دانشور
پزشکی

بررسی جهش فاکتور پنج لیدن (R506Q) در بیماران ترومبوفیلیک با استفاده از روش PCR-RFLP

نویسندگان: علی علی‌نژاد*[1]، صدیقه امینی کافی‌آبادی[2]، دکتر شهرام سمیعی[3] و دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله[4]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. استادیار هماتولوژی سازمان انتقال خون
۳. مربی هماتولوژی سازمان انتقال خون
۴. دانشیار هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس
* نویسنده مسئول: Email: p_m5361@yahoo.com

چکیده

زمینه: شایع‌ترین علت مرگ در آمریکا، ترومبوز است و سالیانه بیش از دو میلیون نفر در اثر ترومبوز شریانی یا وریدی جان می‌سپارند. حملات ترومبوتیک ممکن است در اثر یک ناهنجاری مادرزادی یا تغییرات اکتسابی رخ بدهند. واژه «ترومبوفیلی» برای توصیف هر نوع ناهنجاری مرتبط با افزایش تمایل به ترومبوآمبولی وریدی، چه ارثی و چه اکتسابی، مورد استفاده قرار می‌گیرد.
فاکتورهای خطر بالینی که مستعد ترومبوز وریدی هستند عبارتند از: ۱) آسیب دیدگی دیواره عروقی، ۲) فاکتور v لیدن و مقاومت به پروتئین c فعال شده، ۳) کمبود مهارکننده‌های پروتئازی در گردش، ۴) افزایش سطوح پروترومبین، ۵) آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپیدی، ۶) افزایش هموسیستئین در خون، ۷) کاهش فعالیت سیستم فیبرینولینیک، ۸) بدخیمی.
عوامل ارثی و اکتسابی متعددی در ایجاد ترومبوز وریدی دخالت دارند که از بین عوامل ارثی می‌توان از جهش‌های فاکتور V لیدن، پروترومبین G20210A، آنزیم متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز C677T و هاپلوتیپ HR2، و از بین عوامل اکتسابی از آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپیدی و ترومبوفیلی‌های مادرزادی نام برد.
ترومبین، پروتئین C را فعال می‌سازد و پروتئین C انعقاد را به‌وسیله غیرفعال ساختن فاکتورهای Va و VIIIa مهار می‌کند. یک مکانیسم جدید برای ترومبوفیلی فامیلی در سال ۱۹۹۳ مورد شناسایی قرار گرفت که با مقاومت ذاتی به پروتئین C فعال شده مشخص می‌شود. به‌طور فیزیولوژیک، فاکتور پنج فعال شده (FVa) سریعاً توسط پروتئین C فعال (APC) به‌منظور حفظ حالت طبیعی هموستاز غیرفعال می‌شود. غیرفعال شدن کامل FVa طبیعی با شکستگی‌هایی در R506، R306 و R679 توسط APC در ارتباط است. به نظر می‌رسد شکسته شدن R506 برای ارائه مطلوب جایگاه‌های شکست در R306 و R679 ضروری باشد و شکستگی‌هایی در R506 و R679 توانایی کوفاکتوری FVa را در واکنش، هم با FXa و هم با پروترومبین از بین می‌برد. چندین نقص ژنتیکی در FV گزارش شده و اعتقاد بر این است که از بین این‌ها جهش Leiden، در موقعیت506 [گلوتأمین جانشین آرژنین شده است (R506Q)] منجر به مقاومت به APC می‌شود و زمینه ژنتیکی با شرایط انعقادپذیری بالا را به وجود می‌آورد. موتاسیون FV لیدن، شایع‌ترین ریسک فاکتور زمینه‌ای برای ترومبوز وریدی است. با توجه به اهمیت جهش فاکتور V لیدن به‌عنوان عامل زمینه در بروز عوارض ترومبوامبولی برآن شدیم تا به بررسی فراوانی این جهش در بیماران ترومبوفیلیک مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون تهران بپردازیم.
روش کار: در این تحقیق، ابتدا مقاومت به پروتئین C (APC-R) ۳۰۰ بیمار به روش Clotting اندازه‌گیری شده و سپس DNA نمونه‌هایی که APC-R غیرطبیعی داشتند (۲۳ بیمار) به روش chelex استخراج گردید. سپس روی نمونه‌ها PCR انجام گرفت و بعد از آن، محصولات PCR تحت تأثیر هضم آنزیمی توسط آنزیم MnlI قرار گرفتند و آنگاه روی نمونه‌ها الکتروفورز انجام گرفت.
نتایج: در این مطالعه ۳۰۰ نفر مورد مطالعه قرار گرفتند که ۱۳۱ نفر مرد و ۱۶۹ نفر زن بودند و میانگین سنی آن‌ها ۴۲ سال (SD=±۸/۶۷) بود (از نوزاد ۴۰ روزه تا فرد ۶۷ ساله) که ۱۰ درصد سابقه DVT، ۷/۶ درصد سقط جنین، ۹/۳ درصد مصرف OCP، ۱۰/۳ درصد سابقه جراحی، ۳/۳ درصد سابقه فامیلی، ۳ درصد امبولی ریه، ۹/۹ درصد ترومبوز در جاهای غیرمعمول، ۳ درصد سایر موارد بودند. براساس الکتروفروز انجام گرفته مشخص شد که ۱۰ بیمار دارای جهش لیدن در فاکتور Vهستند و بدین‌ترتیب، فراوانی جهش در بیماران ترومبوفیلیک ۳/۳ درصد است.
بحث و نتیجه‌گیری: در مطالعات انجام گرفته، فراوانی جهش فاکتور V لیدن در بیماران ترومبوفیلیک ۶۰–۴۵ درصد گزارش شده، در حالی‌که شیوع این جهش در بیماران مورد مطالعه ما بسیار کم‌تر و حدود ۳/۳ درصد است. لذا این احتمال وجود دارد که در بیماران مورد مطالعه ما، جهش فاکتور V لیدن به‌عنوان فاکتور زمینه‌ای در ایجاد ترومبوز خیلی مهم نباشد و شاید در این بیماران، جهش‌های ژنی دیگری وجود داشته باشند که در ایجاد ترومبوز مهمند و باید در سایر مطالعات مورد بررسی قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: ترومبوآمبولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، فاکتور پنج لیدن، مقاومت به پروتئین C

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال سیزدهم – شماره ۶۳
تیر ۱۳۸۵

تاریخ وصول: ۸۳/۸/۲
تاریخ پذیرش: ۸۴/۶/۵

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بیماری ترومبوآمبولی وریدی علت اصلی مرگ و میر در غرب است و تقریباً از هر هزار نفر، یک نفر به این بیماری مبتلا است. ترومبوز وریدی، موقعی رخ می‌دهد که تعادل فیزیولوژیک که بین ایجاد لخته و خونریزی وجود دارد به سمت ایجاد لخته پیش رفته، بر مسیرهای ضد انعقادی و فیبرینولیز طبیعی بدن غالب می‌شود. علت این بیماری چندگانه است و واکنش بین علل ژنتیکی و عوامل محیطی در گسترش بیماری شرکت دارد. در حقیقت، این بیماری آمیخته‌ای از عوامل اکتسابی و ارثی چه در سطح فاکتورهای انعقادی و مهارکننده‌های آن‌ها و چه در سطح سلولی (مثل سلول‌های اندوتلیال) است[۱].

فاکتورهای خطر بالینی که مستعد ترومبوز وریدی هستند عبارتند از: ۱) آسیب دیدگی دیواره عروقی، ۲) فاکتور v لیدن و مقاومت به پروتئین c فعال شده، ۳) کمبود مهارکننده‌های پروتئازی در گردش، ۴) افزایش سطوح پروترومبین، ۵) آنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپیدی، ۶) افزایش هموسیستئین در خون، ۷) کاهش فعالیت سیستم فیبرینولینیک و ۸ – بدخیمی.

ترومبوز ممکن است در هر قسمت از سیستم قلبی عروقی، مانند وریدها، شریان‌ها، قلب و عروق ریز شکل بگیرد. عوارض ترومبوز یا به‌وسیله آثار موضعی انسداد عروق یا امبولیزاسیون مواد ترومبوتیک و یا با شیوع کم‌تر با مصرف عناصر هموستازی مشخص می‌شود. ترومبوزهای وریدی معمولاً در اندام‌های تحتانی رخ می‌دهند، اما با فراوانی زیاد در وریدهای اعضای فوقانی در ارتباط با استفاده مزمن از کاتتر وریدی نیز دیده شده است. ترومبوزهای ورید پا معمولاً بی‌حرکتند، اما اگر باعث انسداد جریان خون یا التهاب دیواره عروق بشوند یا در صورت آمبولی در گردش ریوی ایجاد اختلال کنند باعث علائم وخیم می‌شوند [۱و۲].

ویرشاو (Virchow) عنوان کرده که در تشکیل لخته، سه فاکتور مربوط به هم دخیلند: تغییر در دیواره عروق خونی، تغییر در جریان خون، تغییر در انعقادپذیری خون. فاکتور آخر در حالت‌های انعقادپذیری بالا دارای اهمیت است. گسترش ترومبوز می‌تواند یا از انعقادپذیری بالای اولیه و یا ثانویه، و یا از ترکیب هر دو ناشی شود[۳].

انتخاب بیماران

از بیمارانی که به‌دلیل عوارض ترومبوتیک مثل DVT، سقط جنین، آمبولی ریوی و انفارکتوس میوکارد و... به سازمان انتقال خون تهران مراجعه کرده بودند براساس مطالعات قبلی ۳۰۰ نفر (۱۳۱ نفر مرد ۱۶۹ نفر زن) برای مطالعه انتخاب شدند. از این تعداد ۵۴ نفر سابقه DVT، ۲۳ نفر سابقه سقط جنین، ۳۸ نفر سابقه جراحی، ۱۷ نفر سابقه فامیلی، ۱۲ نفر آمبولی ریوی و ۵۰ نفر ترومبوز در جاهای غیرمعمول مانند پا و اعضای تحتانی داشتند. محدوده سنی بیماران بین نوزاد ۴۰ روزه تا فرد ۶۷ ساله بود (میانگین سنی ۴۲ سال) (SD=۸/۶۷).

مواد و روش‌ها

ابتدا تست APCR (مقاومت به پروتئین c) به روش clotting با استفاده از کیت Staclot APCR تهیه شده از شرکت Diaghostic stago بر روی پلاسمای بیماران به روش زیر انجام گرفت:

محلول شماره ۱، پلاسمای انسانی که با روش ایمونولوژیکی از فاکتور V تهی شده و غنی از فسفولیپید است (freeze-dried).

محلول شماره ۲، حاوی سم Crotalus Viridis Helleri است (freeze-dried).

محلول شماره ۳، حاوی پروتئین C فعال شده انسانی در محیط حاوی کلسیم است (freeze-dried).

محلول شماره ۴، پلاسمای انسانی طبیعی سیتراته به‌عنوان کنترل منفی است (freeze-dried).

محلول شماره ۵، پلاسمای انسانی سیتراته به‌عنوان کنترل مثبت است (freeze-dried).

Archive of SID

www.SID.ir

تست APCR به روش Clotting بر این اساس استوار است که پروتئین C نرمال و فعال‌کننده آن‌را [(سم نوعی مار) Crotalus Viridis Helleri] به‌عنوان Reagent به پلاسمای بیمار اضافه می‌کنند. بعد از این‌که پلاسما دوباره کلسیفیه شد این سیستم باید تا زمان مشخص (۱۲۰ ثانیه) در برابر لخته شدن مقاومت کند، زیرا پروتئین C فعال شده فاکتورهای V و VIII را مهار و از انعقاد پلاسما جلوگیری می‌کند. زمان‌های کوتاه‌تر لخته شدن با توجه به نرمال بودن پروتئین C و فعال‌کننده آن و معرف‌ها، دلالت بر غیرطبیعی بودن فاکتور V بیمار دارد و می‌تواند فاکتور V لیدن باشد و نمونه‌هایی که غیرطبیعی هستند با روش مولکولی مانند PCR مورد بررسی قرار می‌گیرند.

سم مذکور به‌عنوان فعال‌کننده فاکتور X عمل می‌کند و بنابراین آبشار انعقادی از فاکتور X رو به پایین فعال می‌شود. پس تأثیر همه فاکتورهای انعقادی قبل از فاکتور X حذف می‌شود. طولانی شدن زمان انعقاد یک پلاسمای طبیعی در حضور پروتئین C فعال، در نتیجه ظرفیت پروتئین C فعال مشتق از محلول شماره ۳ برای غیرفعال کردن فاکتور Va پلاسمای مورد آزمایش است.

بیمارانی که APCR غیرطبیعی (۲۳ بیمار) داشتند از نمونه‌های خون آن‌ها DNA به روش chelex استخراج گردید که مراحل آن عبارتند از:

۱. محلول chelex را با ورتکس کاملاً مخلوط می‌کنیم چون خیلی سریع ته نشین می‌گردد.
۲. در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ۲۰۰ میکرولیتر از محلول chelex را می‌ریزیم.
۳. ۳-۲ میکرولیتر از خون کامل را به آن می‌افزاییم.
۴. میکروتیوب حاوی chelex و خون را کاملاً با ورتکس به مدت ۱۰-۵ ثانیه مخلوط می‌کنیم.
۵. میکروتیوب فوق را در ترموستات ۱۰۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه می‌کنیم.
۶. سپس آن را به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm میکروسانتریفوژ می‌کنیم.
۷. محلول فوقانی را که عاری از chelex است برمی‌داریم و در یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری استریل می‌ریزیم.
۸. محلول فوق حاوی DNA بوده، می‌توان آن را در ۲۰- درجه نگهداری کرد.

بعد از استخراج DNA روی نمونه‌ها PCR انجام گرفت و سپس محصولات PCR تحت تأثیر هضم آنزیمی توسط آنزیم MnlI قرار گرفتند و بعد از انجام RFLP نمونه‌ها الکتروفورز شدند. از آغازگرهای پرایمرهای زیر برای تکثیر DNA استفاده شد:

Forward primer:5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3'
Reverse primer:5'-CTTGAAGGAAAATGCCCCCATTA-3'

آغازگرهای فوق در بخش کیت‌سازی سازمان انتقال خون ایران توسط آقای دکتر شهرام سمیعی تهیه شد و با غلظت نهایی ۰/۲μ M استفاده گردیدند.

نتایج

پرسشنامه‌ها از ۳۰۰ بیمار، مطابق شرح حال و علائم بالینی آن‌ها پر شدند و سپس مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. محدوده سنی بیماران بین نوزاد ۴۰ روزه تا فرد ۶۷ ساله بود (میانگین سنی ۴۲ سال). نتایج حاصل به شرح جداول زیر است.

لازم به توضیح است که تمام بیماران از نظر وجود هر نوع بدخیمی سرطانی، اختلالات میلوپرولیفراتیو و بیماری‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفتند، اما هیچ‌کدام علائمی از این بیماری‌ها نداشتند. اما به نظر می‌رسد ارتباطی بین کمبود پروتئین‌های C و S وجود داشته باشد؛ زیرا بیش‌تر بیمارانی که کمبود پروتئین C داشتند کمبود پروتئین S نیز داشتند، ولی چنین ارتباطی بین کمبود پروتئین‌های C و S و کمبود آنتی‌ترومبین مشاهده نشد.

متوسط سنی ۱۰ بیمار مبتلا به جهش فاکتور V لیدن ۳۴ سال بود، ۶ بیمار مبتلا به DVT بودند، ۲ بیمار آمبولی ریه داشتند، ۲ بیمار قرص ضد بارداری مصرف می‌کردند، ۱ بیمار سابقه فامیلی داشت، ۲ بیمار سابقه سقط جنین و ۳ بیمار سابقه جراحی داشتند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ برنامه تکثیر DNA فاکتور V در دستگاه ترمال‌سایکلر

تعداد سیکل	زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	مرحله
۱	۱۲۰	۹۴	Initial denaturation
۴۰	۲۰	۹۴	Denaturation
۴۰	۳۰	۵۵	Annealing
۴۰	۱۵	۷۲	Extention
۱	۳۰۰	۷۲	Final extention

جدول ۲ نتایج حاصل از بررسی سن در بیماران به تفکیک جنس

جنس / سن	۰-۱۰ سال	۱۰-۲۰ سال	۲۰-۳۰ سال	۳۰-۴۰ سال	۴۰-۷۰ سال
مرد	۱۲	۲۳	۲۸	۳۷	۳۱
زن	۱۳	۲۷	۳۵	۴۹	۴۵
کل	۲۵	۵۰	۶۳	۸۶	۷۶

p=0. 216

جدول ۳ نتایج حاصل از بررسی ترومبوز و عوامل خطرساز آن در کل بیماران به تفکیک جنس

جنس / سابقه	مرد		زن	
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
DVT	۲۴	٪ ۸	۳۰	٪ ۱۰
سقط جنین	–	–	۲۳	٪ ۷/۶
مصرف OCP	–	–	۲۸	٪ ۹/۳
سابقه‌جراحی	۷	٪ ۲/۳	۳۱	٪ ۱۰/۳
سابقه فامیلی	۷	٪ ۲/۳	۱۰	٪ ۳/۳
آمبولی ریوی	۳	٪ ۱	۹	٪ ۳
ترومبوز در جاهای غیرمعمول	۲۱	٪ ۷	۲۹	٪ ۹/۹
سایر بیماران	۶۹	٪ ۲۳	۹	٪ ۳
کل	۱۳۱	٪ ۴۳/۶	۱۶۹	٪ ۵۶/۳

p=0.547

جدول ٤ نتایج حاصل از بررسی پروتئین C در بیماران به تفکیک جنس

جنس / پروتئین C	مرد		زن	
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
کمبود دارد	۷	٪ ۲/۳	۹	٪ ۳
کمبود ندارد	۱۲۴	٪ ۴۱/۳	۱۶۰	٪ ۵۳/۳
کل	۱۳۱	٪ ۴۳/۶	۱۶۹	٪ ۵۶/۳

p=0.12

جدول ۵ نتایج حاصل از بررسی پروتئین S در بیماران به تفکیک جنس

جنس / پروتئین S	مرد		زن	
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
کمبود دارد	۸	٪ ۲/۶	۱۰	٪ ۳/۳
کمبود ندارد	۱۲۳	٪ ۴۱	۱۵۹	٪ ۵۳
کل	۱۳۱	٪ ۴۳/۶	۱۶۹	٪ ۵۶/۳

p=0.21

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶ نتایج حاصل از بررسی آنتی‌ترومبین III در بیماران به تفکیک جنس

جنس / آنتی‌ترومبین	مرد		زن	
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
کمبود دارد	۳	٪ ۱	۴	٪ ۱/۳
کمبود ندارد	۱۲۸	٪ ۴۲/۶	۱۶۵	٪ ۵۵
کل	۱۳۱	٪ ۴۳/۶	۱۶۹	٪ ۵۶/۳

p=0.06

جدول ۷ نتایج حاصل از بررسی مقاومت به پروتئین C در بیماران به تفکیک جنس

جنس / APC-R	مرد		زن	
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
مقاومت دارد	۱۰	٪ ۳/۳	۱۳	٪ ۴/۳
مقاومت‌ندارد	۱۲۱	٪ ۴۰/۳	۱۵۶	٪ ۵۲
کل	۱۳۱	٪ ۴۳/۶	۱۶۹	٪ ۵۶/۳

p=0.41

جدول ۸ مقایسه نتایج آزمایش APC-R با بررسی ژنوتیپیک بیماران در ۲۳ بیمار

APC-R (sec) / موتاسیون	۱۰۰–۱۲۰ (sec)	۸۰–۱۰۰ (sec)	۶۰–۸۰ (sec)	<۶۰ (sec)
هموزیگوت	۰	۰	۰	NA
هتروزیگوت	۰	۵	۵	NA
طبیعی	۱۱	۲	۰	NA

p=0.267, NA: Not Available

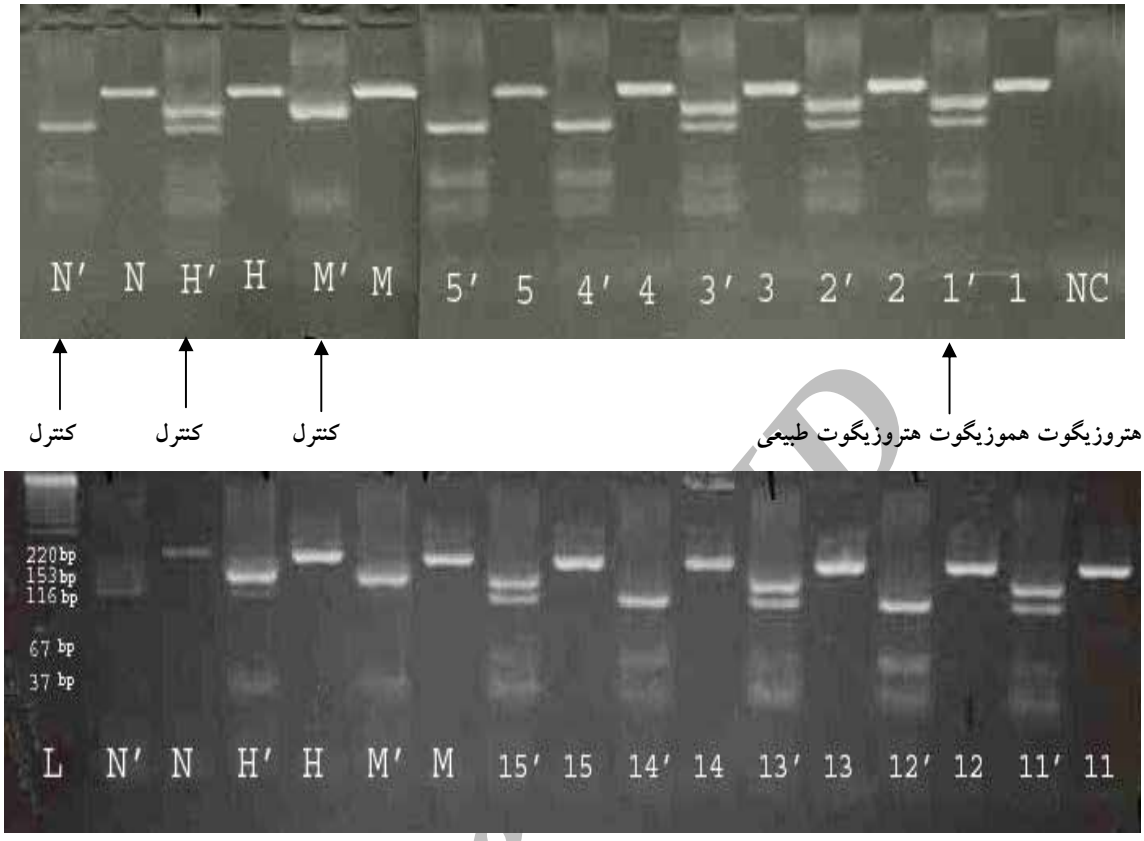
جدول ۹ مقایسه مقاومت به APC با سایر عوامل خطرساز ترومبوز به تفکیک جنس

جنس / عوامل‌خطرساز	مرد		زن	
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
کمبود پروتئین C	۳	٪ ۱۳	۱	٪ ۴/۳
کمبود پروتئین S	۳	٪ ۱۳	۰	٪ ۰
کمبودآنتی‌ترومبین	۰	٪ ۰	۱	٪ ۴/۳
سابقه DVT	۶	٪ ۲۶	۶	٪ ۲۶
آمبولی ریوی	۱	٪ ۴/۳	۱	٪ ۴/۳
نسبت فامیلی	۱	٪ ۴/۳	۱	٪ ۴/۳
مصرف OCP	۰	٪ ۰	۶	٪ ۲۶
سقط جنین مکرر	۰	٪ ۰	۳	٪ ۱۳

p=0.136

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱ تصاویر الکتروفورز حاصل از RFLP محصولات PCR نمونه‌های با APC-R غیرطبیعی

از ۳۰۰ بیمار مورد مطالعه ۲۳ نفر مقاومت بـه APC داشتند (۱۰ مرد و ۱۳ زن) که از این تعـداد ۴ نفـر (۳ مرد و ۱ زن) دارای کمبود پـروتئین C بودنـد و ۳ نفـر (مرد) کمبود پـروتئین S داشـتند و ۱ نفـر (زن) دچـار کمبود آنتی‌ترومبین بود. سابقه جراحی در ۶ نفر (۲ مرد و ۴ زن) وجود داشت؛ ۶ نفـر (زن) قـرص‌هـای ضـد بارداری مصرف می‌کردنـد؛ ۱۲ نفـر (۶ مـرد و ۶ زن) دارای سابقه DVT بودند؛ ۲ نفر (۱ مرد و ۱ زن) آمبولی ریه داشتند؛ و ۳ زن سقط‌های جنینی مکرر داشتند.

افرادی که APC-R آن‌هـا بـیش از ۱۲۰ ثانیـه بـود طبیعی در نظر گرفته شدند و افرادی کـه APC-R آن‌هـا کم‌تر از ۱۲۰ ثانیه بود غیرطبیعی بـه شـمار آمدنـد. از مجموع ۳۰۰ نفر ۲۳ نفر APC-R غیرطبیعی داشتند که از نمونه خون تمام آن‌ها DNA استخراج و آزمـایش PCR برای قطعه‌ای از ژن فاکتور V انجام شد. آزمـایش PCR برای تمام نمونه‌ها موفقیت‌آمیز بود.

قطعه ژنی که تکثیر می‌شود bp ۲۲۰ است اگر آنزیم MnlI بر روی فاکتور V سالم (Wilde type) اثر داده شود در دو نقطه این قطعه را می‌شکند و قطعاتی به ترتیب به طول‌های bp ۳۷، bp ۶۷ و bp ۱۱۶ را به وجود می‌آورد؛ اما اگر بر روی فاکتور V لیـدن (mutant type) اثـر داده شود فقط از یک نقطه این قطعه را می‌شکند و دو قطعه به ترتیـب بـه طـول‌هـای bp ۶۷ و bp ۱۵۳ بـه وجـود می‌آورد [۳]. اگر نمونه‌ای دارای سه باند bp ۳۷، bp ۶۷ و bp ۱۱۶ باشد آن فرد «هموزیگوت سالم» است و اگر دارای چهـار بانـد bp ۳۷، bp ۶۷، bp ۱۱۶ و bp ۱۵۳ باشد فرد برای فاکتور V لیدن «هتروزیگوت» است، امـا اگر دارای دو بانـد bp ۶۷ و bp ۱۵۳ باشـد فـرد بـرای فاکتور V لیدن «هموزیگـوت» محسـوب مـی‌شـود. در بررسی انجـام شـده ۱۰ نمونـه حـاوی آلـل موتانـت هتروزیگوت بودند که تصاویر مربـوط بـه الکتروفـورز

Archive of SID
www.SID.ir

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۴ درصد در زیر ارائه شده است:

NC: کنترل منفی، L: سایز مارکر، N: نمونه نرمال هضم نشده به‌وسیله آنزیم، 'N: نمونه نرمال هضم شده به‌وسیله آنزیم، H: نمونه هتروزیگوت هضم نشده به‌وسیله آنزیم، 'H: نمونه هتروزیگوت هضم شده به‌وسیله آنزیم، M: نمونه هموزیگوت هضم نشده به‌وسیله آنزیم، 'M: نمونه هموزیگوت هضم شده به‌وسیله آنزیم. شماره‌هایی که بدون علامت هستند هضم نشده و شماره‌هایی که دارای علامت پریم می‌باشند هضم شده به‌وسیله آنزیم هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

جهش فاکتور V لیدن، شایع‌ترین فاکتور خطر ارثی برای ترومبوز وریدی است. این جهش، پراکندگی جغرافیایی نامنظمی را نشان می‌دهد، به‌طوری که آفریقایی‌ها، آمریکایی‌ها، آسیایی‌ها، و استرالیایی‌های بومی فاقد این جهش هستند، اما تقریباً در ۵ درصد سفید پوست‌های آمریکا، کانادایی‌ها و نژاد اروپای شمالی و تا ۱۵ درصد در بعضی نواحی سوئد و قبرس رخ می‌دهد. برای آسیا یک فراوانی ۲/۵ درصدی جهش فاکتور V لیدن در عرب‌های سعودی و برای نواحی شمالی هند یک فراوانی ۱/۹ درصدی یافت شده است. در ایران نیز فراوانی این جهش در بین بیماران ترومبوفیلیک حدود ۳/۳ درصد است، اما در جمعیت عمومی هنوز فراوانی این جهش مشخص نشده است [۴،۵و۶].

در افراد مبتلا به عوارض ترومبوتیک، شیوع فاکتور V لیدن بین ۶۵ – ۴۰ درصد گزارش شده است. البته شیوع فاکتور V لیدن در جمعیت‌ها و نژادهای مختلف متفاوت است. مثلاً بالاترین درصد در سفید پوستان ملاحظه می‌شود که حدود ۱۴-۲ درصد است. در افراد هتروزیگوت عوارض ترومبوتیک ۷ برابر و در هموزیگوت‌ها ۸۰ برابر بیش‌تر است؛ اما تحقیقات نشان می‌دهند که به‌طور متوسط، شیوع فاکتور V لیدن در ۱۱-۱ درصد کل جمعیت‌ها وجود دارد[۷و۸].

در مطالعه‌ای که بر روی ۳۰۰ بیمار انجام شد دریافتیم که فراوانی جهش فاکتور V لیدن در بین بیماران ترومبوفیلیک در ایران خوشبختانه نسبت به آنچه مقالات مختلف ارائه می‌دهند (۶۵- ۴۰ درصد) بسیار اندک بوده، تقریباً حدود ۳/۳ درصد است و تمامی آن‌ها هتروزیگوت هستند و هموزیگوت اصلاً وجود ندارد. اما مقالات مختلف، افراد هموزیگوت را ۲-۱ درصد گزارش کرده‌اند. لذا این احتمال وجود دارد که در بیماران مورد مطالعه ما، جهش فاکتور V لیدن به‌عنوان فاکتور زمینه‌ای در ایجاد ترومبوز خیلی مهم نباشد و شاید در این بیماران، جهش‌های ژنی دیگری وجود داشته باشند که در ایجاد ترومبوز مهمند و باید در سایر مطالعات مورد بررسی قرار گیرند.

همان‌طوری که انتظار می‌رفت (با توجه به P Value جدول ۱-۱۳) جهش فاکتور V لیدن با سقط جنین‌های مکرر، جراحی، مصرف قرص‌های ضد بارداری و DVT رابطه مستقیم و معنادار داشت – همچنان که مقالات مختلف نشان می‌دهند – و در اکثر بیماران، این چهار عارضه وجود به چشم می‌خورد. همچنین دریافتیم که یکی از علل ترومبوزهای وریدی مکرر، جهش فاکتور V لیدن است. در صورتی که سایر جهش‌های ایجادکننده ترومبوز مانند پروترومبین G20210A و آنزیم متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز C677T و... با جهش فاکتور V لیدن همراه باشند زندگی فرد را تهدید خواهند کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی سازمان انتقال خون ایران به‌دلیل تأمین هزینه و تصویب آن اعلام داشته، از همکاری آقای دکتر حبیب نصیری – به‌خاطر ارائه راهنمایی‌های لازم، از خانم دکتر کسرائیان برای تهیه مقاله و از سرکار خانم عطائی بابت انجام آزمایش‌ها تشکر و قدردانی می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Shirlyn B. M. *Clinical Laboratory Hematology*. Pearson Prentice Hall. 2004.
2. Perry D. J, Pasi K. J. Resistance to activated Protein C and factor V Leiden. *Q J Med.* 1997; 90:379–385.
3. Jody L. K, Scott H. G. Factor V Leiden Thrombophilia. *Q J Med.* 2003; 108:379–385.
4. Paolo S, Bernd J, Paolo P, Daniela T , Philip W, Brono G , et al. Effect of MnlI on Factor V. *Britich Journal of Hematology*. 2002 ;33: 198 - 202
5. Amy J, Robert P, Marijane A, Joseph R, Wayne A, James M. The Factor V Leiden Mutation and the Risk of Venous Thromboembolism in Gynecologic Oncology Patients. *OBSTETRICS & GYNECOLOGY*. 2002;100 (6): 1285- 1289.
6. Gerard L, raldine M. Population Genetics of Factor V Leiden in Europe. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2001; 27(2): 362–367
7. Salah M, Martinez I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(22): 4692-4693.
8. Evren A, Hakan G, Tülin K. A case of Budd-Chiari syndrome secondary to multiple thrombogenic conditions: A case report and review of literature. *Turk J Gastroenterol*. 2004; 15 (2): 100-103.

Archive of SID

www.SID.ir