اساس مولکولی کمبود ارثی فاکتور A–۱۳ انعقادی در بیماران اهل سیستان و بلوچستان

غلامحسین تمدن*، دکتر احمد کاظمی**، دکتر قاسم رستگار لاری***، دکتر فریدون علا****، شبنم حجازی****

* مربی گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، دانشکده پیراپزشکی
** دانشیار گروه هماتولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، دانشکده پیراپزشکی
*** استادیار گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، دانشکده پیراپزشکی
**** درمانگاه جامع کودکان هموفیل ایران

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۱۲/۱۲
تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۷/۸

چکیده

زمینه و هدف: فاکتور ۱۳ انعقادی پیش آنزیمی است که در سیستم انعقادی لخته فیبرین را مستحکم می‌کند. در فقدان این آنزیم لخته فیبرینی تشکیل شده در اسیداستیک یا اوره ۵ مولار از هم گسسته می شود. این فاکتور شامل دو زنجیره B با نقش ناقلی و دو زنجیره کاتالیتیکی A می‌باشد که ژن زیر واحد A روی کروموزوم شش قرارگرفته است. کمبود فاکتور ۱۳ جزء بیماری‌های کمیاب بوده و در حدود یک در دو میلیون نفر جمعیت رخ می دهد. این تحقیق با هدف شناسایی جهش در ژن زیر واحد A و روش غربالگری مناسب ناقلین انجام گرفت.

مواد و روش کار: این مطالعه پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه انجمن هموفیلی ایران و رسم شجره نامه ۱۰ بیمار مبتلا به کمبود فاکتور A-۱۳ و خانواده در دسترس آنها بدون در نظر گرفتن سن و جنس در سال ۱۳۸۵ در بیمارستان علی اصغر زاهدان انجام شد. ابتدا نمونه خون تهیه و DNA با روش هضم لکوسیت‌ها به کمک آب مقطر، پروتئیناز K و اتانل استخراج و اگزون‌های ژن زنجیره A با پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردید. سپس هر محصولی که دارای هترودوبلکس باروشCSGE بود برای تعیین توالی مستقیم انتخاب و تعیین سکانس شد. هر جهش با استفاده از نرم افزار ژن رانر برای یافتن آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه تمام ده بیمار دارای موتاسیون مشترک جایگزینی C به جای T و در نتیجه تغییر رمز تریپتوفان به آرژنین در اگزون ۴ به صورت هموزیگوت بودند.

نتیجه گیری: جهش یافت شده در این مطالعه در بخش مرکزی یا کاتالیتیک آنزیم قرار داشت و به نظر می‌رسد با تغییر در بار الکتریکی و تمایل آنزیم به سوبسترا موجب کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. **(مجله طبیب شرق، دوره ۱۱، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۸، ص ۱۹ تا ۲٤)**

کلیدواژه ها: فاکتور ۱۳، کمبود فاکتور A-۱۳، سیستم انعقادی، زاهدان

مقدمه

فاکتور ۱۳ انعقادی یک پرو آنزیم می باشد که در حالت فعال خاصیت ترانس گلوتامینازی دارد.[۱] این فاکتور در آخرین قسمت از آبشار انعقادی عمل می‌کند و لخته فیبرین فاقد پیوندهای کووالانسی به وسیله عمل این آنزیم به لختهٔ فیبرین پایدار تبدیل می‌شود. با این عمل فیبرین در مقابل پلاسمین مقاوم می‌گردد.[۲] فاکتور ۱۳ انعقادی از دو زیر واحد A وB به صورت تتراد ($A_2 B_2$) به وجود آمده است. این دو زیر واحد توسط ژن‌های جدا از یکدیگر کد می‌شوند. ژن زیر واحد A بر روی کروموزوم شماره ۶ و دارای ۱۵ اگزون و ژن زیر واحد B بر روی کروموزوم شماره ۱ و دارای ۱۲ اگزون می‌باشد.[۳] کمبود ارثی فاکتور ۱۳ انعقادی اختلالی است نادر که اولین بار در سال ۱۹۶۰ توسط دوکرت گزارش شده است. [۱] بیمار مبتلا

آدرس نویسنده مسئول: زاهدان، دانشکده پیراپزشکی
email: gtamadon@yahoo.com

www.SID.ir

دچار علائمی از قبیل خونریزی از بند ناف، خونریزی خود به خودی درون جمجمه‌ای، سقط مکرر در خانم‌های باردار و تاخیر در بهبودی زخم‌ها می‌شود.[۴] این اختلال تقریباً به میزان ۱/۲۰۰۰۰۰۰ جمعیت رخ می‌دهد. از آنجا که زیر واحد A نقش کاتالیتیک و B نقش حامل دارد انتظار می‌رود که بروز بیماری به علت جهش در ژن زیر واحد A بیشتر از ژن زیر واحد B باشد. در بررسی‌های انجام شده از نظر ژنتیکی جهش‌های مختلفی عمدتاً به صورت جایگزینی باز گزارش گردیده است.[۴] مطالعات کریستالوگرافی ساختمان زنجیره A، وجود چهار دومن را در ساختمان آن (شامل دومن‌های بارل ۱و۲، مرکز کاتالیتیکی وساندویچ بتا) نشان داده است.[۵] این دومن‌ها به وسیله پیوندهای هیدروژنی و نمکی با دومن‌های مشابه در زنجیره A مقابل باند می‌شوند.[۶] هم‌چنین مشخص شده اسیدهای آمینه سیستئین۳۱۴ (در اگزون ۷)، هیستیدین ۳۷۳ وآسپارژین ۳۹۶(هر دو در اگزون ۹) به عنوان تریاد کاتالیتیک در تشکیل باند ایزوپپتیدی شرکت می‌کنند.[۶]

فاکتور ۱۳ انعقادی برای فعال شدن نیاز به تأثیر ترومبین دارد. ترومبین با برش پیوند بین آرژنین ۳۷ و گلیسین ۳۸ در حضور پلیمر فیبرین، آنزیم را فعال نموده و موجب جدا شدن زنجیره A از B می‌گردد، به همین دلیل است که اگزون ۱ در پروتئین کامل وجود ندارد.[۶] با عملکرد آنزیم باند پپتیدی بین گلوتامین از زنجیره گامای یک فیبرین و لیزین زنجیره گامای فیبرین دیگر ایجاد می شود.[۷] در این واکنش وابسته به یون کلسیم یک مولکول آمونیاک آزاد می‌شود.[۸] اتصالات عرضی ایجاد شده در فیبرین موجب استحکام آن می‌شود که این پیوندها می‌تواند بین زنجیرهٔ آلفای فیبرین نیز باشد هر چند که آهسته‌تر از زنجیرهٔ گاما رخ می‌دهد.[۸] ژن فاکتور A-۱۳ بر روی بازوی کوتاه کروموزم ۶ ($6P_{24}$ -P_{25})، ۱۵ اگزون و بیش از ۱۶۰ کیلو باز طول داشته و پروتئین کد شده ۷۳۱ اسید آمینه دارد.[۹]

پلی‌مرفیسم‌های متعددی در ژن این زنجیره شناخته شده که مهم‌ترین آن‌ها Val 34 Leu در ارتباط با اختلالات ترمبوتیک می‌باشد.[۱۰] این فاکتور طولانی‌ترین نیمه عمر را در بین فاکتورهای انعقادی فعالیت انعقادی طبیعی بین ۳/۳۳- ۲/۵۳ درصد دارد. چنانچه فعالیت فاکتور به کمتر از ۱درصد برسد علائم بالینی بروز می‌کنند.[۱۱] بیماران با کمبود این فاکتور تست های انعقادی طبیعی (TT و PTT و PT) دارند اما آزمایش حل شدن لخته در اوره ۵ مولار و یا اسید استیک ۱ درصد در آنها غیر طبیعی است.[۱۲] هرچند دقیق‌ترین روش تعیین جهش تعیین توالی اسید نوکلئیک می‌باشد اما روش Conformational Sensitive Gel Electrophoresis (CFGE) روشی حساس، دقیق و ارزان برای تعیین جهش به خصوص جایگزینی باز می‌باشد. این مطالعه با هدف شناسایی جهش‌های اگزون ۲ تا ۱۵ ژن فاکتور A-۱۳ در مبتلایان به کمبود این فاکتور انجام شد.

روش کار

این مطالعه در سال ۱۳۸۵ برروی بیماران با سابقه خونریزی بندناف در هنگام تولد و میل به خونریزی که آزمون‌های انعقادی (PT، PTT و BT) طبیعی و آزمون حل شدن لختهٔ غیرطبیعی داشته و در بیمارستان علی اصغر زاهدان با تشخیص کمبود فاکتور A-۱۳ تشکیل پرونده داده بودند انجام شد. ابتدا رضایت‌نامه انجمن هموفیلی ایران تکمیل و شجره نامه مربوط به هر خانواده در پرونده بیماران رسم شد (خانواده‌ها نسبت فامیلی با همدیگر نداشتند). سپس به روش نمونه گیری در دسترس، نمونه خون از ۱۰ بیمار و ۱۳ نفر از خانواده بیماران که در مجموع بیست و سه نفر بودند در ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد. DNA با روش هضم لکوسیت‌ها به کمک آب مقطر سرد، پروتئینازK، دترجنت‌های یونی و اتانل استخراج شد. جهت ارزیابی کمیت و کیفیت DNA از روش اسپکتروفوتومتری استفاده شد. توالی ژن فاکتور ۱۳ از بانک ژن استخراج و آغازگرهای هر اگزون از بایگانی ژن فاکتور ۱۳ انتخاب و سپس هر اگزون طبق برنامهٔ PCR (حرارت ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، ۶۰°C به مدت ۱دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱دقیقه و ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه در ۳۰ سیکل) تکثیر داده شد.

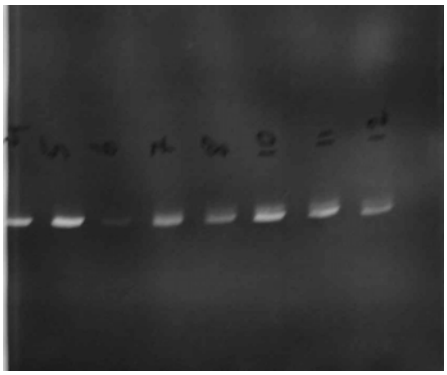
Archive of SID

www.SID.ir

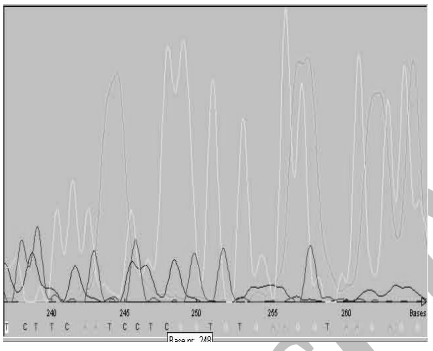
پس از تکثیر، محصولات PCR بر روی ژل پلی‌اکریلامید ۸ درصد با ولتاژ ۱۵۰ و زمان مناسب بر حسب اندازهٔ قطعه الکتروفورز و بعد از رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید به وسیله تابش ماورا بنفش مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از PCR هر اگزون بر اساس روش CSGE، محصولات PCR در دمای ۹۸°C به مدت ۵ دقیقه جهت دناتوره کردن و در ۶۵°C به مدت ۳۰ دقیقه برای آنیلینگ قرار داده شدند. اگزون‌هایی که با این روش، تشکیل DNA هترودوبلکس دادند با احتمال وجود موتاسیون با استفاده از دستگاه آلف اکسپرس تعیین توالی شده و جهش این بیماران شناسائی شد. پس از مشخص شدن جهش همولوژی توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار ژن رانر با توالی طبیعی مطابقت داده و موتاسیون ایجاد شده شناسایی شد.همچنین آنزیم اختصاصی برای جهش یافت شده جهت تایید و سهولت استفاده به روش RFLP پیدا شد.داده‌ها با جهش‌های موجود در پایگاه بین المللی مقایسه و ثبت بانک ژن شد.

یافته ها

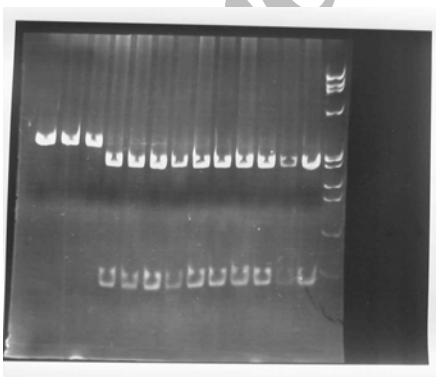
در این تحقیق از بین ۴۴ بیمار ثبت نام شده در بیمارستان علی اصغر زاهدان با سابقه علائم خونریزی دهنده که آزمایشات انعقادی طبیعی(PT,PTT,BT) و آزمون حل شدن لخته در اسیداستیک غیر طبیعی داشتند ۱۰ بیمار به روش نمونه گیری در دسترس بدون در نظر گرفتن سن و جنس انتخاب شدند. میانگین سنی بیماران ۱۱ سال بود. ۸ نفر از آن‌ها مونث و ۴ نفر مذکر بودند. بعد از انجام PCR هر اگزون و بررسی به روش CSGE (شکل ۱) و تعیین توالی به تفکیک، مشخص شد که تمامی ده بیمار دارای جهش مشترک در اگزون۴ به شکل تغییر توالی TGG کد کنندهٔ تریپتوفان به CGG کد کننده آرژنین بودند. (شکل ۲) هر ۹ والد و دو نفر از خواهران و برادران بیماران دارای همین جهش به صورت هتروزیگوت و دو نفر نیز بدون موتاسیون بودند. پس از مقایسهٔ توالی طبیعی با نوع جهش یافته مشخص شد که آنزیم Styl-1 وI ECOT14 که قادر است قطعهٔ تکثیر یافته ۳۵۵ بازی را در افراد سالم در نقطه ۳۰۰ برش داده و آن را به دو قسمت تبدیل کند، هیچ جایگاه برشی در DNA بیماران ندارد.(شکل ۳) افراد ناقل خانواده چون هتروزیگوت بودند دارای سه قطعه DNA ۳۵۵، ۳۰۰ و ۵۵ بازی بودند.



شکل ۱ – هترودوبلکس در چاهک های شماره ۱تا ۳ از سمت راست در ژل CSGE اگزون ۴ ژن فاکتورA -۱۳



شکل۲- جایگزینیC به جایT در سکانس اگزون۴ ژن فاکتورA-۱۳



شکل۳- چاهک های ۱،۲،۳ از سمت چپ مربوط به DNAبیماران که تحت اثر آنزیم Styl-1 قرارگرفته و هیچگونه برشی در آنها ایجاد نشده. چاهک های ۳ به بعد مربوط به DNA نرمال بوده که تحت اثر آنزیم برش خورده و دو باند ایجاد گردیده است.چاهک اول از سمت چپ مارکر می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در این مطالعه هر ۱۰ بیمار دارای موتاسیون مشترک جایگزینی C به جای T و در نتیجه تغییر رمز تریپتوفان به جای آرژنین در اگزون ۴ به صورت هموزیگوت بودند. از آنجا که اگزون ۴ زیر واحد A ژن فاکتور ۱۳، کد کنندهٔ بخش ساندویچ بتا و بخش ابتدائی دومن کاتالیتیک است و در اتصالات هیدروژنی و پل‌های نمکی زنجیره A نقش دارد، تغییر در توالی اسیدهای آمینه این ناحیه موجب از هم گسستن دو زنجیره A از یکدیگرمی شود.

طبق گزارشات، وجود ترياد کاتالیتیک در این دومن در اتصالات به یون کلسیم و سوبسترا بسیار وابسته به میزان بار الکتریکی و دنبالهٔ اسیدهای آمینه می‌باشد و هرگونه تغییر در توالی اسیدهای آمینه در عملکرد آنزیم تاثیر گذاشته و فعالیت آن را به شدت کاهش می‌دهد.[۱۳] احتمال داده می‌شود در توالی طبیعی وجود اسید آمینه تریپتوفان در موقعیت ۱۸۷(اسید آمینه‌ای حلقوی و غیر قطبی) در اتصالات آنزیم به سوبسترا و یون کلسیم و هم‌چنین پیوستگی دو زنجیره A مطلوب‌ترین وضعیت را ایجاد می‌کند در حالی که در بیمارانی که نقص هموزیگوت دارند جایگزینی آرژنین که یک اسید آمینه بازی و با دنباله خطی است میزان فعالیت آنزیم به شدت کاهش می‌یابد به گونه‌ای که علائم بالینی در بیماران ایجاد می شود.[۱۴]

ژن فاکتور A-۱۳ بر روی کروموزوم های اتوزوم قرار گرفته و از آنجا که ازدواج های قومی و طایفه‌ای باعث می‌شود نقص هتروزیگوت والدین در فرزندان به صورت هموزیگوت بروز کند، مشاوره ژنتیکی قبل از ازدواج و قبل از تولد می‌تواند از بروز موارد جدید بیماری پیشگیری کند.این بیماران نیاز به تأمین فاکتور از طریق پلاسمای اهدایی دارند.آگاهی خانواده‌های مبتلایان از بیماری و علائم آن و پیگیری درمان با استفاده از پلاسمای تهیه شده از اهدا کنندگان و تزریق آن به طور ماهیانه از بروز عوارض بیماری جلوگیری می کند. هر چند امروزه فاکتور ۱۳ تغلیظ شده پاستوریزه تحت عنوان فیبروگامین عرضه شده است اما به دلیل نداشتن آمار صحیح از میزان مبتلایان در کشور هنوز در دسترس مبتلایان قرار نگرفته است.

با توجه به تعددمبتلایان و امکان ناقل بودن افرادکثیری در این منطقه لازم است در مشاوره قبل از ازدواج به آن توجه شود و خانواده‌هایی که دارای فرزند مبتلا می‌باشند به شیوه ساده RFLP غربالگری شوند تا افراد ناقل شناسایی شوند. با توجه به تعداد واقعی افراد مبتلا که احتمال داده می‌شود در این استان بیش از میزان بروز گزارش شده (۱/۲۰۰۰۰۰۰) باشد لزوم تهیه فاکتور تغلیظ شده اجتناب ناپذیر می‌باشد. از آنجا که در این مطالعه هم از خانواده‌های بیمار اهل تشیع و هم اهل تسنن نمونه‌گیری انجام شد که هیچ سابقه‌ای از ازدواج بین آنها نبود و مشخص گردید که جهش در بین هر دو مشترک است به نظر می‌رسد جدایی قومی و مذهبی تاثیری برنوع جهش نداشته باشد اما مطالعات بیشتری از نظر فیلوژنی لازم است تا اشتراکات بیشتر قوم های مختلف این منطقه مشخص گردد.

سپاسگزاری

از تمامی خانواده هایی که در این تحقیق مشارکت نموده و همچنین عزیزان شاغل در درمانگاه جامع کودکان هموفیل ایران به ویژه مدیریت و همکاران آزمایشگاه ژنتیک که بی حمایت آنها این بررسی ممکن نبود نهایت سپاسگزاری و تشکر را داریم.

References

1. Anwar R, Miloszewski KJ. Factor XIII deficiency. Br J Haematol 1999; 107 (3): 468-84.
2. Ichinose A, Asahina T, Kobayashi T.Congenital blood coagulation factor XIII deficiency and perinatal management. Drug Targ 2005; 6:541-549.

Archive of SID

www.SID.ir

3. Muszbek L, Yee VC, Heressy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. Thromb Res 1999; 94:271-305.
4. Anwar R, Minford A, Gallivans L, et al. Delayed umbilical bleeding a presenting feature for factor deficiency. Pediat 2002;(2):32.
5. Lorand L, Ong HH, Lipinski B, et al. Lysine as amine donor in fibrin crosslinking. Biochem Biophys Res Commum 1966; 25:629-637.
6. Robert A, Thung-Shenq L, Weisel J, et al. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effect of genetic polymorphism. Blood J 2002; 100 (3): 743-754.
7. Weiss MS, Metzner HJ, Hilgenfeld R. Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII Function. FEBS Lett 1998; 423:291-296.
8. Chung SL, Lewis MS, Folk JE. Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminases (actived blood coagulation factor XIII) to their subunit structures. Biol Chem J 1974; 24:940-950.
9. Board PG, Webb GC, Mckee J, et al. Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24-p25. Cytogen Cell Genet 1988; 48:25-27.
10. Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for the subunit of human factor XIII (plasma translutaminase), a blood coagulation factor. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:5829-5833.
11. Nugent DJ. Prophylaxis in rare coagulation disorders: factor XIII deficiency. Thromb Res 2006;118(1):523-8.
12. Kitchen S, McCraw A. Laboratory manual-Diagnostic of hemophilia and other bleeding disorders.1st ed. Churchill livingstone;2005:68-73.
13. Anwar R, Iqbal M, Ayyub M. Identification of normal human peripheral blood monocyte and liver as sites of synthesis of coagulation factor XIII a chain. Hemophili 2009;11:539-547.
14. Korsgren C, Cohen CM. Organization of the gene for the subunit of factor XIII. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:4840-4844.

Archive of SID

www.SID.ir

Molecular Basis of Inherited Factor XIII- A Deficiency among Patients from Sistan - Baluchestan

Tamaddon Gholam Hossein, MSc*; Kazemi Ahmad, PhD; Rastgarlari Ghasem, PhD*** **Ala Fereidoon, PhD****; Hejazi Shabnam ******

Received: 3/Mar/2009
Accepted: 30/Sep/2009

Background*: Factor XIII, the last zymogene in the clotting cascade, converts the loose fibrin polymer into a firm polymer. In the absence of factor XIII the abnormal fibrin is soluble in acetic acid, as well as 5M urea. Factor XIII is composed of 2 catalytic A subunit bounds and 2 B subunits as carriers (A2B2). The gene of A chain is located on chromosome 6. Factor XIII deficiency is rare; with a prevalence of only 1 in 2 million in the general population. The overwhelming majority of cases are due to mutations in subunit A. The aim of this study was to detect the mutations of subunit A.*

Materials & Methods: *In this study we investigated the molecular basis of inherited factor XIII deficiency among 10 unrelated patients from Sistan and Balouchestan province in 2006. Mutations were detected by amplifying each exon. Those exons exhibiting the presence of heteroduplex by conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) were selected for direct sequencing. Sequencing of mutations was carried out by restriction fragment length polymorphism (RFLP).*

Results*: All patients had homologous subsitiation of TGG to CGG in exon 4 which led to change of arginine to tryptophan.*

Conclusion*: The mutation found in this study was in the core domain of enzyme. It seems that the changs in electric charge and affinity of enzyme to substrate,as a result decreases the level of factor XIII-A activity.*

KEY WORDS: *Factor XIII, Factor XIII-A deficiency, Coagulation system, Zahedan*

***MSc of Hematology, Dept of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedical Sciences, Zahedan University of Medical Sciences and Health Services, Zahedan, Iran.**
****Associate Prof, Dept of Hematology, Faculty of Paramedical Sciences, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.**
*****Assistant Prof, Dept of Hematology, Faculty of Paramedical Sciences, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.**
****** Clinic of Hemophilia, Tehran, Iran.**

Archive of SID

www.SID.ir