مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۳، اردیبهشت ۱۳۹۳، ۱۹۲-۱۸۳

همراهی بین پلی‌مورفیسم‌های هموزیگوت متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز و آنتی‌ژن PLA2 پلاکتی با ترومبوآمبولی وریدی (VTE) در شهرکرد

بتول پورقیصری[۱]، علی هاشمی‌نیا[۲]،حمید روحی بروجنی[۳]

دریافت مقاله:۹۱/۰۵/۰۷ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح:۹۱/۰۷/۱۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده:۹۲/۱۱/۰۲ پذیرش مقاله:۹۲/۱۲/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: ترومبوآمبولی وریدی (VTE) از علل مهم مرگ و میر در جوامع مختلف بشری است. فاکتور ۵ لیدن (FVL)، پلی‌مورفیسم C677T در متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز (MTHFR) و پلی‌مورفیسم A_2 از گلیکوپروتئین IIb/IIIa پلاکتی از عوامل مهم خطرزای ارثی در ترومبوآمبولی وریدی است. از آن‌جا که اطلاعات معدودی از هموزیگوت‌ها در دست است، هدف از مطالعه حاضر بررسی همراهی حالت هموزیگوت پلی‌مورفیسم‌های فوق و ترومبوآمبولی وریدی در شهرکرد بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی نمونه خون از ۷۲ بیمار مبتلا به ترمبوآمبولی وریدی مراجعه‌کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد و ۳۰۶ فرد سالم مطابق از نظر سن و جنس، در لوله‌های حاوی EDTA گرفته شد. پلی‌مورفیسم‌های فاکتور ۵ لیدن، MTHFR C677T و PLA_2 با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی شد.تجزیه وتحلیل اطلاعات به دست آمده با روش‌های آمار توصیفی و آزمون مجذور کای انجام گرفت.

یافته‌ها: تعداد کل پلی‌مرفیسم‌ها در بیماران با شیوع ۱۶/۷۷٪ نسبت به گروه شاهد با شیوع ۴/۹۰٪ تفاوت معنی‌دار داشت (p=۰/۰۰۴). شیوع هموزیگوت جهش FVL در بیماران بیش‌از گروه شاهد بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود. در میزان شیوع هموزیگوت MTHFR C677T و PLA_2 بین بیماران و گروه شاهد تفاوت معنی‌دار وجود داشت (به ترتیب p=۰/۰۳ و p=۰/۰۰۱). تفاوت بین بیماران و گروه شاهد از نظر هتروزیگوت پلی‌مورفیسم‌های فوق به غیر از PLA_2 معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه همراهی بین هموزیگوت پلی‌مورفیسم‌های MTHFR و PLA_2 را با ترومبوآمبولی وریدی در شهرکرد نشان می‌دهد. کنترل عوامل خطرزای اکتسابی در افراد هموزیگوت این پلی‌مورفیسم‌ها ممکن است لازم باشد. بیماران VTE ناقل این پلی‌مورفیسم‌ها ممکن است نیاز به مدیریت متفاوتی با سایر بیماران داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: ترومبوآمبولی وریدی، فاکتور ۵ لیدن، متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز، پلی‌مورفیسم PLA_2، هموزیگوت

۱- (نویسنده مسئول) دانشیارگروه آموزشی پاتولوژی و هماتولوژی مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
تلفن: ۳۳۳۶۷۲۰-۰۳۸۱، دورنگار: ۳۳۳۶۷۲۰-۰۳۸۱، پست الکترونیکی: bat238@yahoo.com
۲- مربی گروه آموزشی پرستاری، پرستاری داخلی – جراحی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- دانشیار گروه آموزشی داخلی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

مقدمه

ترومبوآمبولی وریدی بیماری است که عوامل ارثی و اکتسابی، هر دو در ایجاد آن دخالت دارند. هر چند شیوع واقعی [Venous Thrombo Embolism (VTE)] که شامل ترومبوز وریدهای عمقی (DVT) و ترومبوآمبولی ریوی (PE) می‌شود در بسیاری از جوامع مشخص نیست، اما به عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر شناخته شده است. VTE در آمریکا به عنوان سومین علت مرگ و اولین علت مرگ‌های غیر قابل پیش‌بینی است [۱]. حتی بیمارانی که پس از PE زنده می‌مانند کیفیت زندگی پایین‌تری نسبت به افراد طبیعی دارند[۲]. اختلالات فاکتورهای انعقادی، پلاکت‌ها، دیواره عروق و مهار کننده‌های انعقادی می‌توانند در ایجاد ترومبوز مؤثر باشند. ترومبوفیلی وضعیتی است که شرایط را برای ایجاد ترومبوز فراهم می‌کند.

فاکتور ۵ لیدن [Factor V Leiden (FVL)] و پلی‌مورفیسم A_2 در گلیکوپروتئین IIb/IIIa پلاکت (PLA_2) و پلی‌مورفیسم C677T از متیلن تترا هیدروفولات ردوکتاز [Methylene Tetrahydrofolate Reductase (MTHFR)] از فاکتورهای مهم خطرزا در ترومبوآمبولی وریدی هستند. FVL جهشی در فاکتور پنج انعقادی است که آن را نسبت به عمل پروتئین C که مهار کننده آن است مقاوم می‌کند[۳]. پلی‌مورفیسم C677T از مولکول MTHFR، آنزیم را نسبت به حرارت مقاوم می‌کند و باعث افزایش سطح هموسیستئین در سرم می‌گردد که از عوامل مساعدکننده ترومبوز است [۵-۴]. پلی‌مورفیسم PLA_2 از گلیکوپروتئین IIb/IIIa پلاکت باعث افزایش تمایل این گیرنده نسبت به فیبرینوژن می‌گردد و پلاکت را نسبت به تجمع پلاکتی حساس‌تر می‌کند و همراهی آن با بیماری‌های ایسکمیک مغزی گزارش شده است [۸-۶]. گزارشات متعددی از همراهی آن در بیماری‌های قلبی-عروقی وجود دارد [۱۰-۹]. فراوانی این پلی‌مورفیسم‌ها بر اساس منشأ نژادی هم در جمعیت سالم و هم در بیماران مبتلا به VTE متفاوت است [۱۳-۱۱] و نیز گزارشات موجود تفاوت‌های اساسی موجود در توزیع آن‌ها را نشان می‌دهد. با توجه به این‌که حالت هموزیگوت در هر یک از پلی‌مورفیسم‌های فوق می‌تواند منجر به افزایش فرآورده حاصل از ژن گردد و اطلاعات موجود در این زمینه محدود است، همراهی بین حالت هموزیگوت این فاکتورها و VTE در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد بررسی در این مطالعه مقطعی، مرکب از ۷۲ بیمار مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی بودند که از شهریور ماه ۱۳۸۹ تا دی ماه ۱۳۹۰ به بیمارستان هاجر شهرکرد مراجعه نمودند و در زمان تشخیص علایم PE یا DVT داشتند. گروه شاهد مرکب از ۳۰۶ فرد سالم از همان ناحیه که از نظر سن و جنس با بیماران مطابقت داشتند انتخاب شدند. افراد بیمار و شاهد فرم رضایت کتبی شرکت در مطالعه را قبل از نمونه‌گیری تکمیل نمودند.

همه بیماران و گروه شاهد از نظر پلی‌مورفیسم‌های FVLو MTHFR و PLA_2 بررسی شدند. نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی EDTA پس از کسب رضایت کتبی از افراد شرکت‌کننده جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد منتقل شد. DNA با روش فنیل کلروفرم از خون کامل استخراج گردید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Unico 2100 تعیین مقدار و سپس استانداردسازی شد. سپس جهش‌های مورد نظر با روش واکنش زنجیره پلی‌مراز- پلی‌مورفیسم طولی زنجیره محدود (PCR-RFLP) مورد بررسی قرار گرفت. از مخلوط بدون DNA به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تکثیر ژن مورد نظر توسط دستگاه ترموسایکلر ASTEC, PC818 Japan صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده برای بررسی هر یک از جهش‌های مورد نظر که بر اساس مطالعه Ivanov و همکاران طراحی گردید [۱۴]، در جدول ۱ دیده می‌شود. آنزیم‌های محدودگر مورد استفاده شامل Mn1I برای FVL، HinfI برای MTHFR C677T و MsPI برای PLA_2 بودند. آنزیم‌های محدودگر مورد استفاده از شرکت سیناژن و پرایمرها از شرکت ژن فن آوران تهیه گردید. ژل پلی‌اکریل آمید ۸٪ جهت بررسی محصولات نهایی مورد استفاده قرار گرفت و باندهای جدا شده توسط رنگ‌آمیزی کومازی برلیانت بلو قابل مشاهده گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در بررسی جهش‌های مورد مطالعه

اختلال ژنتیکی	پرایمرها
FVL	F 5′ TGC CCA GTG CTT AAC AAG ACC A 3′ R 5′ TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA 3′
MTHFR C677T	F 5′ TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA 3′ R 5′ AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG 3′
PLA2	F 5′ TTC TGA TTG CTG GAC TTC TCT T 3′ R 5′ TCT CTC CCC ATG GCA AAG AGT 3′

برنامه دمایی مورد استفاده برای پلی‌مورفیسم‌های مورد نظر به صورت زیر در نظر گرفته شد:

جهش FVL: دمای ۹۶ سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۶ سیکل شامل ۹۶ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۸ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد به مدت۶۰ ثانیه، سپس ۲۸ سیکل شامل: دمای ۹۶ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد به مدت۳۰ ثانیه، و در نهایت ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

پلیمرفیسم PLA_2: دمای ۹۶ سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۵ سیکل شامل: دمای ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۶ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد به مدت۶۰ ثانیه، سپس ۳۱ سیکل شامل: دمای ۹۴ سانتی‌گراد به مدت۴۰ ثانیه، ۵۵ سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد به مدت۴۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

پلیمرفیسم MTHFRC677T: دمای ۹۴ درجه ۵ دقیقه، سپس ۵ سیکل شامل: دمای ۹۴ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۹ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد به مدت۶۰ ثانیه، سپس ۲۵ سیکل شامل: دمای ۹۴ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد به مدت۳۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

با استفاده از پرایمرهای لازم برای شناسایی جهش G1691A از فاکتور ۵ لیدن، قطعه‌ای به طول ۲۶۷ جفت باز تکثیر گردید. در نوع بدون جهش دو سایت برش آنزیم Mn1I وجود دارد و به این ترتیب در این افراد سه قطعه به طول ۱۶۳ و ۶۷ و ۳۷ جفت بازی تشکیل می‌گردد. در صورت وجود جهش مورد نظر با تبدیل G به A در نقطه ۱۶۹۱ ژن مربوطه یک سایت آنزیم حذف می‌گردد و دو قطعه ۲۰۰ و ۶۷ جفت بازی تشکیل می‌گردد.

با استفاده از پرایمرهای لازم برای شناسایی پلی‌مورفیسم MTHFRC677T، قطعه‌ای به طول ۱۹۸

جفت باز تکثیر گردید. در نوع بدون جهش سایتی برای برش آنزیم HinfI وجود ندارد و به این ترتیب در این افراد قطعه به طول ۱۹۸ جفت بازی باقی می‌ماند. در صورت وجود جهش مورد نظر، در قطعه ۱۹۸ جفت بازی با تبدیل C به T در نقطه ۶۷۷ ژن مربوطه یک سایت آنزیم تشکیل می‌گردد و قطعه ۱۹۸ به دو قطعه ۱۷۵ و ۲۳ جفت بازی تبدیل می‌گردد.

برای شناسایی پلی‌مورفیسم‌های PLA، قطعه‌ای به طول ۲۶۴ جفت باز تکثیر گردید. در پلی‌مورفیسم PLA_1 یک سایت برش آنزیم HinfI وجود دارد و به این ترتیب در این افراد دو قطعه به طول ۲۲۲ و ۴۲ جفت بازی تشکیل می‌گردد. در صورت وجود پلی‌مورفیسم PLA_2 یک سایت جدید برای آنزیم ایجاد می‌گردد و سه قطعه ۱۷۳، ۴۲ و ۴۹ جفت بازی تشکیل می‌گردد.

تجزیه وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. از آمار توصیفی برای بیان ویژگی‌های عمومی بیماران استفاده گردید. معنی‌دار بودن تفاوت بین بیماران و گروه شاهد از نظر توزیع پلی‌مرفیسم‌های هموزیگوت با استفاده از آزمون مجذور کای بررسی گردید و P کمتر از ۵٪ معنی‌دار در نظر گرفته شد. و برای بیان شدت همراهی بین پلی‌مورفیسم‌ها و VTE از Odds Ratio استفاده شد.

نتایج

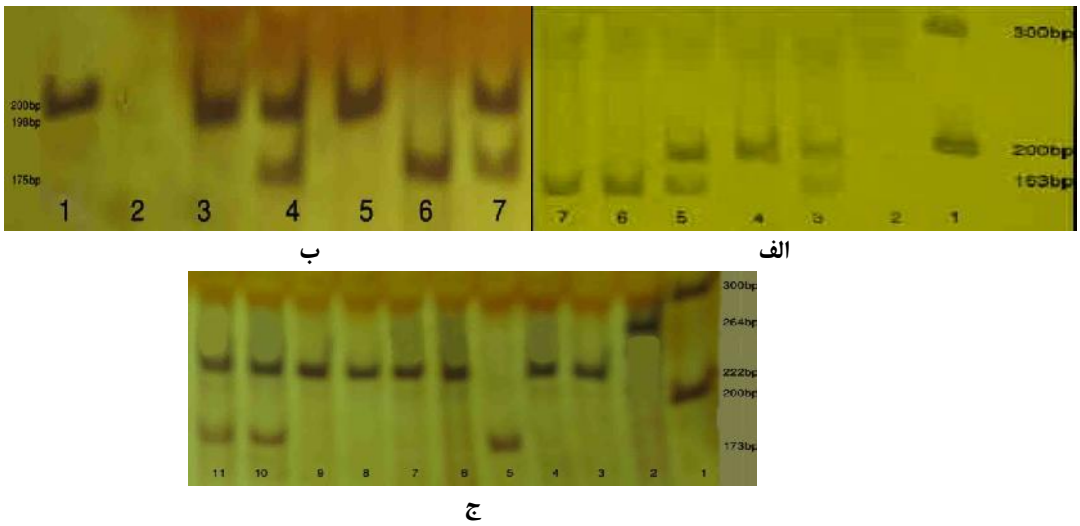
ویژگی‌های عمومی بیماران: از ۷۲ بیمار مورد مطالعه، ۳۷ بیمار PE و ۳۵ بیمار DVT تشخیص داده شدند. میانگین سن بیماران ۱۸/۵۹±۵۲/۱۲ و گروه شاهد ۲۰/۳۵±۵۱/۴۳ سال بدون تفاوت معنی‌دار بود. همچنین، ۴۰/۲۷٪ بیماران مورد مطالعه مرد و ۵۹/۷۳٪ زن بودند، اما تفاوت معنی‌داری بین سن مردان و زنان وجود نداشت. جدول ۲ ویژگی‌های عمومی بیماران را نشان می‌دهد.

جدول ۲- ویژگی‌های عمومی بیماران مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی مورد مطالعه

	بیمار	شاهد
تعداد	۷۲	۳۰۶
میانگین سن و SD (سال)	۱۸/۵۹±۵۲/۱۲	۲۰/۳۵±۵۱/۴۳
جنس		
مرد	۲۹ (٪۴۰/۲۷)	۱۳۰ (۴۲/۴۸)
زن	۴۳(٪۵۹/۷۳)	۱۷۶ (۵۷/۴۷)
نوع بیماری		
PE	۳۷ (٪۵۱/۳۹)	
DVT	۳۵ (۴۸/۶۱)	

پلی‌مورفیسم‌های هموزیگوت و هتروزیگوت در بیماران: از ۷۲ بیمار مورد مطالعه ۱۶/۶۶٪ و از گروه شاهد ۴/۹۰٪ دارای جهش‌های هموزیگوت از پلی‌مرفیسم‌های مورد مطالعه بودند (p=۰/۰۰۴، جدول ۳). FVL در ۴ بیمار (٪۵/۵۴)، MTHFR C677T در ۳۲ مورد (٪۴۴/۴۴) و PLA_2 در ۲۰ بیمار (٪۲۷/۷۷) دیده شد. جدول ۴ هر یک از پلی‌مورفیسم‌های هموزیگوت و هتروزیگوت را در بیماران و گروه شاهد مقایسه می‌کند. در شکل ۱ نمونه‌ای

از تصویر محصولات PCR-RFLP بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪ جهت بررسی جهش FVL، MTHFRC677T و PLA_2 دیده می‌شود.



شکل ۱- محصولات PCR-RFLP بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪ جهت بررسی جهش‌های مورد مطالعه . الف- جهش FVL: باند ۱ مارکر، باند ۴ جهش FVL به صورت هموزیگوت، باند ۳ و ۵ جهش FVL به صورت هتروزیگوت، ۶ و ۷ بدون جهش ب- جهش MTHFRC677T. باند ۱ مارکر، باند ۶ جهش به صورت هموزیگوت، باند ۴ و ۷ جهش MTHFRC677T به صورت هتروزیگوت، باند ۳و ۵ بدون جهش ج- پلی‌مرفیسم PLA1/A2. باند ۱ مارکر، باند۲ فراورده PCR ، باند ۵ هموزیگوت PLA2، باند ۱۰، ۱۱ هتروزیگوت PLA1/A2 ، سایر باندها PLA1

هموزیگوت جهش FVL در بیماران ۲/۷۷٪ و در گروه شاهد ۰/۳۳٪ بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود (p=۰/۰۹). ۱۱/۱۱٪ از بیماران در مقایسه با ۳/۹۲٪ از گروه شاهد هموزیگوت MTHFR C677T بودند (OR =۳/۰۶ و ۹۵٪ محدوده اطمینان ۷/۸۴-۱/۲۳). در هتروزیگوت این پلی‌مورفیسم تفاوت چشم‌گیری بین بیماران و گروه شاهد وجود نداشت. هموزیگوت پلی‌مورفیسم PLA_2 در (۸/۳٪) ۶ بیمار از ۷۲ بیمار مشاهده گردید و این میزان در گروه شاهد ۰/۶۵٪ بود (p=۰/۰۰۱). هتروزیگوت این پلی‌مورفیسم نیز در بیماران به صورت معنی‌داری بیش از شاهد بود، هر چند این تفاوت به میزان تفاوت موجود در حالت هتروزیگوت نبود. همان‌گونه که جدول ۴ نشان می‌دهد، شیوع این پلی‌مورفیسم به صورت هموزیگوت در بیماران ۱۲/۸ برابر شاهد بود اما در هتروزیگوت تقریباً ۲ برابر بود.

جدول ۳- مقایسه فراوانی تعداد جهش های هموزیگوت در بیماران مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی و گروه شاهد

گروه‌ها / جهش‌های هموزیگوت	بیمار تعداد (درصد)	شاهد تعداد (درصد)	جمع تعداد (درصد)
دارد	۱۲ (۱۶/۶۶)	۱۵ (۴/۹۰)	۲۷ (۷/۱۴)
ندارد	۶۰ (۸۳/۳۴)	۲۹۱ (۹۵/۱۰)	۲۵۱ (۹۲/۸۶)
جمع	۷۲ (۱۰۰)	۳۰۶ (۱۰۰)	۳۷۸ (۱۰۰)

آزمون آماری X^2، p=۰/۰۰۴

در دو بیمار، یک مورد PE و یک مورد DVT هموزیگوت دوگانه FVL و MTHFR C677T وجود داشت، در حالی‌که موردی از آن در شاهد دیده نشد. هیچ موردی از هموزیگوت سه‌گانه در بیماران و شاهد وجود نداشت.

جدول ۴- توزیع پلی‌مورفیسم های هموزیگوت و هتروزیگوت در بیماران مبتلا به ترومبوآمبولی وریدی

نوع پلی مورفیسم	پلی مورفیسم	هتروزیگوت		هموزیگوت	
		بیمار n=۷۲ تعداد (درصد)	شاهد n=۳۰۶ تعداد (درصد)	بیمار n=۷۲ تعداد (درصد)	شاهد n=۳۰۶ تعداد (درصد)
FVL*	دارد	۲ (۲/۷۷)	۶ (۱/۹۵)	۲ (۲/۷۷)	۱ (۰/۳۳)
	ندارد	۷۰ (۹۷/۲۳)	۳۰۰ (۹۸/۰۵)	۷۰ (۹۷/۲۳)	۳۰۵ (۹۹/۶۷)
	فاصله اطمینان ٪۹۵ (OR)	۷/۲۳ – ۰/۲۸ (۱/۴۲)		۶۷/۴۶ - ۰/۷۸ (۸/۷)	
	ارزش P	۰/۶۵		۰/۰۹	
MTHFR C677T**	دارد	۲۴ (۳۳/۳۳)	۹۸ (۳۲/۰۳)	۸ (۱۱/۱۱)	۱۲ (۳/۹۲)
	ندارد	۴۸ (۶۶/۶۷)	۲۰۸ (۶۷/۹۷)	۶۴ (۸۸/۸۹)	۲۹۴ (۹۶/۰۸)
	فاصله اطمینان ٪۹۵ (OR)	۱/۸۳ – ۰/۶۲ (۱/۰۶)		۷/۸۴ – ۱/۲۳ (۳/۰۶)	
	ارزش P	۰/۸۶		۰/۰۳	
PLA2***	دارد	۱۴ (۱۹/۴۴)	۲۹ (۹/۴۷)	۶ (۸/۳۳)	۲ (۰/۶۵)
	ندارد	۵۸ (۸۰/۵۶)	۲۷۷ (۹۰/۵۳)	۶۶ (۹۱/۶۳)	۳۰۴ (۹۹/۳۵)
	فاصله اطمینان ٪۹۵ (OR)	۴/۶۳ – ۱/۱۵ (۲/۳۱)		۶۹/۶۸ – ۲/۷۳ (۱۳/۸۱)	
	ارزش P	۰/۰۲		۰/۰۰۱	

آزمون آماری مجذور کای، *: FVL: فاکتور ۵ لیدن، **: THFR C677T: پلی مورفیسم C677T از متیلن تترا هیدرو فولات، ***: PLA_2: پلی‌مورفیسم PLA_2 از گلیکوپروتئین IIb/IIIa پلاکتی

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد که VTE با تعداد پلی‌مورفیسم‌های ترومبوفیلی هموزیگوت ارتباط دارد و بعضی از پلی‌مورفیسم‌های شناخته شده ترومبوفیلی به صورت هموزیگوت خطر VTE را افزایش می‌دهند، در حالی‌که موارد دیگری از آن‌ها تأثیری بر افزایش خطر ندارند. در بیماران مورد مطالعه، بیشترین شیوع پلی‌مورفیسم هموزیگوت در MTHFR C677T (٪۱۱/۱۱) مشاهده گردید. احتمال همراهی بین این پلی‌مرفیسم و بیماری با توجه به OR، ۳/۰۶ مشخص می‌گردد. این پلی‌مورفیسم در همه جمعیت‌ها پراکنده است و در بعضی نژادها شیوع بیشتری نسبت به سایرین دارد [۱۳-۱۲]. هموزیگوت این پلی‌مورفیسم در گروه شاهد ما ٪۳/۹ بود که تا حدی کمتر از گزارش‌های موجود از کشورهای اروپایی و نیز استرالیا است [۱۶-۱۵]. این یافته که فراوانی پلی‌مورفیسم به صورت هموزیگوت در بیماران به صورت معنی‌داری بیش از شاهد است از یافته‌های Ivanov و همکاران که فراوانی پلی‌مورفیسم را در بیماران کمتر از

شاهد یافتند متفاوت است [۱۴]، با این حال در مطالعه Pecheniuk و همکاران، هموزیگوت ۱۰٪ در بیماران گزارش شده است و همراه با افزایش خطر ترومبوز بوده است [۱۶]. وجود این پلی‌مورفیسم باعث افزایش سطح پلاسمایی هموسیستئین می‌گردد و این افزایش ممکن است اثر بیماری‌زایی در ترومبوز شریانی و وریدی داشته باشد [۱۸-۱۷]. Kokturk و همکاران افزایش سطح هموسیستئین پلاسما را در بیماران گزارش کرده‌اند به طوری که ۴/۸ برابر خطر VTE را افزایش داده است [۱۷]. افزایش هموسیستئین همچنین، به عنوان نشانه‌ای از استرس اکسیدان سیستمیک یا اندوتلیایی که باعث فعال شدن پلاکت می‌گردد، بیان شده است [۱۹].

شیوع هموزیگوت FVL نیز در بیماران بیش از شاهد بود (۲/۷۷٪ در برابر ۰/۳۲٪)، هرچند این تفاوت معنی‌دار نبود. مطالعات مختلف نقش جهش FVL را در VTE بررسی کرده‌اند و فراوانی متفاوتی از آن در جمعیت‌های مختلف گزارش شده است [۲۱-۲۰، ۱۳]. Coppola و همکاران، هموزیگوت فاکتور ۵ لیدن را همراه با خطر بالاتری از ترومبوز یافتند، در حالی‌که هتروزیگوت آن همراه با خطر کمتر بود [۲۲]. در مطالعه انجام شده در ترکیه، ارتباط معنی‌داری با ترومبوز داشته است [۲۳]، اما در جمعیت چینی/تایوانی جهش FVL همراه با VTE نبوده است که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد [۱۳]. چنین تفاوت‌هایی بین مطالعات مختلف نه تنها مرتبط با ریشه‌های نژادی است بلکه می‌تواند با فاکتورهای خطرزای محیطی که بر کلیه افراد جامعه از جمله افراد بدون این پلی‌مورفیسم‌ها اثر می‌گذارد و شرایط ترومبوز را فراهم می‌کند نیز ارتباط داشته باشد.

پلی‌مورفیسم PLA_2 ارتباط قوی با افزایش خطر VTE در بیماران مورد مطالعه‌ی حاضر داشت. هر چند شیوع آن هم به صورت هموزیگوت و هم به صورت هتروزیگوت به صورت معنی‌داری بیش از شاهد بود، اما هموزیگوت آن به مراتب بسیار بیشتر از هتروزیگوت بود که نتایج شدت همراهی بین هموزیگوت این پلی‌مرفیسم و بیماری را نشان می‌دهد (OR=۱۳/۸۱ و ۹۵٪ محدوده اطمینان (۶۹/۶۸-۲/۷۳)). این پلی‌مورفیسم تمایل گیرنده گلیکوپروتئین IIb/IIIa پلاکتی را نسبت به فیبرینوژن بیشتر می‌کند و با توجه به این که فیبرینوژن واسطه تجمع پلاکتی است، خطر ترومبوز افزایش می‌یابد. پیرامون نقش این فاکتور در ترومبوز وریدی گزارش‌های محدودی وجود دارد. با این حال، نقش آن در افزایش خطر ترومبوآمبولی ریوی قبلاً گزارش شده است [۱۴]. نقش پلی‌مورفیسم PLA_2 در ترومبوز شریانی مورد بررسی گسترده‌تری قرار گرفته است [۲۴، ۸-۷].

توارث همزمان بیش از یک عامل ترومبوفیلی می‌تواند در بیماران هموفیلی تمایل به خونریزی را کاهش دهد [۲۵]، اما در VTE خطر ترومبوز را افزایش می‌دهد [۱۴]. ما دو مورد از توارث همزمان هموزیگوت FVL و MTHFRC677T را در بیماران یافتیم، درحالی‌که در شاهد هیچ موردی مشاهده نشد. از آن جایی‌که تعداد بیماران محدود بود، بررسی اهمیت چنین توارث همزمانی امکان‌پذیر نبود.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر نشان داد که پلی‌مورفیسم‌های هموزیگوت PLA_2 وMTHFR C677T همراه با افزایش خطر ترومبوز در شهرکرد بود. چنین بیمارانی ممکن است

نیاز به مدیریت متفاوت از سایر بیماران داشته باشند. آگاهی از وجود چنین فاکتورهای خطرزا می‌تواند در جهت پیشگیری خصوصاً در بستگان این بیماران که ناقل این پلی‌مورفیسم‌ها هستند به کار گرفته شود و فاکتورهای خطرزای اکتسابی کنترل شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی انجام گرفته است که بدین وسیله از پشتیبانی و همکاری ایشان سپاسگزاری می‌گردد.

References

[1] Beckman MG, Hooper WC, Critchley SE, Ortel TL. Venous thromboembolism: a public health concern. *Am J Prev Med* 2010 38(4 Suppl): S495-501.

[2] Klok FA, Cohn DM, Middeldorp S, Scharloo M, Buller HR, van Kralingen KW, et al. Quality of life after pulmonary embolism: validation of the PEmb-QoL Questionnaire. *J Thromb Haemost* 2010; 8(3): 523-32.

[3] Bauer KA, Rosendaal FR, Heit JA. Hypercoagulability: too many tests, too much conflicting data. *Hematology Am Soc Hematol Educ Progrm* 2002; 353-68.

[4] Fermo I, Dangelo SV, Paroni R, Mazzola G, Calori G, Dangelo A. prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in patients with early-onset venous and arterial occlusive disease. *Annals of Internal Medicine* 1995; 123(10): 747-52.

[5] Bezemer ID, Doggen CJM, Vos HL, Rosendaal FR. No association between the common MTHFR 677C -> T polymorphism and venous thrombosis - Results from the MEGA study. *Arch Intern Med* 2007; 167(5): 497-501.

[6] Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PlA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(4): 1142-7.

[7] Saidi S, Mahjoub T, Slamia LB, Ammou SB, Al-Subaie AM, Almawi WY. Association of human platelet alloantigen 1 through 5 polymorphisms with ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2008; 25(1-2): 81-6.

[8] Saidi S, Mahjoub T, Slamia LB, Ammou SB, Al-Subaie AM, Almawi WY. Polymorphisms of the human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-4 in ischemic stroke. *Am J Hematol* 2008; 83(7): 570-3.

[9] Pellitero S, Reverter JL, Tassies D, Pizarro E, Monteagudo J, Salinas I, et al. Polymorphisms in platelet glycoproteins Ia and IIIa are associated with arterial thrombosis and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes. *Thromb Haemost* 2010; 103(3): 630-7.

[10] Syros G, Mehran R, Weisz G, Kittas C, Moses JW, Leon M, et al. Role of PLA2 polymorphism on clinical events after percutaneous coronary intervention. Acute Card Care 2009; 11(2): 88-91.

[11] Dalen JE. Should patients with venous thromboembolism be screened for thrombophilia? *Am J Med* 2008; 121(6): 458-63.

[12] Rosendaal FR, Reitsma PH. Genetics of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 301-4.

[13] Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism A meta-analysis involving similar to 120000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost* 2009; 102(2): 360-70.

[14] Ivanov P, Komsa-Penkova R, Kovacheva K, Ivanov Y, Stoyanova A, Ivanov I, et al. Impact of thrombophilic genetic factors on pulmonary embolism: Early onset and recurrent incidences. *Lung;'s* 2008; 186(1): 27-36.

[15] Said JM, Brennecke SP, Moses EK, Walker SP, Monagle PT, Campbell J, et al. The prevalence of inherited thrombophilic polymorphisms in an asymptomatic Australian antenatal population. *Aust N Z J Obster Gynaecol* 2008; 48(6): 536-41.

[16] Pecheniuk NM, Marsh NA, Walsh TP. Multiple analysis of three common genetic alterations associated with thrombophilia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11(2): 183-9.

[17] Kokturk N, Kanbay A, Aydogdu M, Ozyilmaz E, Bukan N, Ekim N. Hyperhomocysteinemia prevalence among patients with venous thromboembolism. *Clin Appl Thromb Hemost* 2011; 17(5): 487-93.

[18] Kamat GV, Metgud SC, Pattanshetti VM, Godhi AS. A Cross-Sectional Study to Detect the Prevalence of Hyperhomocysteinemia in Cases of Deep Vein Thrombosis. *Indian J Surg* 2010; 72(4): 323-6.

[19] Hoffman M. Hypothesis: Hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. *Med Hypotheses* 2011; 77(6): 1088-93.

[20] Biswas A, Bajaj J, Ranjan R, Meena A, Akhter MS, Yadav BK, et al. Factor V Leiden: is it the chief contributor to activated protein C resistance in Asian-Indian patients with deep vein thrombosis? *Clin Chim Acta* 2008; 392(1-2):21-4.

[21] Rahimi Z, Mozafari H, Shahriari-Ahmadi A, Alimogaddam K, Ghavamzadeh A, Aznab M, et al. Deep venous thrombosis and thrombophilic mutations in western Iran: association with factor V Leiden. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010; 21(5): 385-8.

[22] Coppola A, Tufano A ,Cerbone AM, Di Minno G. Inherited Thrombophilia: Implications for Prevention and Treatment of Venous Thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35(7): 683-94.

[23]. Dolek B, Eraslan S, Eroglu S, Kesim BE, Ulutin T, Yalciner A, et al. Molecular analysis of factor V Leiden, factor V Hong Kong, factor II G20210A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T, and A1298C mutations related to Turkish thrombosis patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2007; 13(4): 435-8.

[24] Galasso G, Santulli G, Piscione F, De Rosa R, Trimarco V, Piccolo R, et al. The GPIIIA PlA2 polymorphism is associated with an increased risk of cardiovascular adverse events. *BMC Cardiovasc Disord* 2010; 10:41.

[25] Kurnik K, Kreuz W, Horneff S, During C, Schobess R, Bidlingmaier C, et al. Effects of the factor V G1691A mutation and the factor II G20210A variant on the clinical expression of severe hemophilia A in children--results of a multicenter studys. *Haematologica* 2007; 92(7): 982-5.

Association between homozygous Methylene Tetrahydrofolate Reductase and Platelet PLA2 Antigen Polymorphisms with Venous Thromboembolism (VTE) in Shahrekord

B. Pourgheysari[12], A. Hasheminia[3], H. Rouhi-Boroujeni[3]

Received: 20/02/2014 Sent for Revision: 22/01/2014 Received Revised Manuscript: 09/10/2012 Accepted: 28/07/2012

Background and Objective: Venous thromboembolism (VTE) is one of the main causes of mortality in different human communities. Factor V Leiden, MTHFR C677T polymorphism and PLA_2 polymorphism of platelet glycoprotein IIb/IIIa are important inheritance risk factors of VTE. As limited data of homozygous factors exists, the aim of the study was to investigate the association between homozygous polymorphisms and VTE in Shahrekord.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, EDTA venous blood was taken from 72 patients with venous thromboembolism referred to Shahrekord Hajar Hospital, and 306 age and sex matched healthy volunteers. Genotyping of factor V Leiden, MTHFR C677T and PLA_2 polymorphisms was done by PCR-RFLP. Statistical analysis was done using descriptive statistics and χ^2 test.

Results: There was a significant difference between patients and controls in the number of homozygous polymorphisms with the frequency of 16.77% and 4.90%, respectively (P=0.004). Homozygous FVL was more prevalent in patients than controls, but the difference was not significant. A significant difference was observed in the frequency of homozygous MTHFR C677T and PLA_2 polymorphisms between the patients and controls (P=0.03 and P=0.001, respectively). The difference was not significant in the frequency of heterozygous polymorphisms except for PLA_2.

Conclusion: The results of the study show the association between homozygous MTHFR and PLA2 thrombophilia polymorphisms and VTE in Shahrekord. Acquired risk factors may need to be controlled in homozygous carriers of these polymorphisms. Homozygous VTE carriers may need to be managed differently than other patients.

Key words: Venous thromboembolism, Factor V Leiden, Methylene tetrahydrofolate reductase, PLA_2 polymorphism, Homozygote

Funding: This work was funded by Shahrekord University of Medical Sciences (Deputy of Research)

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: Ethical permission was obtained from the Shahrekord University of Medical Sciences Ethics Committee

How to cite this article: Pourgheysari B, Hasheminia A, Rouhi-Boroujeni H. Association between homozygous Methylene Tetrahydrofolate Reductase and Platelet PLA2 Antigen Polymorphisms with Venous Thromboembolism (VTE) in Shahrekord *J RafsanjanUniv Med Sci* 2014; 13(2): 183-92. [Farsi]

1- Associate Prof., Dept. of Pathology and Hematology Cellular and Molecular Research Centre, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
(Corresponding Author): Tel: 0391- 5228397, Fax: 03915228497, Email: hadavimaryam@yahoo.com
2- Academic Member Dept. of Nursing, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
3- Associate Prof., Dept. of Internal Medicine, Clinical Biochemistry Research Centre, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran