Archive of SID

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۵، ص ۵۸۴-۵۷۲، ۱۳۹۵

مقالهٔ پژوهشی

ارتباط بین پره اکلامپسی و پلی‌مورفیسم‌های مشخص ژن‌های پروترومبین و فاکتور V انعقاد خون

زهره سالاری[۱]، نصرالله صالح‌گوهری*[۲]، نوشین زینلی[۳]، ندا سلمانی چهار فرسخی[۴]

خلاصه

مقدمه: پره اکلامپسی یک عارضه دوران بارداری و یکی از علت‌های مهم مرگ و میر مادران می‌باشد. افزایش انعقادپذیری احتمالاً یکی از عوامل خطر برای ابتلا به پره اکلامپسی است، لذا پلی‌مورفیسم‌های مشخص G1691A و G20210A در ژن‌های فاکتور V و فاکتور II انعقاد خون می‌تواند باعث امکان افزایش ابتلا به این بیماری بشود.

روش: این مطالعه روی نمونه خون ۶۴ خانم باردار مبتلا به پره اکلامپسی و گروه شاهد انجام شد. بدین منظور DNA موجود در گلبول‌های سفید خون با روش نمک اشباع استخراج و سپس با استفاده از تکنیک ARMS-PCR وجود پلی‌مورفیسم‌های G1691A و G20210A بررسی گردید.

یافته‌ها: بین میانگین سن افراد مبتلا به پره اکلامپسی (۲۸/۷۳۴ سال) و گروه شاهد (۲۴/۹۲۱ سال) تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P=۰/۰۰۰۱۹۶). ولی در میانگین سن حاملگی بین ایندو گروه (۳۴/۷۱۹ هفته و ۳۴/۴۲۱ هفته) تفاوت معنی‌دار نبود.

در بیماران مبتلا به پره اکلامپسی دو نفر هتروزیگوت (۳/۱٪) برای فاکتور II و دو نفر هتروزیگوت (۳/۱٪) برای فاکتور V یافت شد. هیچ فرد هموزیگوتی(۰/۰٪) برای پلی‌مورفیسم‌های فوق در بیماران وجود نداشت. در آزمایشات مربوط به گروه شاهد یک نفر برای فاکتورV هتروزیگوت (۱/۶٪) بود.

نتیجه‌گیری: در مقایسه بین افراد دو گروه بیمار و سالم از لحاظ پلی‌مورفیسم‌های G1691A و G20210A با یکدیگر تفاوت قابل توجهی به‌دست نیامد. لذا این پلی‌مورفیسم‌ها را نمی‌توان به‌عنوان عوامل پیش‌بینی کننده ایجاد پره اکلامپسی در نظر گرفت. تحقیقات گسترده‌تر ژنتیکی و محیطی برای یافتن عوامل خطر پره اکلامپسی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پره اکلامپسی، فاکتور V لیدن، پروترومبین

۱- دانشیار گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی افضلی‌پور و مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۲- دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی افضلی‌پور و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۳- دستیار گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۴- کارشناس آزمایشگاه ژنتیک، بیمارستان افضلی‌پور، کرمان، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: salehgohari@yahoo.co.uk

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۲/۲۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۱۰/۲۳ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۶

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پره اکلامپسی، یکی از سه علت اصلی مرگ مادران در دوران بارداری است که همراه با خونریزی و عفونت، مسئول قسمت عمده‌ای از مرگ و میر مادران می‌باشد (۱). این بیماری نوعی سندرم اختصاصی حاملگی است که می‌تواند تقریبا تمام اعضای بدن را تحت تأثیر قرار دهد. به فشارخون سیستولیک ۱۴۰ و دیاستولیک ۹۰ میلیمتر جیوه یا بیشتر در حاملگی همراه با پروتئینوری به‌صورت دفع پروتئین بیش از ۳۰۰ میلی‌گرم در ادرار ۲۴ ساعته، نسبت پروتئین به کراتین ۰/۳ یا بیشتر در ادرار، و یا وجود پایدار پروتئین به میزان ۳۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر در ادرار تصادفی پره اکلامپسی گفته می‌شود (۲). در این بیماری به‌علت اسپاسم عروقی و فعال شدن اندوتلیوم پرفیوژن اعضا کاهش می‌یابد و به دنبال آن علائم بیماری در مادر و جنین ایجاد می‌شود. در این سندرم که یکی از مهمترین عوارض بارداری است میزان زایمان‌های قبل از موعد و تأخیر رشد داخل رحمی جنین افزایش می‌یابد (۳).

میزان بروز پره اکلامپسی بین ۷-۲ درصد می‌باشد. این میزان در زنان نخست‌زا ۷-۶ درصد و در زنان چندزا ۴-۳ درصد است (۴).

در موارد شدید پره اکلامپسی و اکلامپسی اختلال پاتولوژیک عملکردی، در تعدادی از اعضا شناسایی شده است. این آثار به دو دسته عواقب مادری و جنینی تقسیم‌بندی می‌شوند که اغلب به‌طور هم‌زمان رخ می‌دهند. به‌طور کلی در پره اکلامپسی میزان عواقب احتمالی در مادر زیاد است که از آن جمله می‌توان به Disseminated intravascular coagulation(DIC)، خونریزی داخل جمجمه‌ای، نارسایی کلیوی، کنده شدن شبکیه، ادم ریوی، پارگی کبد، کنده شدن جفت و در نهایت مرگ مادر اشاره کرد.

تاکنون علت دقیق این بیماری مشخص نشده است. با این حال اختلال عملکرد سیستمیک سلول‌های آندوتلیال مادر نقش کلیدی در بروز پره اکلامپسی دارد (۵). علت اصلی اختلالات جنینی کاهش پرفیوژن رحمی ـ جفتی است که به الیگوهیدرآمنیوس، اختلال رشد داخل رحمی، کنده شدن جفت، زجر جنین و در نهایت مرگ جنین می‌انجامد (۳).

عوامل خطر همراه با پره اکلامپسی شامل چاقی، حاملگی چند قلویی، سن بالای ۳۵ سال مادر و نژاد آفریقایی-آمریکایی هستند. اگرچه که مصرف دخانیات سبب انواع پیامدهای نامطلوب حاملگی می‌شود، به‌طور شگفت‌انگیزی مصرف دخانیات در طول حاملگی به‌طور ثابت با کاهش خطر فشارخون در حاملگی همراه است (۲).

تاکنون انواع مختلفی از مشخصه‌های بیولوژیک، بیوشیمیایی و بیوفیزیکی در پاتوفیزیولوژی پره اکلامپسی مطرح شده و به‌منظور پیش بینی وقوع آن به‌کار رفته‌اند. محققان سعی کرده‌اند مشخصه‌های زودرس اختلال در تشکیل جفت، اختلال یا کاهش انتشار مواد از جفت (Perfusion)، اختلال در عملکرد و فعال‌سازی سلول آندوتلیال و فعال‌سازی انعقاد را شناسایی نمایند. تقریباً تمامی این تلاش‌ها منجر به راهبرد آزمایش‌های غربال‌گری با حساسیت پایین برای پیش بینی پره اکلامپسی شده است. در حال حاضر آزمون‌های غربال‌گری قابل اعتماد معتبر و اقتصادی برای تشخیص پره اکلامپسی وجود ندارد(۸-۶). مطالعات متا آنالیز زیادی همراهی بین ترومبوفیلی و پره اکلامپسی را گزارش کرده‌اند. در این مطالعات همراهی بین G1691A در فاکتور V با فشار خون بالای حاملگی و پره اکلامپسی شدید ثابت شده است. به‌ویژه این همراهی در نوع شدید پره اکلامپسی ذکر شده است (۱۴-۹).

www.SID.ir

Archive of SID

نوع جهش یافته (G1691A) فاکتور V انسانی که فاکتور V لیدن (FVL) نامیده می‌شود (۱۵) پروتئینی تولید می‌کند که به پروتئین C فعال که یک عامل غیرفعال‌کننده در انعقاد است مقاوم می‌شود و امروزه به‌عنوان شایع‌ترین عامل وراثتی ترومبوز مطرح است (۱۶). در ضمن همراهی بین پلی‌مورفیسم G20210A در ژن فاکتور II (پروترومبین) و بیماری پره اکلامپسی ثابت شده است (۱۷،۱۸).

پلی‌مورفیسم‌های مشخصی در فاکتورهای V و II انعقاد خون می‌توانند باعث افزایش انعقادپذیری خون (ترومبوفیلی) شوند. جهش G1691A در ژن فاکتور V و جهش G20210A در ژن فاکتور II به‌عنوان پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) از مهمترین نقائص ژنتیکی هستند که منجر به افزایش انعقادپذیری خون می‌شوند (۱۹،۲۰). این بیماری می‌تواند منجر به ترومبوز (تشکیل لخته در رگ‌های خونی) گردد. لخته‌ها تقریباً همیشه در وریدها تشکیل می‌شوند. اگر این لخته‌ها کنده شوند، با عبور از سمت راست قلب می‌توانند وارد ریه شده و باعث آمبولی ریه و یا مغز گردند. زنانی که دچار بیماری افزایش انعقادپذیری باشند در معرض خطر نازایی، سقط، پره اکلامپسی و مرده‌زایی هستند. علت افزایش انعقادپذیری خون در این بیماری آن است که فاکتور لیدن نمی‌تواند مانند فاکتور V به‌وسیله پروتئین C فعال‌شده غیرفعال شود (۲۱). جهشی که باعث ایجاد فاکتور لیدن می‌شود یک پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) در اگزون ۱۰ ژن فاکتور V (F5) است (۲۲). این جهش به‌علت تغییر نوکلئوتید ۱۶۹۱ از گوانین به آدنین (1691G>A) باعث تبدیل اسید آمینه ۵۰۶ از آرژنین به گلوتامین می‌شود. از آنجا که اسید آمینه گوانین محل اثر پروتئین C فعال شده است، این جهش مانع غیرفعال شدن فاکتور V می‌شود. این فاکتور V فعال باعث تولید بیش از حد ترومبین، فیبرین و لخته می‌شود. پلی مورفیسم G20210A در ژن پروترومبین نیز با افزایش خطر ترومبوفیلی همراه است. آلل هموزیگوت این پلی‌مورفیسم منجر به فرم شدید ترومبوفیلی و افزایش خطر ترومبوز و آمبولی می‌شود. این در حالی است که شکل هتروزیگوت این پلی‌مورفیسم با افزایش خطر متوسط این بیماری‌ها همراه است (۲۳). شیوع این پلی‌مورفیسم‌ها در جوامع مختلف متفاوت گزارش شده است. فاکتور لیدن شایع‌ترین علت بیماری افزایش انعقادپذیری ارثی خون در اروپا و آسیا است (۲۶-۲۴). فاکتور لیدن به‌صورت اتوزومال غالب به ارث رسیده و به‌صورت نیمه غالب بروز می‌کند. میزان FVL درسفید پوستان اروپایی بالا و به حدود ۱۵-۱ درصد می‌رسد این در حالی است که این پلی‌مورفیسم در آسیایی‌ها، آفریقایی‌ها، سرخ‌پوستان آمریکائی و بومیان استرالیایی شیوع بسیار کمی دارد (۲۷). در یک مطالعه میزان فاکتور لیدن در آمریکائی‌های آفریقایی تبار ۰/۸۷٪، در آمریکائی‌های اسپانیولی تبار ۱/۶۵٪، و در آمریکائی‌های آسیایی تبار صفر در صد مشخص گردید (۲۴). شیوع FVL درکشورهای عربی مانند کویت، سوریه، لبنان، اردن و فلسطین بالا و در عربستان سعودی، یمن و عمان بسیار ناچیز گزارش شده است (۲۷). در ایران اقداماتی برای تعیین شیوع این فاکتور مؤثر در افزایش انعقادپذیری خون در شهرهای مختلف انجام شده است. در یک مطالعه در ارومیه، شیوع FVL صفر اعلام گردید (۲۸). در مطالعه دیگری در کرمانشاه میزان پلی‌مورفیسم پروترومبین ۱/۶ درصد و میزان FVL ۹۷/۲ درصد بود (۲۹). مداخلات پیشگیرانه برای پره اکلامپسی می‌تواند بر میزان مرگ و میر و عوارض مادری و نوزادی تأثیر زیادی بگذارد.

www.SID.ir

Archive of SID

به‌همین دلیل طی دهه گذشته مطالعات وسیعی برای یافتن روشی برای پیشگیری از پره اکلامپسی انجام شده است. بررسی ارتباط بین پره اکلامپسی و افزایش انعقادپذیری به‌طور بسیار محدودی در بعضی از استان‌های ایران انجام شده که کافی به‌نظر نمی‌رسد. با توجه به وجود تفاوت‌های ژنتیکی در جوامع مختلف، فراوانی پلی‌مورفیسم فاکتورV و II و میزان ارتباط ان با بروز پره اکلامپسی هر منطقه جغرافیایی نسبت به سایر مناطق می‌تواند متفاوت باشد. از آنجاکه مطالعه‌ای در این زمینه تاکنون در کرمان انجام نشده، نتایج آن می‌تواند امکان پیش‌بینی ابتلا به بیماری در افراد مستعد در استان کرمان را فراهم نماید.

روش بررسی

این مطالعه روی نمونه خون ۶۴ خانم باردار مبتلا به پره اکلامپسی بستری در بخش زنان بیمارستان افضلی‌پور و گروه شاهد با حجم نمونه‌ای برابر با گروه مبتلا انجام شد. بیماران بر اساس وجود پرفشاری خون در حد ۱۴۰/۹۰ میلی‌متر جیوه یا بالاتر از آن پس از هفته بیستم حاملگی و دفع پروتئین بیش از ۳۰۰ میلی‌گرم در ادرار۲۴ ساعته به‌عنوان پره اکلامپسی در نظر گرفته شدند. هم‌زمان گروه شاهد از خانم‌های باردار بستری شده در بخش زنان بیمارستان افضلی‌پور انتخاب شدند. در ابتدا هدف از مطالعه برای شرکت‌کنندگان در طرح توضیح داده شد و سپس رضایت نامه مربوطه اخذ گردید. خانم‌های باردار در صورت داشتن سابقه قبلی بیماری‌های قلبی- عروقی و فشارخون و یا بیماری مزمن دیگر کبدی، کلیوی و بیماری‌های روماتولوژیک، چند قلویی و حاملگی مولار از مطالعه کنار گذاشته شدند. دو گروه بیمار و شاهد از نظر تعداد حاملگی و سن حاملگی با هم همسان گردیدند.

از بیماران و گروه شاهد ده سی‌سی خون در لوله‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid (EDTA) گرفته و سپس در آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان افضلی پور DNA موجود در گلبول‌های سفید خون با روش نمک اشباع استخراج گردید (۳۰). سپس با استفاده از تکنیک Amplification Refractory Mutation System-PCR (ARMS-PCR) وجود پلی‌مورفیسم‌های G1691A و G20210A به‌ترتیب در ژن‌های فاکتورV و II انعقاد خون تعیین و مشخص شد (۳۱). در روش ARMS از دو پرایمر اختصاصی و یک پرایمر مشترک استفاده می‌شود. انتهای `3 یکی از پرایمرهای اختصاصی مکمل توالی DNA نرمال است و تنها به DNA الگویی که جهش نداشته باشد متصل می‌شود. انتهای `3 پرایمر دیگر برای توالی جهش یافته اختصاصی و مکمل آن است و تنها به DNA الگویی که جهش داشته باشد متصل می‌شود. پرایمر سوم به‌عنوان پرایمر معکوس برای هر دو پرایمر نرمال و جهش یافته عمل کرده و پرایمر مشترک نامیده می‌شود. معمولا در هر لوله آزمایش یک جفت پرایمر دیگر به‌عنوان کنترل برای تکثیر یک ژن غیر مرتبط با جهش مربوطه استفاده می‌شود که نسبت به DNA تکثیر شده در ARMS قطعه بزرگتری را تکثیر می کند تا مطمئن شویم که عدم تکثیر علت دیگری مثل تجزیه DNA نداشته است. در این پژوهش از ژن بتا گلوبین به‌عنوان کنترل استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص پلی‌مورفیسم‌های مذکور با استفاده از تکنیک ARMS-PCR و پرایمرهای ژن بتا گلوبین در جدول شماره ۱ ذکر گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. *طول قطعات و توالی پرایمرهای مورد استفاده در تعیین جهش‌های فاکتور II و V*

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه
FV common	5`-GGA CTA CTT GAC AAT TAC TGT TCT CTT G-3`	
FV wild type	5`-GCA GAT CCC TGG ACA GAC G-3`	152bp
FV mutant	5`-GCA GAT CCC TGG ACA GAC A-3	
PT common	5`-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GCA G-3`	
PT wild type	5`-GCA CTG GGA GCA TTG AGG ATC-3`	340bp
PT mutant	5`-GCA CTG GGA GCA TTG AGG ATT-3`	
F beta	CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC	861bp
R beta	GAG TCA AGG CTG AGA AGA TGC AGG A	

FV: فاکتور V، PT: فاکتور II، F: پرایمر پیشین، R: پرایمر معکوس

برای اطمینان از صحت انجام آزمایشات تعدادی از نمونه‌ها با کیت تشخیصی پلی‌مورفیسم‌های مذکور ژن در فاکتورهای II و V انعقاد خون خریداری شده از شرکت TAG Copenhagen مجددا آزمایش شدند.

سپس محصولات PCR به‌دست آمده آزمایشات مذکور روی ژل آگاروز ۲ درصد برده شده و وجود یا نبود قطعات بررسی شدند. در انتها جواب آزمایشات انجام شده بااستفاده تکنیک ARMS-PCR و کیت با یکدیگر مقایسه شد.

نتایج

در این پژوهش ۶۴ خانم حامله مبتلا به پره اکلامپسی و ۶۴ زن حامله غیرمبتلا از نظر شاخص‌های مندرج در جدول شماره ۲ و همچنین وجود پلی‌مورفیسم‌های G1691A و G20210A در ژن فاکتور V و II بررسی شدند. میانگین سن بیماران ۲۸/۷۳۴ با انحراف معیار ۶/۵۱۳ و در گروه شاهد ۲۴/۹۲۱ با انحراف معیار ۴/۵۰۵ بود. حداکثر سن افراد در زمان مطالعه در افراد مبتلا به پره اکلامپسی ۴۱ سال و در گروه شاهد ۳۴ سال بود. این در حالی است که حداقل سن افراد شرکت کننده برای بیماران و گروه کنترل ۱۷ و ۱۸ سال بود (جدول شماره ۲). از نظر سن شناسنامه‌ای اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و شاهد وجود داشت (P=۰/۰۰۰۱۹۶).

بین میانگین سن حاملگی در افراد بیمار و گروه کنترل (۳۴/۷۱۹ هفته و ۳۴/۴۲۱ هفته) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P=۰/۵۷۶۷۰۶). این شاخص در بیماران ۳۴/۷۱۹ هفته با انحراف معیار ۳/۰۶۳ و در گروه کنترل ۳۴/۴۲۱ هفته با انحراف معیار ۲/۹۳۷ بود. حداقل و حداکثر سن حاملگی نیز در آنها یکسان بود.

۴۲ نفر از بیماران دارای پروتئینوری یک مثبت (+) و ۴۶ نفر از انها دارای فشارخون سیستولیک بالاتر از ۱۴۰ و دیاستولیک بالاتر از ۹۰ میلیمتر جیوه بودند. ولی در هیچکدام از افراد گروه کنترل پروتئینوری و یا فشار خون بالا مشاهده نشد. از نظر حداقل و حداکثر تعداد حاملگی بین این دو گروه فرقی وجود نداشت، ولی میانگین و انحراف معیار این شاخص در دو گروه کمی متفاوت بود(جدول شماره ۲). سه نفر از بیماران و دو نفر از گروه شاهد سابقه تولد یک مرده‌زایی داشتند. سابقه یک مورد سقط در ۱۲ نفر از بیماران و در ۶ نفر از افراد غیر مبتلا به پره اکلامپسی وجود داشت. اما سابقه دو سقط فقط در دو نفر از بیماران مشاهده شد. آنزیم‌های کبدی بالا در ۳۴ نفر از گروه بیمار و علائم شدید پره اکلامپسی در ۴۳ نفر از گروه بیمار

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده شد. هیچکدام از افراد مبتلا و گروه کنترل سابقه‌ای از بیماری‌های قلبی- عروقی و فشارخون و یا بیماری مزمن دیگر کبدی، کلیوی و بیماری‌های روماتولوژیک، چند قلویی و حاملگی مولار نداشتند.

جدول ۲. *شاخص‌های بالینی و اطلاعات باروری بیماران مبتلا به پره اکلامپسی و گروه کنترل سالم*

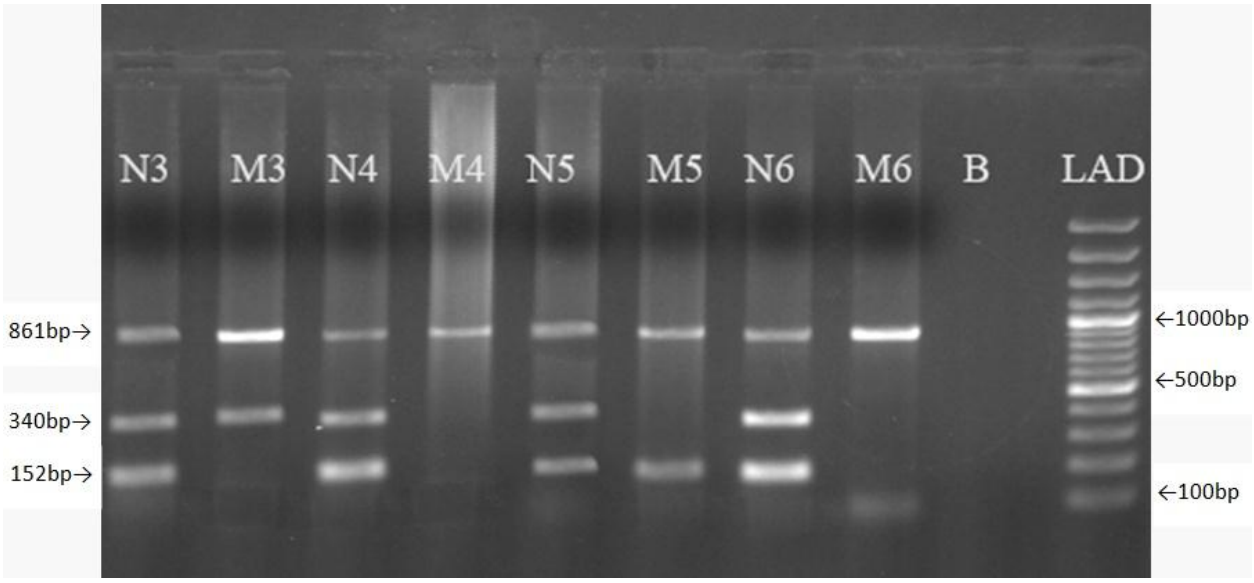
	بیمار	شاهد
	میانگین: ۶/۵۱۳±۲۸/۷۳۴	میانگین: ۴/۵۰۵±۲۴/۹۲۱
سن مادر (سال)	حداکثر: ۴۱	حداکثر: ۳۴
	حداقل: ۱۷	حداقل: ۱۸
	میانگین: ۳/۰۶۳ ± ۳۴/۷۱۹	میانگین: ۲/۹۳۷± ۳۴/۴۲۱
سن حاملگی (هفته)	حداکثر: ۳۸	حداکثر: ۳۸
	حداقل: ۲۸	حداقل: ۲۸
فشارخون مساوی یا بالاتر از ۱۴۰/۹۰	۴۶ نفر	۰ نفر
پروتئین اوری +	۴۲ نفر	۰ نفر
بچه مرده	۳ نفر	۲ نفر
	میانگین: ۰/۹۱۸±۱/۸۲۸	میانگین: ۰/۷۱۲±۱/۴۶
تعداد حاملگی	حداکثر: ۴	حداکثر: ۴
	حداقل: ۱	حداقل: ۱
یک مورد سقط	۱۲ نفر	۶ نفر
دو مورد سقط	۲ نفر	۰ نفر
آنزیم های کبدی بالا	۳۴ نفر	۰ نفر
وجود علائم شدید پره اکلامپسی	۴۳ نفر	۰ نفر
سابقه بیماری قبلی	۰ نفر	۰ نفر

در این پژوهش واکنش ARMS-PCR با حضور پرایمر نرمال (Wild type) و پرایمر مشترک (Common) و واکنش دیگر در لوله آزمایش جداگانه بین پرایمر جهش یافته (Mutant) و پرایمر مشترک (جدول شماره ۱) روی هر نمونه DNA بیمار مبتلا به پره اکلامپسی و فرد شاهد سالم انجام شد. تکثیر در حضور پرایمر نرمال نشان دهنده وجود توالی غیر جهش‌دار و تکثیر در حضور پرایمر جهش‌یافته نشان دهنده توالی جهش یافته در نمونه مورد آزمایش است. همانطور که در شکل شماره ۱ ملاحظه می‌شود طول قطعه تکثیر شده از ژن پروترومبین در حالت جهش‌یافته و نرمال 340bp است. این در حالی است که قطعه جهش‌یافته و نرمال تکثیر شده از ژن فاکتور V دارای 152bp می‌باشد. در ARMS بر اساس اینکه برای هر آزمایش قطعه نرمال و یا جهش‌دار تکثیر شود ژنوتیپ مربوطه می‌تواند یکی از سه

www.SID.ir

Archive of SID

حالت هموزیگوت نرمال، هموزیگوت جهش‌یافته و یا هتروزیگوت باشد. قطعه 861bp مربوط به تکثیر ژن گلوبین می‌باشد که به‌عنوان کنترل PCR بوده و صحت انجام آزمایشات را تایید می‌کند. این قطعه در تمامی آزمایشات موجود در این شکل وجود دارد.



شکل ۱. *تصویر ژل الکتروفورز حاصل از ARMS-PCR نمونه DNA بیماران مبتلا به پره اکلامپسی و گروه کنترل سالم در کرمان*

N: استفاده از پرایمرهای نرمال ومشترک، M: استفاده از پرایمرهای موتانت و مشترک، قطعه 861bp؛ ژن گلوبین به‌عنوان کنترل، N3 وM3: فاکتور II هتروزیگوت و فاکتور V نرمال، N4 و M4: عدم وجود جهش در فاکتور II و فاکتورV، N5 و M5: فاکتور II عدم وجود جهش و فاکتور V هتروزیگوت، N6 و M6: عدم وجود جهش در فاکتور II و فاکتور V، B: کنترل منفی (بدون DNA)، LAD: مارکر اندازه‌گیری با فاصله 100bp

در کل آزمایشات انجام شده با استفاده از روش ARMS و یا کیت برای ۶۴ بیمار مبتلا به پره اکلامپسی دو نفر هتروزیگوت برای فاکتور II و دو نفر هتروزیگوت برای فاکتور V یافت شد. هیچ‌گونه فرد هموزیگوتی برای پلی‌مورفیسم‌های مربوط به این فاکتورها در بیماران مبتلا به پره اکلامپسی وجود نداشت. در تمامی آزمایشات مربوط به گروه کنترل یک نفر هتروزیگوت فاکتور V وجود داشت (جدول شماره ۳). در مقایسه بین افراد مبتلا به پره اکلامپسی و افراد سالم از نظر وجود جهش در فاکتور II انعقاد خون میزان OR=۳/۱ بود. در حالی‌که بین این دو گروه شاخص مذکور برای جهش در فاکتور V انعقاد خون برابر با OR=۲/۰۳ بود. در کل آزمایشات هیچ تناقضی بین نتایج به‌دست آمده با استفاده از روش ARMS و کیت مشاهده نگردید که موید درستی این نتایج می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. *مقایسه شیوع ژنوتیپ فاکتورهای II و V انعقاد خون بین بیماران مبتلا به پره اکلامپسی و گروه کنترل سالم در مناطق مختلف ایران*

ژنوتیپ	کرمانشاه[۳۵]		بندر عباس[۳۶]		کرمان	
	پره اکلامپسی	کنترل سالم	پره اکلامپسی	کنترل سالم	پره اکلامپسی	کنترل سالم
فاکتور V						
G/G	٪۹۲/۴	٪۹۲/۱	٪۹۱/۴	٪۹۹	٪۹۶/۹	٪۹۸/۴
G/A	٪۷/۶	٪۷/۹	٪۸/۶	٪۱	٪۳/۱	٪۱/۶
A/A	٪۰	٪۰	٪۰	٪۰	٪۰	٪۰
پروترومبین						
G/G	٪۹۸	٪۹۷	–	–	٪۹۶/۹	٪۱۰۰
G/A	٪۲	٪۳	–	–	٪۳/۱	٪۰
A/A	٪۰	٪۰	–	–	٪۰	٪۰

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعات پیش از این بررسی شیوع پلی‌مورفیسم‌های G1691A و G20210A در ژن فاکتور V و II و یا ارتباط آنها با بیماری‌های زنان و زایمان مانند ناباروری (۳۲) و سقط مکرر (۳۳) در ایران انجام شده است. ارتباط بین پره اکلامپسی و پلی‌مورفیسم‌های مذکور قبلا در کرمانشاه (۳۴) و بندر عباس (۳۵) مطالعه شده است. پژوهش حاضر سومین موردی است که رابطه این پلی‌مورفیسم‌ها و پره اکلامپسی را بررسی می‌کند. در هیچ‌کدام از تحقیقات انجام شده در ایران فرد هموزیگوت برای پلی‌مورفیسم‌های فوق یافت نشده است. در تحقیق حاضرکه روی نمونه خون ۶۴ بیمار مبتلا به پره اکلامپسی انجام شد دو بیمار برای فاکتور II و دو بیمار برای فاکتور V هتروزیگوت بودند. این در حالی است که یک نفر هتروزیگوت فاکتور V در گروه کنترل وجود داشت. در مقایسه بین افراد مبتلا به پره اکلامپسی و افراد سالم برای جهش در فاکتور II انعقاد خون میزان OR=۳/۱ بود. این شاخص برای جهش در فاکتور V انعقاد خون برابر با OR=۲/۰۳ بود. لذا چنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که شانس جهش فاکتور II در بیماران حدود سه برابر بیش از افراد سالم و این شانس برای فاکتور V حدودا دو برابر بوده است. در تحقیق انجام شده در کرمانشاه شیوع پلی‌مورفیسم لیدن و پلی‌مورفیسم پروترومبین در گروه کنترل بیشتر از افراد مبتلا به پره اکلامپسی است، در حالی‌که این میزان در کرمان و بندرعباس در گروه بیماران بیشتر بوده است (جدول شماره ۳). ولی میزان آنها در هیچ‌کدام از این بررسی‌ها انقدر بالا نبوده که بتواند پلی‌مورفیسم‌های مذکور را به‌عنوان عامل خطر برای پره اکلامپسی معرفی کند. لذا نتایج این تحقیق نیز ارتباط قوی بین این بیماری و پلی‌مورفیسم‌های مذکور را تأیید نمی‌کند.

در کشورهای اروپایی نتایج ضد و نقیضی در رابطه با ارتباط بین پره اکلامپسی و پلی‌مورفیسم در ژن‌های دخیل در انعقاد خون یافت شده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Mello و همکارانش در ایتالیا انجام شد ارتباط معنی‌داری بین بیماری‌های ترمبوفیلیک و پره اکلامپسی شدید در زنان سفید پوست به‌دست امد(۳۶). اما در مطالعه مشابهی که در سال ۲۰۰۷ انجام شد ارتباط فوق تایید نگردید (۳۷).

www.SID.ir

Archive of SID

Hira و همکاران از جنوب آفریقا نیز ارتباط معنی‌داری بین پره اکلامپسی و پلی‌مورفیسم‌های لیدن و G20210A پیدا نکردند (۳۸).

روی هم رفته، ارتباط قوی‌تر بین پلی مورفیسم لیدن و G20210A با پره اکلامپسی را در جمعیت سفید پوست کشورهای اروپایی نسبت به ساکنین کشورهای آسیایی و آفریقایی میتوان به شیوع بیشتر این نوع پلی‌مورفیسم‌ها در نژاد سفید (۲۵-۲۸) دانست.

شیوع آلل بیماریزا (آلل A) در ژن فاکتور V در بین بیماران مبتلا به پره اکلامپسی در کرمانشاه ۳/۶ درصد و در مورد پروترومبین ۱ درصد اعلام شده است. در این پژوهش ما شیوع ۱/۶ درصد را برای این آلل در هر دو ژن پیدا کردیم. شیوع آلل بیماریزا (آلل A) در ژن فاکتور V در گروه کنترل در کرمان ۰/۸ درصد و در کرمانشاه ۴ درصد یافت شده است. شیوع این آلل درگروه کنترل برای پروترومبین در کرمانشاه ۱/۵ درصد اعلام شده و این درحالی است که ما در گروه کنترل پروترومبین هیچ فرد دارای آلل A را نیافتیم و شیوع آن صفر درصد بود (جدول شماره ۴). اگر چه درصد شیوع آلل‌های انعقادی در این دو استان تا حدی به‌هم نزدیک است تناقضات موجود می‌تواند به‌علت تفاوت‌های نژادی در این دو منطقه باشد زیرا اکثریت مردم کرمانشاه کرد نژاد هستند در حالی که کرمان شهر مهاجرپذیری نبوده و جمعیت دست نخورده بومی اکثریت مردم آن را تشکیل می‌دهد.

جدول ٤. *شیوع آلل‌ها در بیماران مبتلا به پره اکلامپسی و گروه کنترل سالم در کرمان*

پروترومبین در افراد سالم		فاکتور V در افراد سالم		پروترومبین در افراد مبتلا به پره اکلامپسی		فاکتور V در افراد مبتلا به پره اکلامپسی		آلل
در صد	تعداد	در صد	تعداد	در صد	تعداد	در صد	تعداد	
۱۰۰	۱۲۸	۹۹,۲	۱۲۷	۹۸,۴	۱۲۶	۹۸,۴	۱۲۶	G
۰	۰	۰,۸	۱	۱,۶	۲	۱,۶	۲	A
۱۰۰	۱۲۸	۱۰۰	۱۲۸	۱۰۰	۱۲۸	۱۰۰	۱۲۸	کل

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر از مقایسه افراد در دو گروه مبتلا به پره اکلامپسی و گروه سالم به‌عنوان شاهد با یکدیگر از لحاظ ژنوتیپی در هر دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (G1691A) و (G20210A) تفاوت قابل توجهی به‌دست نیامد. اگر چه همراهی بین افزایش تمایل به ترومبوفیلی و پره اکلامپسی در مطالعات مختلف گزارش شده است، پلی مورفیسم لیدن و G20210A را نمی‌توان به‌عنوان یک عامل خطر برای پیش‌بینی ایجاد پره اکلامپسی در نظر گرفت. لذا تحقیقات گسترده‌تری در زمینه‌های ژنتیکی و محیطی برای یافتن عوامل ایجاد کننده پره اکلامپسی مورد نیاز است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه پژوهشی خانم دکتر نوشین زینلی است. از کارشناسان آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان افضلی‌پور به‌دلیل همکاری در گرفتن و نگهداری نمونه‌های خون و از دانشگاه علوم پزشکی کرمان به‌دلیل تقبل هزینه‌های اجرای طرح قدردانی و سپاسگزاری می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY. Williams obstetrics. 23rd ed. New York, McGraw-Hill, 2010; PP 756-85.
2. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Hauth LC, *et al.* Hypertensive disorders in pregnancy, In: Rouse D, Rainey B, Spong C, Wendel GD. (editors), Williams Obsterics.23rd ed., USA, McGraw-Hill companies, 2010; PP 706-757.
3. Scott JR, Gibbs RS, Karlan BY, Haney AF. Danforth's obstetrics and gynecology. 9th ed., New York, Lippincott Williams & Wilkins, 2003;PP 143-153.
4. Cunningham G, Gilstrap LC, Leveno KJ, Bloom L. Williams Obstetrics 2nd ed., Philadelphia, McGraw-Hill, 2004; PP 761-808.
5. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161(5): 1200-4.
6. Piazze J, Gioia S, Maranghi L, Anceschi M. Mean platelet and red blood cell volume measurements to estimate the severity of hypertension in pregnancy. *J Perinat Med*. 2006; 34(3): 246-7.
7. Ceyhan T, Beyan C, Başer I, Kaptan K, Güngör S, Ifran A. The effect of pre-eclampsia on complete blood count, platelet count and mean platelet volume. *Ann Hematol* 2006; 85(5): 320-2.
8. Missfelder-Lobos H, Teran E, Lees C, Albaiges G, Nicolaides KH. Platelet changes and subsequent development of pre-eclampsia and fetal growth restriction in women with abnormal uterine artery Doppler screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002; 19(5): 443-8.
9. Lin J, August P. Genetic thrombophilias and pre-eclampsia: a metaanalysis. *Obstet Gynecol* 2005; 105(1): 182-92.
10. Kosmas IP, Tatsioni A, Ioannidis JP. Association of Leiden mutation in factor V gene with hypertension in pregnancy and pre-eclampsia: ameta-analysis. *J Hypertens* 2003; 21(7): 1221-8.
11. Donna S. D, Lesa M. N, Katrina E, Kenneth W. The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 192-195.
12. Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, vonBlomberg BM, Jakobs C, et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173(4): 1042-8.
13. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K. The factor VLeiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175(4pt1): 902-5.
14. Lindoff C, Ingemarsson I, Martinsson G, Segelmark M, Thysell H, Astedt B. Preeclampsia is associated with reduced response toactivated protein C. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176(2):457-60.
15. Van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H, Huijgens PC, KoopmanMM, von Blomberg BM, *et al*. High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a

www.SID.ir

Archive of SID

history of preeclampsia. *Am JObstet Gynecol* 1999; 180(5): 1146-50.

16. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, *et al*. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369 (6475): 64-7.
17. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(3): 1004-8.
18. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, Cappucci G, Scianname` N, *et al*. Prothrombotic genetic risk factors and the occurrence of gestational hypertension with or with outproteinuria. *Thromb Haemost* 1999; 81(3): 349-52.
19. Kupferminc MJ, Fait G, Many A, Gordon D, Eldor A, Lessing JB. Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 45-9.
20. Tranquilli AL, Giannubilo SR, Dell'Uomo B, Grandone E. Adverse pregnancy outcomes are associated with multiple maternal thrombophilic factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 117(2): 144-7.
21. Martinelli I, Battaglioli T, De Stefano V, Tormene D, Valdrè L, *et al*. The risk of first venous thromboembolism during pregnancy and puerperium in double heterozygotes for factor V Leiden and prothrombin G20210A. *J Thromb Haemost* 2008; 6(3): 494-8.
22. De Stefano V, Leone G. Resistance to activated protein C due to mutated factor V as a novel cause of inherited thrombophilia. *Haematologica* 199h; 80(4): 344-56.
23. SNP linked to Gene F5". NCBI. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi.
24. Makris M. Thrombophilia: grading the risk . *Blood* 2009; 113: 5038-5039.
25. Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA* 1997; 277 (16): 1305-7.
26. Gregg JP, Yamane AJ, Grody WW. Prevalence of the factor V-Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. *Am J Med Genet* 1997; 73(3): 334-6.
27. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G. Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24(4): 367-79.
28. Dashti AA, Jadaon MM. Race differences in the prevalence of the factor V Leiden mutation in Kuwaiti nationals. *Mol Biol Rep* 2011; 38(6): 3623-8.
29. Bagheri M, Rad IA. A Multiplex Allele Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) for the Detection of Factor V Leiden and Prothrombin G20210A. *Maedica (Buchar)* 2011; 6(1): 3-9.
30. Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Mozafari H, Kharrazi H, Rezaei M, *et al*. Prevalence

www.SID.ir

Archive of SID

of factor V Leiden (G1691A) and prothrombin (G20210A) among Kurdish population from Western Iran. *J Thromb Thrombolysis* 2008; 25(3): 280-3.

31. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215-16.
32. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summeres C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17(7): 2503-16.
33. Behjati R, Modarressi MH, Jeddi-Tehrani M, Dokoohaki P, Ghasemi J, Zarnani AH, et al. Thrombophilic mutations in Iranian patients with infertility and recurrent spontaneous abortion. *Ann Hematol* 2006; 85(4): 268-71.
34. Bagheri M, Rad IA, Nanbakhsh F. Factor V Leiden G1691A and factor II G20210A point mutations and pregnancy in North-West of Iran. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 284(5): 1311-5.
35. Malek-Khosravi S, Rahimi Z, Rahimi Z, Jalilvand F, Parsian A. Thrombophilic mutations and susceptibility to preeclampsia in Western Iran. *J Thromb Thrombolysis* 2012; 33(1): 109-15.
36. Karimi S, Yavarian M, Azinfar A, Rajaei M, Azizi Kootenaee M. Evaluation the frequency of factor V Leiden mutation in pregnant women with preeclampsia syndrome in an Iranian population. *Iran J Reprod Med* 2012; 10(1): 59-66.
37. Mello G, Parretti E, Marozio L, Pizzi C, Lojacono A, Frusca T, *et al*. Thrombophilia is significantly associated with severe preeclampsia: results of a large-scale, case-controlled study. *Hypertension* 2005; 46(6): 1270-4.
38. Giovanni L, Antonio AP, Danilo C, Stefano G, Therese D, Elisabetta RM, *et al*. Thrombophilias and pregnancy complications: a case-control study. *Int J Biomed Sci* 2007; 3(3): 168-75.
39. Giovanni L1, Antonio AP, Danilo C, Stefano G, Therese D, Elisabetta RM, *et al*. Thrombophilias and pregnancy complications: a case-control study. *BJOG* 2003; 110: 327-328.

www.SID.ir

Archive of SID

The Association between Preeclampsia and Defined Polymorphisms in Prothrombin and Coagulation Factor V Genes

Zohreh Salari, M.D. [1], Nasrollah Saleh-gohari, Ph.D. [2*], Nushin Zainali, M.D. [3], Neda Salmani-Cheharfarsakhi, B.Sc. [4]

1. Associate Professor of Obstetrics & Genecology, Afzalipour School of Medicine & Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Associate Professor of Genetics, Afzalipour School of Medicine & Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Resident of Obstetrics & Genecology, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4. Genetic Laboratory, Afzalipour Hospital, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: salehgohari@yahoo.co.uk

(Received: 11 May 2015 Accepted: 25 Jan 2016)

Abstract

Background & Aims: Preeclampsia is one of the complications of pregnancy and a major cause of maternal mortality. Since, hypercoagulation is one of the risk factors, defined polymorphisms of V and II coagulation factors (G1691A and G20210A) may increase the risk of the disease.

Methods: This investigation was performed on blood samples of 64 preeclamptic women and control group. DNA of white blood cells were extracted using salt satutation method. Then, G1691A and G20210A polymorphisms were investigated using ARMS-PCR technique.

Results: Significant difference was found between the mean age of case (28.734 yrs) and control (24.921 yrs) groups (P=0.000196). But, mean of gestational age did not show significant difference between the case and control groups (34.719 wks & 34.421 wks respectively).

Among the preeclamptic patients, we found two heterozygotes (3.1%) for each factor II and factor V. No homozygote mutation (0%) was found in this study, while we found one heterozygote subject (1.6%) for factor V in the control group.

Conclusion: in comparison of preeclamptic and control group for single nucleotid polymorphisms (G1691A and G20210A), no significant difference was found. Therefore, these polymorphisms cannot be considered as prediagnostic risk factors for preeclampsy. We suggest more wide genetic and invironmental investigations for finding preeclampsia risk factors.

Keywords: Preeclampsia, Factor V Leiden, Prothrombin

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(5): 572-584

www.SID.ir