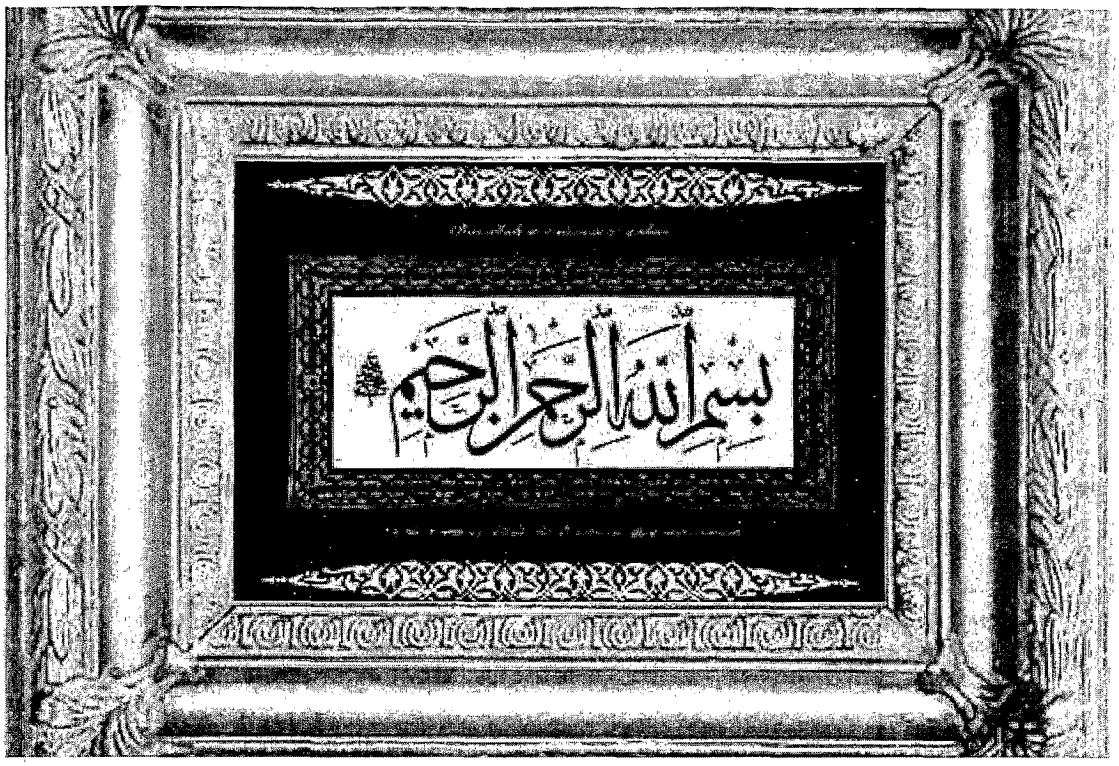

9.822

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد

خونشناسی و بانک خون

عنوان پایان نامه:

بررسی شیوع پلی مرفیسم FXIIIVal34Leu در زیر واحد A فاکتور XIII انعقادی در بیماران ترومبوتیک مراجعه کننده به بخش انعقاد سازمان انتقال خون ایران

۱۳۸۶/۱۲/۲۳

استاد راهنما :

جناب آقای شهرام سمیعی

استاد مشاور:

دکتر مریم خیر اندیش

نگارش:

سید مهدی سجادی

سال تحصیلی ۸۶-۸۵

صوفی از پرتو می راز نهانی دانست　　گوهر هرکس ازین لعل توانی دانست
قدر مجموعهٔ گل مرغ سحر داند و بس　　که نه هرگو ورقی خواند معانی دانست

حمد و سپاس پروردگار احساس که عطایم فرمود زندگانی را.

می ستایم او را که پنجره ای نوین به جهان در پیش رویم گشود و طی طریق در مسیر معرفتش را توفیقم نمود. در گذر از این راه، همراهانی داشتم بس گرانقدر و گرانمایه که بر من فرض است سپاسگذاری از ایشان.

پدر و مادر عزیزم که در واژه های کتاب معرفت اند و امید من برای ادامه این راه.

اساتید فرزانه و دانشمندی که سعادت تلمذ در محضرشان نصیبم گردید و مرا در این مسیر راهنما و مشاور بودند: جناب آقای دکتر شهرام سمیعی و سرکار خانم دکتر مریم خیر اندیش.

همکاران گرامی ام در بخش کیت سازی: خانمها عطایی، کواری،توسلی،عبداللهی و طوطیان.

دوستان نیکم در دوره تحصیل: آقایان طباطبایی، یوسفیان، گودرزی، احمدی و خانم مدنی.

معاونت محترم آموزش جناب آقای دکتر قره باغیان و کلیه همکاران ارجمند این مجموعه.

سرکار خانم دکتر احمدی نژاد و سایر پرسنل صمیمی بخش انعقاد.

پرسنل محترم کتابخانه: خانمها دهقان و مختاری

و نیز تمامی دوستانی که در طول این سالها دست یاریشان را از من دریغ نکردند.

تقدیم به:

پدر و مادر عزیز

و

خواهران و برادران مهربانم

فهرست

چکیده تحقیق..... ۱
۱- دلایل انتخاب موضوع..... ۳
۲- بیان مساله..... ۴
۳- بازنگری منابع و اطلاعات ۶
۱-۳- تاریخچه کلمات کلیدی..... ۶
الف-۱-۳- FXIII A..... ۶
ب-۱-۳- پلیمرفیسم FXIIIAVal34Leu ۷
ج-۱-۳- PCR – RFLP..... ۸
۲-۳- بررسی مقالات..... ۱۲
۴- هدف کلی، اهداف اختصاصی..... ۲۰
۵- متغیرهای تحقیق، ابزار و مقیاس سنجش..... ۲۱
٦- جامعه مورد بررسی، تعداد نمونه ها و روش نمونه گیری..... ۲۳
۷- نوع مطالعه، تکنیک و نحوه اجرای تحقیق..... ۲۴
۱-۷- ارزیابی پارامترهای مورد بررسی..... ۲۴
۱-۱-۷- ارزیابی آنتی ترومبین III..... ۲۴
۲-۱-۷- ارزیابی پروتئین C ۲۵
۳-۱-۷- ارزیابی پروتئین S ۲۶
۴-۱-۷- ارزیابی APCR ۲۷
۲-۷- مواد مورد نیاز برای PCR ۲۸
۱-۲-۷- آب DEPC ۲۸
۲-۲-۷- روغن معدنی (Din Oil)..... ۲۸
۳-۲-۷- آنزیم Taq polymerase ۲۸
۴-۲-۷- Master mix ۲۸
۵-۲-۷- Super mix ۲۹

۳-۷- مواد مورد نیاز برای الکتروفورز..... ۲۹
۱-۳-۷- بافر TBE 10 X..... ۲۹
۲-۳-۷- اتیدیوم بروماید..... ۲۹
۳-۳-۷- ژل آگاروز..... ۲۹
۴-۷- استخراج DNA ۳۰
۵-۷- واکنش PCR ۳۱
۷-۷- روش انجام آزمایش RFLP of FXIIIAVal34Leu ۳۳
۸-۷- الکتروفورز محصولات FXIIIA Val34Leu PCR قبل از RFLP ۳۳
۹-۷- الکتروفورز محصولات FXIIIA Val34Leu PCR بعد از RFLP..... ۳۴
۸- یافته ها..... ۳۶
۹- بحث... ..... ۴۴
ضمیمه..... ۵۰
فهرست منابع..... ۵۲
چکیده انگلیسی..... ۵۶

چکیده تحقیق

مقدمه : فاکتور XIII انعقادی خون یک ترانس گلوتامیناز با ساختاری تترامریک است که از دو زیرواحد پیش آنزیمی مشابه(FXIIIA) و دو زیرواحد پروتئینی ناقل(FXIIIB) تشکیل شده است. پلیمرفیسم شایع G به T که منجر به جایگزینی Val به Leu در فاصله ۳ آمینواسیدی جایگاه فعال شدن ترومبین (Arg37-Gly38) می شود در زیرواحد A رخ می دهد. نقش محافظتی پلیمرفیسم FXIII Val34Leu در مقابل انفارکتوس میوکارد و ترومبوز وریدی مورد بحث میباشد. حضور این پلیمرفیسم کارایی درمان ترومبولیتیک را کاهش می دهد. همچنین همراهی Leu34 با موتاسیون فاکتور II (G20210) سبب افزایش خطر ابتلا به انفارکتوس میوکارد میشود. تا کنون گزارشی از شیوع این پلیمرفیسم در جمعیت ایرانی ارایه نشده است. در این مطالعه شیوع پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu با استفاده از روش PCR-RFLP در جمعیت بیماران ترومبوتیک ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: مطالعه انجام شده از نوع توصیفی می باشد. تعداد ۲۱۳ بیمار با اختلالات ترومبوتیک مراجعه کننده به بخش انعقاد سازمان انتقال خون ایران(تهران) در فاصله زمانی سالهای ۱۳۸٤-۱۳۸۱ و ۱۰۰ نفر اهداکننده سالم به عنوان گروه شاهد در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج DNA با استفاده از کیت Roche و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بوسیله ترموسایکلر Techne انجام شد. سپس ژنوتیپ های این پلیمرفیسم با تکنیک RFLP و در حضور آنزیم محدود کننده CfoI شناسایی گردید. آنالیز آماری یافته های بدست آمده با نرم آفزار ۱۱/۵ SPSS انجام و ضریب اطمینان در کلیه محاسبات ۹۵٪ بوده و p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: شیوع پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu در بیماران ۲۴/۴٪ و در گروه شاهد ۳۷٪ بدست آمد. بین شیوع این پلیمرفیسم و جنس ارتباط معنی داری دیده نشد(P=۰/۴۱۶)، اما بین فراوانی این پلیمرفیسم و بی حرکتی (P =۰/۰۱٤) و نیز با میانگین مقادیر پروتئین های C و S ارتباط معنی داری وجود داشت(P=۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: شیوع پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu در نژادهای مختلف متفاوت است و بدین وسیله می توان نقش آنرا در رابطه با بیماریهای ترومبوتیک مورد ارزیابی قرار داد. به دلیل ارتباط معنی دار این پلیمرفیسم با بی حرکتی و کاهش مقادیر میانگین پروتئین های C و S میتوان احتمال داد که حضور همزمان آن با این فاکتورهای خطر همچون حضور توام آن با G20210A سبب تمایل بیشتر جهت ابتلا به ترومبوز میشود.

کلمات کلیدی: پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu، بیماریهای ترومبوتیک،PCR-RFLP

۱- دلایل انتخاب موضوع

با انجام این تحقیق به این سوال علمی پاسخ داده می شود که شیوع پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu در بیماران ترومبوتیک مراجعه کننده به بخش انعقاد سازمان انتقال خون ایران(تهران) به چه میزان می باشد و آیا بین آن و برخی از فاکتورهای خطر ابتلا به ترومبوز ارتباطی وجود دارد یا خیر، تا بر اساس نتایج آن امکان بررسی بیشتر در مورد اثر محافظتی یا ترومبوژنیک این پلیمرفیسم فراهم شده، شناسایی افرادیکه در معرض خطر ابتلا به ترومبوز قرار دارند مقدور گردد.

با وجود اینکه این پلیمرفیسم در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است و مطالعه بر روی جنبه های مختلف مولکولی و بالینی آن در مراکز ترومبوفیلیای دنیا صورت میگیرد ولی تاکنون در ایران مطالعه ای جهت بررسی آن انجام نشده است.

این پژوهش ضمن بررسی شیوع این پلیمرفیسم به روش مولکولی می تواند آغازی برای پژوهش های بیشتر در آینده باشد.

۲- بیان مساله

فاکتور XIII انعقادی خون یک پرو ترانس گلوتامیناز با ساختاری تترامریک است که از دو زیرواحد کاتالیتیکی(FXIIIA) و دو زیرواحد پروتئینی ناقل(FXIIIB) تشکیل شده است(۱). فاکتور XIII فعال برای حفظ هموستاز ضروری است(۲) و بعلاوه در بهبود زخم، مهاجرت سلولی و در هم کشیدگی لخته (clot retraction) (۳) نقش دارد و نقایص آن با عوارض خونریزی دهنده بعد از عمل جراحی یا تروما، عدم بهبود زخم و خطر سقط جنین همراه میباشد(٤). چهار نوع پلیمرفیسم شایع از فاکتور XIII وجود دارند که ناشی از تغییرات آمینواسیدی در Val34Leu ، Pro564Leu ، Val650Ile و Glu651Gln میباشند(۳). پلیمرفیسم دیگری تحت عنوان Tyr204Phe نیز شناخته شده است(۵). در میان این پلیمرفیسم ها، پلیمرفیسم FXIII Val34Leu مهمترین نقش را در فعالیت فاکتور XIII دارد(٦). شیوع آلل موتانتLeu34 در میان افراد سالم از ٤٤٪-۳٪ ٪ متغیر است. همچنین ارتباط معنی داری بین شیوع آلل و نژادهای مختلف وجود دارد. سیاهپوستان و قفقازی ها بطور مشابه شیوع بالایی از آلل را نشان میدهند، بدین صورت که شیوع آن در قفقازی ها ٤٤/۳٪ و در سیاهپوستان ۲۸/۹٪ میباشد درحالیکه این میزان در آسیایی ها بطور مشخصی کمتر است. ژاپنی ها میزان کمتری را نسبت مردم ترکیه دارا هستند(۱ و ۷). در سفیدپوستان نیز شیوع آن ۳۰٪-۲۵٪گزارش شده است(۸).

اولین بار Board در سال ۱۹۹٤ پلیمرفیسم های ژنتیکی فاکتور XIII از جمله پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu را گزارش کرد(۱).

پلیمرفیسم شایع G به T منجر به جایگزینی Val توسط Leu در فاصله ۳ آمینواسیدی جایگاه فعال شدن ترومبین(Arg37-Gly38) در زیرواحد A میشود(۳-۱و۱۳-۹). ترومبین پلیمرفیسم

Val34Leu از فاکتور XIII را 2.5 برابر سریعتر از تایپ وحشی Val34 فعال میکند(۸و۱٤). این فعال شدن سریعتر ناشی از اتصالات متقاطع سریعتر فیبرینی و تفاوتهای ساختاری بدست آمده با روشهای فیزیکی و میکروسکوپ الکترونی است(۲). این پلیمرفیسم بر میزان پلاسمایی و فعالیت اختصاصی ترانس گلوتامینازی فاکتور FXIIIA تاثیری ندارد(۲و۱٤) بلکه رهاسازی پپتید فعال سازی را با واسطه ترومبین از پروتئین پلاسمایی جهش یافته بطور چشمگیری تسریع میکند و بدین ترتیب فعال شدن آلل Leu فاکتور XIII پلاسمایی با سرعت بیشتری رخ میدهد(۲ و ۱۵). سرعت بیشتر فعال شدن فاکتور XIII میتواند سبب اتصال متقاطع غیر موثر شده و یا اینکه به دلیل تاثیرات FXIIIA بر دیگر پروتئین ها موجب برهم خوردن کینتیک واکنشهای اتصالی شود(۱۳). هموزیگوت بودن، فعالیت بیشتری را موجب میشود در حالیکه ناقلین هتروزیگوت فعالیت آنزیمی حدواسطی را نشان می دهند(۱۵و۱٦) بطوریکه در واریان Leu34 فاز Lag بین تشکیل فیبرین و جداشدن FXIIIA بطور مشخصی کوتاهتر از واریان Val34 میباشد(۱۷). شیوع این پلیمرفیسم دارای ناهمگونی نژادی گسترده ای است و بسته به گروههای مورد مطالعه و روشهای بکار رفته متفاوت است(۱۸).

با وجود اینکه پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است و مطالعه بر روی جنبه های مختلف مولکولی و بالینی آن در مراکز ترومبوفیلیای دنیا صورت میگیرد ولی تاکنون در ایران مطالعه ای جهت بررسی آن انجام نشده است. هدف این تحقیق بررسی پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu با استفاده از روش های واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR) و پلیمرفیسم طولی قطعه محدود شونده(RFLP) و تعیین شیوع آن در بیماران ترومبوتیک مراجعه کننده به بخش انعقاد سازمان انتقال خون ایران(تهران) می باشد. نتایج این تحقیق می تواند به عنوان پایه ای برای مطالعات آینده بکار رود.

۳- بازنگری منابع و اطلاعات

۱-۳- تاریخچه کلمات کلیدی:

الف-۱-۳-FXIII A :

فاکتور XIII یک ترانس گلوتامیناز (TGase) پلاسمایی است. ترانس گلوتامینازها دست کم شامل ۸ آنزیم هستند که تعدادی از پروتئین ها را به یکدیگر متصل می کنند. این نوع واکنش نه تنها اعمال اصلی پروتئین های سوبسترایی را تقویت می کند بلکه اعمال جدیدی را به آنها را اعطا می نماید. فاکتور XIII پلاسمایی تترامر بوده(A2B2) و زیرواحد A حاوی جایگاه فعال می باشد(۱۹) در حالیکه FXIIIB وظیفه حفاظت از FXIIIA در مقابل پروتئولیز و استحکام ساختار آنرا به عهده دارد(۱). اگرچه TGase ها هومولوگ هستند اما توالی های نوکلئوتیدی در ناحیه '5 طرفی آنها بطور مشخصی فرق می کند.

ساختار اولیه TGase ها اولین بار در سال ۱۹٦۸ توسط Ichinose و همکارانش از طریق آنالیز تعیین توالی اسید آمینه ای و کلونینگ cDNA ی فاکتور XIII شناسایی شد. ساختمان سه بعدی فاکتور XIII نیز بوسیله مطالعات میکروسکوپ الکترونی مشخص گردید. در این بررسی FXIIIA بصورت یک ذره کروی شکل مشاهده می شود. با کریستالوگرافی اشعه X پنج دومن مجزا از FXIIIA مشخص می گردد:

نواحی پپتید فعال شدن، β ساندویچ، هسته مرکزی،1 barrel و 2 barrel.

سازماندهی ژنی TGase هابرای FXIIIA اولین بار در سال ۱۹۸۸ توسط Ichinose و همکارانش نشان داده شد. ژن FXIIIA ۲۰۰ کیلو باز طول داشته و بر روی کروموزوم ٦ و در ناحیه باندهای P24-25 قرار دارد(۱۹).

کمبود فاکتور XIII اولین بار توسط Duckert و همکارانش در سال ۱۹۶۰ شرح داده شد(۲۰). این کمبود یک اختلال انعقادی اتوزوم مغلوب بسیار نادر با شیوع یک در ۲۰۰۰۰۰۰ نفر می باشد که با تمایل به خونریزی خود بخود و نقص در بهبود زخم مشخص می شود. کمبود فاکتور XIII معمولا" بدلیل نقصی در زیر واحد A رخ می دهد. تشخیص این بیماری بوسیله حلالیت لخته در اوره ۵ مولار و تعیین فقدان آنتی ژن FXIIIA یا فعالیت آنزیمی مربوط به آن صورت می گیرد(۲۱).

ب-۱-۳- پلیمرفیسم FXIIIA Val34Leu :

پلیمرفیسم ژنتیکی FXIIIA اولین بار توسط Board در سال ۱۹۷۹ گزارش گردید(۲۲). چهار نوع پلیمرفیسم شایع از فاکتور XIII وجود دارند که ناشی از تغییرات آمینواسیدی در Val34Leu ، Pro564Leu ، Val650Ile و Glu651Gln میباشند(۳). پلیمرفیسم دیگری تحت عنوان Tyr204Phe نیز شناخته شده است(۲۳). در میان این پلیمرفیسم ها،پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu مهمترین نقش را در فعالیت فاکتور XIII دارد(٦). محققین زیادی در مورد این پلیمرفیسم به مطالعه پرداخته اند. در سال ۱۹۹۹،Catto و همکارانش طی مطالعه ای رابطه پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu را با ترومبوز وریدی بررسی کردند(۱۲).

Balogh و همکارانش در سال ۲۰۰۰، اثر محافظتی این پلیمرفیسم را در ترومبوفیلی خانوادگی مشاهده نکردند(۲).

در سال ۲۰۰۱،Cho و همکاران شیوع این پلیمرفیسم را در کشور کره بدست آورده و ارتباط آنرا با خونریزی داخل مغزی اولیه بررسی کردند(۱).

در سال ۲۰۰۳، وضعیت حضور توام G20210A و Val34Leu به عنوان فاکتور خطری برای ابتلا به انفارکتوس میوکارد توسط Butt و همکارانش انجام شد(۲٤).

در سال ۲۰۰٤ Shemirani و همکارانش در دانشگاه Debresen مجارستان، روش تشخیصی سریع FXIIIVal34Leu را بوسیله Real Time PCR بنا نهادند(۲۵).

تاثیر پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu بر کارایی درمان ترومبولیتیک توسط Vicente در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت(۱۱).

بررسی قدرت پیشگویی کنندگی پلیمرفیسم FXIIIVal34Leu در ابتلا به بیماری کرونری قلب توسط Aleksic و همکارانش در سال ۲۰۰۳ (۲٦)، اثر تعدیل کنندگی آن در خونریزی داخل مغزی اولیه توسط Corral و همکارانش در سال ۲۰۰۱ (۲۷) و نقش آن در انفارکتوس میوکارد در سال ۲۰۰۳ توسط Reiner و همکارانش انجام شد(۲۸).

Wells و همکارانش در یک مطالعه گسترده در سال ۲۰۰٦ اثر محافظتی واریان Val34Leu در مقابل ترومبو امبولی وریدی بصورت Meta Analysis بررسی نمودند(۱۸).

در همین سال Hancer و همکارانش این اثر محافظتی را در مقابل انفارکتوس میوکارد بررسی نموده و آنرا تایید کردند(۱۰).

ج-۱-۳- PCR-RFLP :

روش های متعددی برای شناسایی پلیمرفیسم FXIIIA Val34Leu مورد استفاده قرار گرفته اند. اولین بار در استرالیا، Board در سال ۱۹۷۹ با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل های آگاروز لایه نازک و سپس بوسیله تکنیک فلورسانت اختصاصی ترانس گلوتامیناز، پلیمرفیسم ژنتیکی زیر واحدهای FXIII را در پلاکتها و پلاسما شناسایی کرد(۲۰). در تحقیقات بعدی روش هایی چون

کانونی کردن ایزوالکتریک(Isoelectric Focusing) و تثبیت ایمنی(Immuno Fixation) و ایمونو بلاتینگ برای شناسایی پلیمرفیسم FXIIIA Val34Leu بکار برده شد(۲۲). تکنیک های دیگری نیز برای شناسایی این پلیمرفیسم کاربرد دارند که از آن جمله تکنیک PCR-SSCP (۲۹،۲٦،۱۲،۱) و PCR-RFLP را می توان نام برد.SSCP روش بسیار خوبی است چرا که می تواند پلیمرفیسم های DNA و موتاسیون های نقطه ای را در طیف وسیعی از قطعات DNA شناسایی کند. از آنجاییکه پلیمرفیسم های DNA در هر چند صد نوکلئوتید رخ می دهند،SSCP می تواند مارکرهای ژنتیکی بسیاری را فراهم نماید. تکنیک RFLP رایج تر بوده و دقیقتر است. توالی های نوکلئوتیدی DNA در افراد مختلف یکسان نیستند. جایگزینی های نوکلئوتیدی در هر چند صد جفت باز در ژنوم انسان رخ می دهند. پلیمرفیسم توالی نوکلئوتیدی بصورت پلیمرفیسم طول قطعات حاصل از آنزیم های محدود کننده(RFLP) شناسایی می شود.RFLP در افتراق دو آلل در یک لوکوس کروموزومی بسیار با ارزش است(۳۰). در RFLP مربوط به پلیمرفیسم Val34Leu از آنزیم های محدودکننده مختلفی چون Cfo1 (۲و۳۱)، Hin6I(۱۰و۲۳)، Dde I (۱۵و۲٤)، BstU I (۲۸) و Mse I (۳۲)استفاده شده است. در این پژوهش از آنزیم Cfo1 استفاده شد که سبب ایجاد قطعه ای ۹٤ جفت بازی در نوع Wild type (وحشی) می شود اما در نوع هموزیگوت Leu /Leu محصول ۱۱٤ جفت بازی PCR دست نخورده باقی می ماند، این در حالیست که در نوع هتروزیگوت Val / Leu هر دو محصول دست نخورده PCR و قطعه ۹٤ جفت بازی در ژل آکاروز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید قابل رویت بود.

PCR (Polymerase Chain Reaction) در اواسط دهۀ ۱۹۸۰بوسیله کری مولیس معرفی شد. برای انجام PCR ، DNA پلیمراز، نوکلئوتید تری فسفات و پرایمر لازم است. از آنجاییکه DNA دو رشته ای است، در PCR دو نوع پرایمر مورد نیاز است. این دو پرایمر اولا" محل ژنی را که باید