
- 5- Cooper PC, Rezende SM. An overview of methods for detection of factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutations. Int J Lab Hematol 2007; 29(3):153-62.
- 6- Perez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, Vayá A, Montes R, González-Conejero R, et al. Prothrombin A19911G and G20210A polymorphism role in thrombosis. Br J Haematol 2002;118(2): 610-4.
- 7- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood 1996; 88 (10): 3698-703.
- 8- Drow P, Gribben J. Molecular Haematology. In: Bjorn D, Andreas H, editors. Molecular Coagulation and Thrombophilia. 1st edition. Blackwell Science; 2000. 164-5.
- 9- Harris E. A low-cost approach to PCR appropriate transfer of bimolecular technique. PCR protocols. Oxford University press; 1998: 100-2.
- 10- Zivelin A, Rosenberg N, Faier Sh, Kornbrot N, Peretz H, Mannhalter C, et al. A single genetic origin for the common prothrombin G20210A polymorphism in the prothrombin gene. Blood 1998; 92(4): 1119-24.
- 11- Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of prothrombin gene mutation and in users of oral contraceptives New Eng J Med 1998; 338: 1793-97.
- 12- Finan RR, Tamim H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Prevalence of factor V G1691A (factor V-leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population American Journal of Hematology 2002; 71: 300-5.

The prevalence of G20210A gene mutations in thrombotic patients

Moghaddasi M.H.¹(MS), Samiee Sh.²(MS), Amini Kafi Abad S.²(MD), Attaei Z.²(BS), Kavari M.²(BS), Sobhani M.²(MS)

¹Azad University, Arak Branch, Iran

²Iranian Blood Transfusion Organization - Research Center, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Thrombophilia is a common and dangerous disease. It may be heritable or acquired. A substitution in the 3' untranslated region of prothrombin gene (PRT-G20210A) has been reported to be related to thrombophilia in Caucasians, but this relationship remains in debate in other populations. The heterozygote form of PRT G20210A gene variant expresses prothrombin 25% higher than the average level. This study was performed to evaluate the prevalence of G20210A gene mutations in thrombotic patients.

Materials and Methods

In this descriptive and cross sectional study, 299 patients with venous thromboembolism were selected. The subjects consisted of 116 male and 183 female. Traditional risk factors for venous thrombosis and pulmonary thromboembolism such as proteins C, S, ATIII deficiency and APC-resistance were investigated as well.

Results

We found that only 1.7% of patients with venous thromboembolism were carrier of prothrombin G20210A mutation which is one of the prevalent point mutations in Caucasians patients (18%). The homozygote form of PRT G20210A was not found.

Conclusions

Prothrombin G20210A mutations in Iranian population as opposed to western populations are rare (1.7%) with APC-resistance being common in the former.

Key words: Prothrombin, Mutation, PCR, Venous thromboembolism
SJIBTO 2008; 5(2): 67-72

Received: 18 July 2007

Accepted: 6 May 2008

Correspondence: Samiee Sh., MS of Biochemistry. Iranian Blood Transfusion Organization - Research Center. P.O.Box:14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax : (+9821)88601599
E-mail: shsamie@ibto.ir