IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

۱ (۳)، ۲۱۰- ۲۰۱ پاییز ۱۳۹۶

مقاله پژوهشی

تعیین فراوانی آللی و ژنوتایپی ژن VKORC1 در جمعیت شهر بیرجند

فریبا عمادیان رضوی[۱]، اصغرزربان[۲]، فاطمه حجی‌پور[۳]، غلامرضا عنانی سراب[۴]، محسن ناصری[۳*]

۱. گروه پروتز، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند
۲. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند ، بیرجند
۳. مرکز تحقیقات ژنومیک، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند
۴ . دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند

دریافت: ۱۶ آبان ۹۴ پذیرش: ۳۰ آذر ۹۴

چکیده

مقدمه: استفاده از وارفارین به عنوان رایج‌ترین ضد انعقاد خوراکی همواره با محدودیت‌هایی همراه است. اثر این داروی ضد انعقاد به دلیل عوامل فارماکودینامیک، فارماکوکینتیک و خصوصاً عوامل فارماکوژنتیک به طور گسترده‌ای در بین بیماران متغیر است. پلی‌مورفیسم‌های ژن VKORC1 یکی از فاکتورهای ژنتیکی موثر در تعیین دوزاژ این دارو می‌باشد. این تحقیق به منظور عملکرد بهتر در تعیین دوز اختصاصی دارو برای هر فرد و با هدف تعیین فراوانی آللی و ژنوتایپی ژنVKORC1، در شهر بیرجند انجام گرفت.

روش‌ها: ۱۱۵ نفر از افرادی که برای آزمایش‌هایPT وINR به بیمارستان‌های امام رضا(ع) و ولیعصر(عج) شهر بیرجند مراجعه کردند، برای این مطالعه‌ی تجربی انتخاب شدند. پس از استخراج DNAی ژنومیک، تمامی قطعات تکثیر شده‌ی VKORC1، تعیین توالی شده و ژنوتیپ آنها مشخص گردید. آنالیز آماری توسط نرم افزار SPSS صورت گرفت.

یافته‌ها: میانگین سنی بیماران ۱۲/۹ ± ۵۷/۷ سال بود و از این میان ۵۵ نفر زن و ۶۰ نفر مرد بودند. فراوانی ژنوتیپ‌های نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش‌یافته واریانت ۱۶۳۹G>A- از ژن VKORC1 در مردان ۴۰/۳٪، ۳۰/۵٪، ۱۷/۵٪ و در زنان ۵۰٪، ۳۶/۷٪، ۵٪ بدست آمد. برای واریانت ۱۱۷۳C>T فراوانی ژنوتیپ‌های نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش‌یافته در مردان ۳۸/۹٪، ۳۸/۹٪ و ۲۲/۲٪ و در زنان ۵۲/۶٪، ۴۰/۴٪، ۷٪ بودند. دو جهش جدید g.3660G>A و g.3565G>T با فراوانی به ترتیب ۲/۷٪ و ۰/۹٪ در ناحیه پروموتر ۱۶۳۹G>A- مشاهده شد. در نهایت آلل‌های ۱۶۳۹G- و ۱۱۷۳C در جمعیت بیرجند دارای فراوانی بالایی (۶۸/۱٪ و ۶۲/۶٪) بودند.

نتیجه‌گیری: یافته های ما نشان می‌دهد تفاوت‌های قابل توجهی در فراوانی واریانت‌های ژنتیکیVKORC1 در جمعیت شهر بیرجند در مقایسه با سایر نقاط ایران وجود دارد که ناشی از تفاوت‌های قومیتی بوده و در تعیین حساسیت به دارو بسیار تاثیرگذار هستند. با توجه به این تفاوت‌های ژنتیکی، اطلاع از ژنوتیپ بیماران قبل ازشروع درمان با وارفارین به داشتن درمانی دقیق و کارآمد کمک خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی : انعقاد، پلی مورفیسم، دوز بهینه، وارفارین، VKORC1

مقدمه

داروهای خانواده کومارین موجب مهار ساخت فاکتورهای انعقادی وابسته به ویتامین K شده و درنتیجه باعث کاهش احتمال تشکیل لخته خون می‌گردند. وارفارین اصلی‌ترین عضو خانواده کومارین‌ها و پرمصرف‌ترین داروی ضدانعقاد خوراکی جهان است [۱، ۲]. شاخص درمانی (Therapeutic Index) باریک وارفارین از یکطرف و طیف وسیع پاسخ به درمان و دوز مناسب برای هر بیمار از طرف دیگر، خطرات، عوارض و پیامدهای ناگوار درمان با آن را در طی هفته‌ها و ماه‌های اول درمان افزایش می‌دهد. بنابراین مصرف کم یا زیاد وارفارین

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: naseri_m2003@yahoo.com
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

می‌تواند منجر به عوارض مرگ‌آوری نظیر خونریزی یا ترومبوز شود. بررسی‌ها نشان داده سالیانه ۱ نفر از هر ۱۰۰ نفر بیمار مصرف کننده وارفارین دچار خونریزی کشنده می‌شود و تا ۱۵ درصد بیماران نیز عوارض خفیف خونریزی دهنده را تجربه می‌کنند [۳]. بنابر این پایش دقیق وضعیت انعقادی خون با اندازه‌گیری PT (Prothrombin Time) و INR (International Normalized Ratio) (نسبت زمان انعقاد خون بیمار به زمان انعقاد خون استاندارد) تا رسیدن به دوز درمانی مناسب ضروری است. بیمارانی که از داروهای ضدانعقاد استفاده می‌کنند، باید INR آن‌ها حدود ۲ الی ۳ باشد. برای بیمارانی که در معرض خطر تشکیل لخته هستند، نیاز است که INR بالاتر و حدود ۲/۵ تا ۳/۵ باشد. در حقیقت پزشک از INR برای تنظیم دارو استفاده می‌کند تا PT را در محدوده‌ی مناسب برای بیمار قرار دهد [۱].

به دلیل تفاوت‌های فردی مانند سن، رژیم غذایی، مصرف سیگار، وزن و ژنتیک، که مهم‌ترین آنها تفاوت‌های ژنتیکی است، میزان دوز لازم داروی ضد انعقاد برای بیماران مختلف یکسان نیست [۴]. طبق توصیه FDA (Food and Drug Administration) برای شروع درمان با وارفارین انجام تست فارماکوژنتیک برای تنظیم دوز دارو الزامی است [۱].

از عوامل فارماکوژنتیک تاثیرگذار بر تنوع دوز مورد نیاز وارفارین، پلی‌مورفیسم زیر واحد یک ژن سازنده آنزیم (Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1)(VKORC1([MIM608547] به عنوان عامل فارماکودینامیک و پلی‌مورفیسم‌های ژن سیتوکروم (CYP2C9[MIM601130]) به عنوان عامل فارماکوکینتیک می‌باشند [۵]. ژن VKORC1، برروی کروموزوم ۱۶ قرار دارد و دارای بیش از ۵۱۲۶ جفت باز و ۳ منطقه اگزون و ۳ اینترون می‌باشد. این آنزیم مسئول بازگرداندن ویتامین K اپوکسید به ویتامین K هیدروکینون (کوفاکتور اصلی در گاماکربوکسیلاسیون عوامل انعقادی شامل فاکتورهای VII، IX وX) است و از این طریق اثر ضدانعقادی خود را اعمال می‌کند. همچنین مطالعات، ژن VKORC1 را به میزان ۳۷-۶٪ مسئول تنوع در پاسخ به وارفارین در افراد مختلف نشان داده‌اند که دو پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) مؤثر بر دوز مصرفی وارفارین (rs9923231)639G>A– و 1173C>T(rs9934438) می‌باشند [۴، ۶]. پلی‌مورفیسم 1639G>A- در پروموتر و 1173C>T در اینترون یک ژن VKORC1 با کاهش بیان این ژن باعث کاهش دوز لازم و ایجاد حساسیت به وارفارین می‌شوند [۶، ۷]. مطالعات جمعیتی نیز قومیت را عامل مهمی بر دوز نگهدارنده و ایجاد حساسیت به وارفارین نشان داده است، بطوریکه آسیایی‌ها اقوامی با حساسیت بالا و آفریقایی-آمریکایی‌ها با حساسیت کمتری به داروهای کومارینی شناخته شده‌اند. درواقع چون قومیت‌های مختلف فرکانس آللی متفاوتی برای VKORC1دارند، در نتیجه حساسیت‌های فردی متفاوتی به وارفارین در جمعیت های قومی بروز می‌کند [۸].

با توجه به خطرات جبران‌ناپذیر کاهش یا افزایش سطح خونی داروی وارفارین و از طرفی نقش اساسی فاکتورهای ژنتیکی در ایجاد تنوع دوز فردی مورد نیاز این دارو، بررسی فراوانی آللی و ژنوتایپی ژن VKORC1 اطلاعات حیاتی جهت تنظیم بهینه دوز داروی وارفارین در اختیار پزشکان قرار می‌دهد. لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان شیوع پلی‌مورفیسم‌های ناحیه ۱۶۳۹G>A- و ۱۱۳۷C>T ژن VKORC1 در جمعیت شهر بیرجند انجام گرفت تا ضمن تعیین میزان شیوع واریانت‌های ژنتیکی مذکور در این منطقه ارزش عملی این آزمایش نیز بررسی شود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش از نمونه‌های خون سیتراته‌ی ۱۱۵ فرد مراجعه کننده به بیمارستان‌های ولیعصر (عج) و امام رضا (ع) شهرستان بیرجند، طی ۶ ماه اول سال ۱۳۹۳ با درخواست آزمایش PT و INR، جهت تعیین فراوانی آللی و ژنوتایپی ژنVKORC1 استفاده شد. از بیماران مراجعه کننده در ابتدا رضایت نامه کتبی مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بیرجند اخذ شد و با توضیح برای لزوم انجام کار، پرسشنامه اختصاصی طراحی و تکمیل گردید.

ابتدا DNA ژنومیک نمونه‌ها با استفاده از روش‌های دستی (Salting out) از ۲ سی‌سی خون سیتراته، در آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بیرجند استخراج گردید. غلظت نمونه‌ی DNA تخلیص شده‌ی هر فرد توسط دستگاه نانودراپ (BioTek, USAEPOCH Nanodrop Specterophotometer) سنجیده و نمونه‌هایی با غلظت وOD مناسب، برای مراحل بعدی انتخاب شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای ۱۶۳۹G>A- و ۱۱۷۳ C>T

پرایمر	توالی	دمای آنیلینگ
VKORC1 (-۱۶۳۹G>A)	F ۵'– AGTTTGGACTACAGGTGCCT-۳' R ۵'– AGTTTGGACTACAGGTGCCT-۳'	۶۰ درجه
VKORC1 (۱۱۷۳ C>T)	F ۵'– TGACATGGAATCCTGACGTG-۳' R ۵'– GAGCTGACCAAGGGGGAT-۳'	۵۷ درجه

F: Forward; R: Reverse

جهت بررسی و تعیین فراوانی پلی‌مورفیسم‌های ناحیه ۱۶۳۹G>A- پروموتر و 1173C>T واقع در اینترون یک ژنVKORC1، پرایمرهای مربوطه توسط نرم افزار Primer3 طراحی و پس از بلاست و تایید توسط پایگاه NCBI جهت سنتز به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ ذکر شده است.

جهت تعیین فراوانی پلی‌مورفیسم‌های ناحیه ۱۶۳۹G>A- پروموتر و 1173C>T واقع در اینترون یک ژنVKORC1، ابتدا توالی های مربوطه به کمک پرایمرهای سنتز شده و دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf AG.22331 Hamburg Germany No.5345-015844) موجود در آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بیرجند با برنامه دمایی زیر تکثیر شدند:

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل به ترتیب ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، دمای آنیلینگ ۶۰ درجه در ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و زمان Extension نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بوده است.

پس از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در کنار سایز مارکر ۵۰ جفت بازی الکتروفورز شدند. سپس در دستگاه Gel Documantation (UVITEC CAMBRIDGE) تحت تاثیر نور UV از ژل عکس‌برداری شد. پس از اطمینان از انجام صحیح و اختصاصی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، نمونه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت زیست فناوری کوثر ارسال شدند. نتایج خام تعیین توالی نمونه‌ها با کمک نرم افزارهای مناسب کروماس (ChromasLite2.1.1) بررسی و پس از Allignment و آنالیزداده‌ها، واریانت‌های احتمالی موجود در ژنVKORC1 شناسایی گردید.

نتایج توسط نرم افزارهای ژنتیکی و آماری مناسب (SPSS) و آزمون‌های توصیفی Independed Sample t-test (جهت مقایسه متغیرها در دو جنس زن و مرد) و Correlation مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و ارتباط سکانس‌ها و واریانتهای شناسایی شده با PT و INR مورد بررسی و بحث قرار گرفت. در نهایت بمنظور بررسی تبعیت جمعیت مورد مطالعه از تعادل ژنتیک جمعیت، از آزمون تعادل هاردی-واینبرگ استفاده شد [۹].

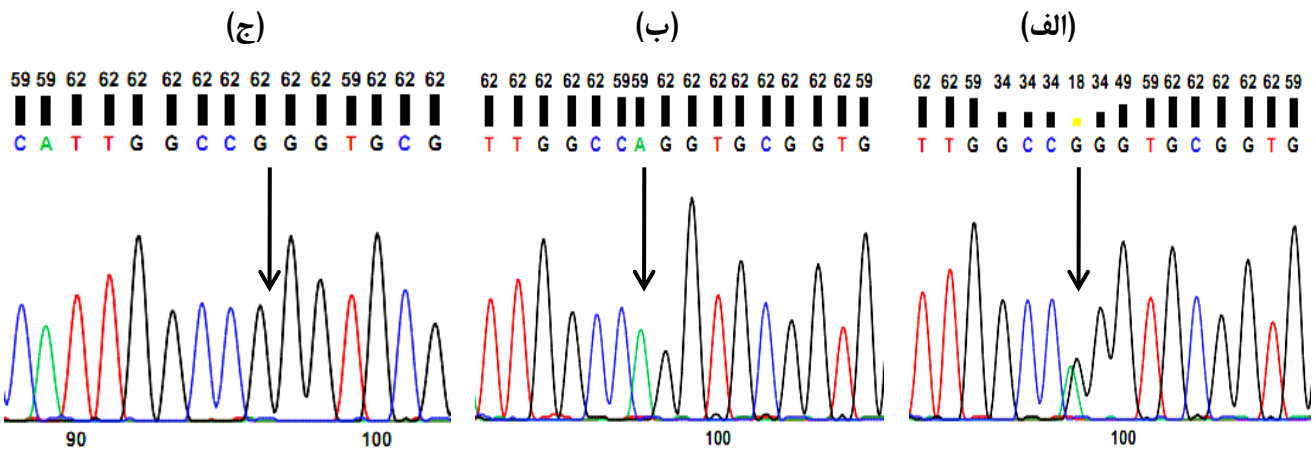
یافته‌ها

مشخصات سنی، PT و INR جمعیت مورد مطالعه در جدول ۲ آمده است. بررسی نتایج بر روی ۱۱۵ فرد مورد مطالعه نشان داد که از این تعداد ۶۰ نفر معادل ۵۲/۱٪ مرد و ۵۵ نفر معادل ۴۷/۸٪ زن می‌باشند. میانگین سن افراد نیز ۱۲/۹ ± ۵۷/۷ سال بود. بطور میانگین مدت مصرف وارفارین در بیماران مورد مطالعه ۲ ± ۶ ماه بود و در نتیجه بیماران به INR نسبتاً پایداری رسیده بودند. از تعداد کل نمونه‌ها، ۶ /۷۲٪ آن‌ها از

جدول ۲- مشخصات سنی، PT و INR افراد مورد مطالعه

	جنس	تعداد	میانگین	انحراف معیار (SD)
سن (سال)	زن	۵۵	۵۸/۳	۱۱/۷
	مرد	۶۰	۵۷/۲	۱۳/۹
	جمع	۱۱۵		
PT	زن	۵۵	۲۰/۵	۵/۹
	مرد	۶۰	۲۱/۸	۵/۷
	جمع	۱۱۵		
INR	زن	۵۵	۲/۴	۱/۲
	مرد	۶۰	۲/۷	۱/۳
	جمع	۱۱۵		

SD=standard deviation



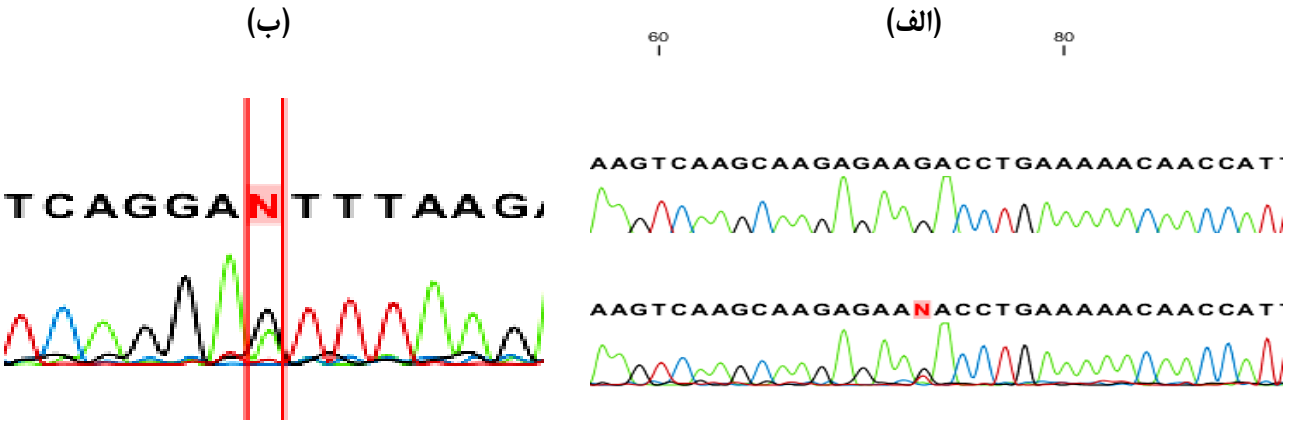
شکل ۱– تصویر الکتروفروگرام ناحیه ۱۶۳۹– ژن VKORC1. الف: ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته. ب: ژنوتیپ هتروزیگوت. ج: ژنوتیپ هموزیگوت نرمال.

بیمارستان امام رضا (ع) و ۲۷/۴٪ شان از بیمارستان ولیعصر (عج) جمع‌آوری شدند.

تاکنون برای ژن VKORC1، دو Pseudogenes در پایگاه NCBI به ثبت رسیده است: VKORC1P1 که روی کروموزوم X بوده و ۹۱درصد با توالی ژن VKORC1 تطابق دارد و VKORC1P2 که روی کروموزوم شماره یک واقع شده و ۹۲ درصد با توالی VKORC1 همپوشانی دارد.

خوشبختانه هر دو جفت پرایمر طراحی شده در این مطالعه جهت بررسی دو آلل مهم ژن VKORC1 پس از بلاست در پایگاه NCBI یک رکورد داشتند و آن‌هم روی کروموزوم ۱۶ که جایگاه ژن اصلی یعنیVKORC1 می‌باشد. لذا این پرایمرها قطعاً Pseudogenes این ژن را طی فرآیند PCR به هیچ وجه شناسایی و تکثیر نخواهند کرد.

پس از انجام PCR، نتایج تعیین توالی ناحیه ۱۶۳۹G>A– ژن VKORC1 (g.3588G>A) برای ۱۱۳ نفر به این شرح بود؛ تعداد ۵۵ نفر معادل ۴۸/۷٪ ژنوتیپ هموزیگوت نرمال (GG)، ۴۴ نفر معادل ۳۸/۹٪ ژنوتیپ هتروزیگوت (AG) و در نهایت۱۴ نفر معادل ۱۲/۴٪ حالت هموزیگوت جهش‌یافته (AA) نشان دادند. آمارها به تفکیک جنسیت نیز برای ژنوتیپ‌های هموزیگوت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش یافته در ناحیه ۱۶۳۹G>A– در مردان به ترتیب ۴۰/۳٪، ۳۰/۵٪، ۱۷/۵٪ و در زنان ۵۰٪، ۳۶/۷٪ و ۵٪، بوده است. فراوانی آلل ۱۶۳۹A- و آلل ۱۶۳۹G– در جمعیت حاضر به ترتیب ۳۱/۹٪ و ۶۸/۱٪ می باشد. تصویر چند الکتروفروگرام از ناحیه ۱۶۳۹– در شکل ۱ نشان داده شده است. تکثیر و تعیین توالی ژن VKORC1 با پرایمر مربوط به ناحیه۱۶۳۹G>A– پروموتر آن، همچنین دو جهش جدید را در



شکل ۲– تصویر الکتروفروگرام جهش‌های جدید یافت شده در ناحیه پروموتر ۱۶۳۹– ژن VKORC1. الف: جهش جدید g.3565G>T. ب: جهش جدیدg.3660G>A.

جدول ۳- توزیع آللی و ژنوتیپی افراد برای ژن VKORC1

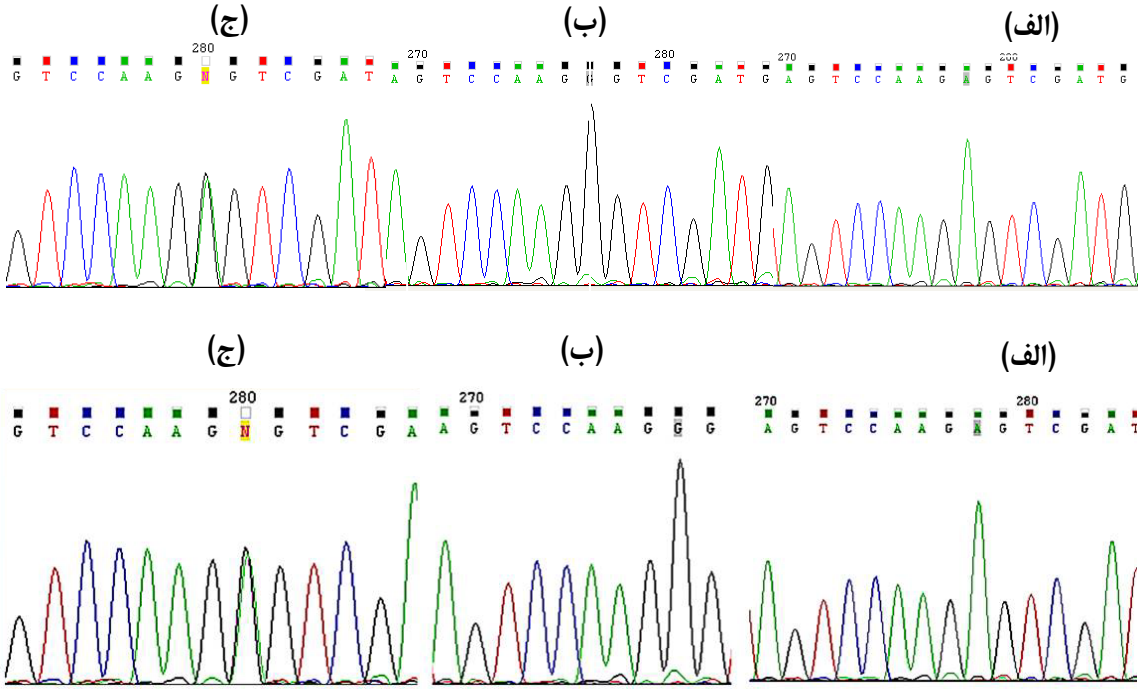
پلی مورفیسم	ژنوتیپ	تعداد (درصد)	آلل	تعداد (درصد)	ارزش p با درجه اطمینان ۹۵٪ بین تغییرات آللی در دو جنس زن و مرد
-۱۶۳۹ G>A	AA	(۱۲/۴)۱۴	-۱۶۳۹A	(۳۱/۹) ۷۲	۰/۱۹
	AG	(۳۸/۹) ۴۴	-۱۶۳۹G	(۶۸/۱) ۱۵۴	
	GG	(۴۸/۷) ۵۵			
۱۱۷۳C>T	CC	(۳۹/۶) ۴۴	۱۱۷۳C	(۶۲/۶)۱۳۹	۰/۰۸۶
	CT	(۴۵/۹) ۵۱	۱۱۷۳T	(۳۷/۴) ۸۳	
	TT	(۱۴/۴) ۱۶			

این ناحیه نشان داد. این جهش‌ها شامل جهش g.3660G>A هتروزیگوت در سه نفر (۲ زن و یک مرد) با فراوانی ۲/۷٪ و جهش g.3565G>T هتروزیگوت در یک زن با فراوانی ۰/۹٪ در کل جمعیت بودند. شکل ۲ نشان‌دهنده تصویر الکتروفروگرام جهش‌های جدید یافت شده در ناحیه پروموتور ۱۶۳۹- است.

پس از تکثیر ناحیه ۱۱۷۳C>T ژن VKORC1، نتایج تعیین توالی برای این منطقه در ۱۱۱ نفر نشان داد، ژنوتیپ‌های هتروزیگوت (CT)، هموزیگوت نرمال (CC) و هموزیگوت جهش‌یافته (TT) به ترتیب و به تفکیک جنسیت در زنان ۵۲/۶٪، ۴۰/۴٪، ۷٪ و در مردان ۳۸/۹٪، ۳۸/۹٪ و ۲۲/۲٪ فراوانی دارند. در واقع از کل جمعیت مورد مطالعه ۴۵/۹٪ هتروزیگوت می‌باشند. فراوانی آللی و ژنوتیپی ژن VKORC1 در جدول ۳ بیان شده است. فراوانی آلل ۱۱۷۳C و ۱۱۷۳Tدر این مطالعه ۶۲/۶٪ و ۳۷/۴٪ است. شکل ۳ نشان‌دهنده تصویر چند الکتروفروگرام از ناحیه ۱۱۷۳C>T می‌باشد. نتایج نشان داد میان ژنوتیپ‌های مختلف دو پلی مورفیسم ۱۶۹۳G>A- و ۱۱۷۳C>T با PT و INR ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (جدول ۴). در این مطالعه توزیع ژنوتیپی تمامی پلی‌مورفیسم‌های بررسی شده مطابق با تعادل هاردی-واینبرگ می‌باشد.

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی دو پلی‌مورفیسم مهم ژن VKORC1یعنی ۱۶۳۹G>A-و ۱۱۷۳C>T به دلیل اهمیت عملکردی‌شان در تغییرات دوز مورد نیاز وارفارین در بیماران



شکل ۳- تصویر الکتروفروگرام ناحیه 1173T ژن VKORC1 را نشان می‌دهد. الف: ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته. ب: ژنوتیپ هموزیگوت نرمال. ج: ژنوتیپ هتروزیگوت.

جدول ٤- ارتباط میانگین PT و INR با ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

پلی مورفیسم	ژنوتیپ	تعداد (درصد)	ارزش p با درجه اطمینان ۹۵ درصد بین انواع ژنوتیپ و PT	ارزش p با درجه اطمینان ۹۵ درصد بین انواع ژنوتیپ و INR
۱۶۳۹G>A-	AA	۱۴ (۱۲/۴)	۰/۷۵	۰/۸
	AG	۴۴ (۳۸/۹)		
	GG	۵۵ (۴۸/۷)		
۱۱۷۳C>T	CC	۴۴ (۳۹/۶)	۰/۱۵	۰/۱۴
	CT	۵۱ (۴۵/۹)		
	TT	۱۶ (۱۴/۴)		

قلبی انجام شد. مطالعات فراوان تنوع دوز وارفارین را در جمعیت‌های مختلف با احتمال زیادی، منوط به وجود پلی‌مورفیسم در دو ژن CYP2C9 وVKORC1 می‌دانند، بطوریکه عدم وجود آلل نرمال، یعنی وجود آلل‌های واریانت CYP2C9*2 و CYP2C9*3، VKORC1 -۱۶۳۹A و آلل VKORC1 ۱۱۷۳T را عامل ایجاد حساسیت فرد بیمار به وارفارین معرفی می‌کنند. از اینرو فرمول تعیین دوز روزانه وارفارین را که واریانت‌های ژنتیکی CYP2C9 و VKORC1 از متغیرهای مهم و تعیین کننده آن هستند، با اطمینان بیشتری می‌توان از لحاظ بالینی اجرا کرد [۴, ۱۲-۱۰].

$$\text{Warfarin dose (mg/day)} = [0.628 - 0.0135\times(\text{Age}) - 0.24\times(\text{CYP2C9*2}) - 0.37\times(\text{CYP2C9*3}) - 0.241\times(\text{VKORC1}) + 0.0162\times(\text{height})]^2$$ [۱۲]

موقعیت کشور ایران به لحاظ جغرافیایی به نحوی است که میان دو جمعیت آسیایی و اروپایی قرار گرفته است. بنابراین وجود تنوع بالای قومیتی و واریانت‌های ژنتیکی در ایران به دلیل مهاجرت و جریانات جمعیتی دور از ذهن نیست. در نتیجه دست‌یابی به الگوی پراکنش واریانت‌های ژنتیکی در مناطق مختلف ایران با توجه به اثر واریانت‌ها بر حساسیت به دوز دارو حائز اهمیت می‌باشد.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد در جمعیت بیرجند افرادی با ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته برای ناحیه ۱۶۳۹G>A- ژنVKORC1 تعداد کمتری (۱۲/۴٪) نسبت به دو ژنوتیپ نرمال و هتروزیگوت دارند. دو جهش جدید نیز در ناحیه ۱۶۳۹G>A- ژن VKORC1 شناسایی شد.

با گسترش دامنه‌ی مطالعات مشخص شد، ژن VKORC1 نیز نقش مهمی در تفاوت‌های قومی در حساسیت به وارفارین دارد [۱۳] و پلی‌مورفیسم‌های ناحیه ۱۶۳۹G>A- و ۱۱۷۳C>T این ژن در تغییرات بین فردی پاسخ به وارفارین نقش مهمی ایفا می‌کنند [۶]. هردوی این پلی‌مورفیسم‌ها در ژن VKORC1 موجب کاهش دوز مورد نیاز و حساسیت به وارفارین می‌شوند. به عنوان مثال ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته AA در ناحیه ۱۶۳۹- ژن VKORC1 در مقایسه با دو ژنوتیپ هتروزیگوت AG و هموزیگوت نرمالGG حساسیت بالایی به وارفارین در افراد ایجاد می‌کند، زیرا میزان بیان ژن VKORC1 (که مسئول بازیافت ویتامین K احیا شده برای انعقاد خون است) در حاملین ژنوتیپ AA کاهش چشمگیری پیدا می‌کند [۵].

تعداد ۲۹ بیمار در مازندران توسط صالحی‌فر و همکاران در سال ۱۳۹۱ به منظور مطالعه پلی‌مورفیسم‌های ناحیه ۱۶۳۹G>A- و ۱۱۷۳C>T ژن VKORC1 مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت برای ناحیه ۱۶۳۹- افرادی با ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته AA با ۸۶/۲٪ بیشترین فراوانی را نشان دادند و ژنوتیپ‌های AG وGG نیز فراوانی یکسان ۶/۹٪ داشتند. در بررسی ۱۱۷۳C>T اینترون یک ژن VKORC1 نیز تعداد ۲۶ نفر معادل ۸۹/۷٪ افراد ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته TT، ۶/۹٪ ژنوتیپ هموزیگوت نرمال و ۳/۴٪ حالت هتروزیگوت را نشان دادند [۶]. در مطالعه حاضر برخلاف جمعیت مازندران ژنوتیپ هموزیگوت نرمال و هتروزیگوت برای ناحیه ۱۶۳۹- به ترتیب با ۴۸/۷٪ و ۳۸/۹٪ بالاترین شیوع را داشتند و افراد هموزیگوت جهش‌یافته درصد پایینی از جمعیت مورد مطالعه یعنی ۱۲/۴٪ را تشکیل دادند. بنابراین افرادی که به دلیل داشتن ژنوتیپ ۱۶۳۹AA- حساسیت بیشتری به وارفارین دارند در جمعیت مازندران فراوانی بالایی دارند و افرادی با حساسیت کمتر به وارفارین در جمعیت بیرجند نسبت

به مازندران بیشتر می‌باشند. با مقایسه نتایج بررسی ناحیه ۱۱۷۳C>Tمشخص شد در جمعیت بیرجند حالت هتروزیگوت و سپس هموزیگوت نرمال بیشترین فراوانی را دارند. این موضوع کاملاً عکس نتایج مطالعه مازندران با شیوع بالای ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته است. بنابراین دلیل دیگری بر تایید حساسیت بیشتر جمعیت مازندران به داروی وارفارین بر خلاف مردم بیرجند، این تفاوت‌های ژنوتیپی ذکر شده برای ناحیه ۱۱۷۳C>T بین دو جمعیت می‌باشد.

با مطالعه ۱۵۰ نفر از جمعیت شیراز در سال ۲۰۱۰، فراوانی ژنوتیپ ۱۶۳۹GA- معادل ۵۷/۱۴٪ و ژنوتیپ AA ۱۶۳۹- حدود ۷۳٪ مشاهده شد که مانند جمعیت مازندران ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته فراوانتر می باشد [۱۴]. بعلاوه آلل VKORC1 ۱۱۷۳T در این مطالعه فراوانی برابر۵۶٪ نشان داد، که این مورد برای جمعیت بیرجند ۳۷/۴٪ بوده است، بنابراین حساسیت به وارفارین در افراد شیراز مانند مازندران نسبت به مردم بیرجند بیشتر و احتمالاً نیاز دوز روزانه وارفارین‌شان کمتر خواهد بود.

میزان فراوانی پلی‌مورفیسم ۱۶۳۹G>A- ژن VKORC1 در منطقه شمال‌غرب ایران (شامل استان‌های آذربایجان شرقی، غربی و اردبیل) با مطالعه ۲۰۰ نفر در سال ۱۳۹۱، بیانگر حضور شایع جهش در این منطقه بوده است. میزان فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت نرمال،هتروزیگوت و هموزیگوت جهش یافته ۱۶۳۹G>A- دراین منطقه به ترتیب در جنس مونث ۲۱/۶، ۵۳/۷، ۲۴/۵ درصد و در جنس مذکر ۶۰/۲۲،۶/۳ و ۱۷/۰۲ درصد بوده است [۱۵]. در نهایت با توجه به شیوع بالای آلل ۱۶۹۳A-در جنوب و شمال غرب ایران، افراد این مناطق حساسیت بیشتری به وارفارین دارند که این موضوع با جمعیت بیرجند که شیوع بالای آلل۱۶۹۳G- را دارند متفاوت می‌باشد.

Lubica در بررسی واریانت‌های ژنتیکی VKORC1 برای ناحیه ۱۶۳۹G>A- در سال ۲۰۱۴ با بررسی ۱۱۲ نفر از افراد سالم اسلواکی، حضور ژنوتیپ‌های GG، GA و AA را ۳۷٪، ۵۲٪ و ۱۲٪ گزارش کرد. جالب اینجاست که درصد فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده در بررسی VKORC11۱۷۳C>Tجمعیت اسلواکی نیز دقیقاً مشابه ناحیه ۱۶۹۳G>A- است. همانطور که مشاهده می‌شود یافته‌های این مطالعه خیلی مشابه با نتایج مطالعه ما روی جمعیت بیرجند می باشد.برای مثال فراوانی ژنوتیپی هتروزیگوت ۱۱۷۳C>Tبرای بیرجند ۴۵/۹٪ و در اسلواکی ۵۲٪ می‌باشد [۲].

در مطالعه‌ای که ۱۴۸ نفر از افراد سالم جمعیت قبرسی‌های یونانی در سال ۲۰۱۴ در آن وارد شدند، میزان فراوانی آلل واریانت VKORC1 -۱۶۳۹A، برابر ۵۳٪ بوده است. لذا مردم قبرس همانند مردم مازندران و شیراز دارای شیوع بالاتری از این آلل نسبت به بیرجند می‌باشند [۱۶].

نتایج مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ در انگلستان روی ۵۵۷ بیمار نشان داد که افراد دارای ژنوتیپ AA مربوط به ناحیه ۱۶۳۹G>A- ژن VKORC1 با فراوانی ۱۴/۵ درصد، جهت دستیابی به INR هدف، نیاز به دوز کمتری از وارفارین داشته و بیشتر دچار خونریزی می‌شوند و درنتیجه حساسیت بیشتری به وارفارین دارند. مقایسه این یافته‌ها با نتایج گزارش شده از مطالعات ایران، مبین شیوع کمتر این ژنوتیپ (۱۶۳۹AA-) در این جمعیت اروپایی- مشابه جمعیت بیرجند- و شیوع بالاتر آن در جمعیت‌های مازندران ۸۶/۲٪ و شمال‌غرب ایران ۲۱٪ می‌باشد [۱۷]. بنابراین افراد جمعیت مازندران، سپس ناحیه شمال‌غربی ایران به ترتیب، نسبت به جمعیت انگلستان به وارفارین حساس‌ترمی باشند و بیشتر در معرض خطر خونریزی قرار دارند. اما مردم بیرجند با فراوانی ۱۲/۴ درصدی ژنوتیپ ۱۶۳۹AA-، در مقایسه با هر سه جمعیت ذکر شده حساسیت وارفارینی کمتری دارند.

در نتیجه به جهت فراوانی پلی‌مورفیسم‌های ناحیه ۱۶۳۹G>A- ژن VKORC1 جمعیت مورد مطالعه ما مشابه بسیاری از جمعیت‌های دور و متفاوت از بسیاری از جمعیت های نزدیک ما می‌باشد. ژنوتیپ ۱۶۳۹AA- در جمعیت بیرجند فراوانی ۱۲/۴ درصدی دارد، که با شیوع آن در مازندران ۸۶/۲٪ [۶]، شیراز ۵۵/۶٪ [۱۴]، شمال غرب ایران ۲۱٪ [۱۵]، قبرس ۵۳٪ [۱۶] و جمعیت آرژانتین۲۰٪ متفاوت و با جمعیت اسلواکی ۱۲٪ [۲]، انگلستان ۱۴/۵٪ [۱۷] شباهت نزدیک دارد. این یافته‌ها تاییدکننده این موضوع است که آلل ۱۶۳۹A- با شیوع ۹۰ درصدی در آسیا غالب است [۸] اما از آنجایی که در جمعیت بیرجند نتایج کاملاً متفاوت بوده و اکثریت افراد دارای آلل ۱۶۳۹ G- می‌باشند، بنابراین باید تفاوت در میان مردمان هم قومیت در یک منطقه جغرافیایی را نیز مد نظر قرار داد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ در ژاپن روی ۹۳ نفر انجام

گرفت، فراوانی آلل VKORC1 1173Tحدود ۱۱/۳٪ گزارش شد. این نتیجه تقریباً مشابه درصد فراوانی این آلل در کشور چین (۱۲/۸٪) می‌باشد که در سال ۲۰۱۰ روی ۱۳۳ نفر از جمعیت این کشور انجام شد [۱۸]. از آنجاییکه در جمعیت ۱۱۵ نفری مطالعه ما درصد شیوع این آلل بسیار بالاتر از دو جمعیت ذکر شده در شرق آسیا می‌باشد، یعنی ۳۷/۴٪، بنابراین مردم بیرجند در مقایسه با جمعیت چین و ژاپن بیشتر در خطر ریسک بالای خونریزی و حساسیت وارفارینی قرار دارند. این در حالیست که فراوانی آلل واریانت این ژن در برخی از کشورهای اروپایی و آسیایی نزدیک‌تر به نتایج مطالعه ما است. به عنوان نمونه در بررسی ۲۲۲ نفر از جمعیت فرانسه توسط Bodin، ۴۲٪ این افراد دارای آلل VKORC1 1173T بودند [۱۹]. فراوانی آلل مذکور در جمعیت اسلواکی ۵۰/۵٪ گزارش شده است [۲, ۱۹]. همچنین Kamal El-Din در بررسی ۴۱ کودک مصری در سال ۲۰۱۴، فراوانی آلل‌های VKORC1۱۱۷۳T و VKORC1 -۱۶۳۹A را به ترتیب ۵۲٪ و ۵۴٪ گزارش نمود. بنابراین آللVKORC1۱۱۷۳T دارای فراوانی بالاتری در این جمعیت‌های اروپایی و آسیایی نسبت به جمعیت بیرجند است. این درحالیست که در یک جمعیت ۱۰۳ نفری از مردم هند که در سال ۲۰۱۳ به منظور بررسی فراوانی‌های ژنوتیپیC>T۱۱۷۳ ژن VKORC1 مورد مطالعه قرار گرفتند، ژنوتیپ هموزیگوت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش‌یافته به ترتیب فراوانی ۷۶٪، ۲۲٪ و ۲٪ نشان دادند [۱۰]. همانطور که مشاهده می‌شود ژنوتیپ هموزیگوت نرمال از ژنوتیپ هتروزیگوت فراوان‌تر بوده و به طورکلی آلل واریانت T با فراوانی ۱۶ درصدی کمتر از جمعیت بیرجند است. بنابراین در جمعیت هند حساسیت به وارفارین کمتر و در جمعیت اسلواکی و به ویژه مصر که آلل VKORC1 -۱۶۳۹A نیز نسبت به جمعیت بیرجند بیشتر (۵۲٪) گزارش شده است، حساسیت بیشتری به وارفارین انتظار می‌رود [۲۰].

در نتیجه مقایسه فراوانی واریانت‌های ژنتیکی VKORC1به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج حاصل از سایر نقاط ایران و جهان، تاییدی بر مطالعه Gaikwad و همکاران وی در سال ۲۰۱۴ است. Gaikwad بیان داشت در حرکت از شرق به غرب آسیا، تعداد حاملین آلل‌های CYP2C9*2 و YP2C9*3 بر خلاف VKORC1-۱۶۳۹A رو به افزایش است. با این وجود در کشورهایی نظیر ایران، عمان، هند و روسیه تنوع شدید و نامتوازنی به لحاظ الگوی پراکندگی آللی و ژنوتیپی CYP2C9 وVKORC1 مشاهده می‌شود [۸].

نتیجه‌گیری

یافته های ما نشان می‌دهد تفاوت‌های قابل توجهی در فراوانی واریانت‌های ژنتیکیVKORC1 در جمعیت شهر بیرجند در مقایسه با سایر نقاط ایران وجود دارد که ناشی از تفاوت‌های قومیتی بوده و در تعیین حساسیت به دارو بسیار تاثیرگذار هستند.

سپاسگزاری

این مقاله با استفاده از امکانات طرح پژوهشی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی بیرجند به شماره ۱۰۰۶ انجام یافته است، بدین وسیله از همکاری معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه کمال تشکر به عمل می‌آید.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهم نویسندگان

ف.ع.ر: انجام مطالعه و نگارش مقاله; ا.ز: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه و نگارش مقاله; ف.ح: مشاوره; غ.ع.س و م.ن: اجرای بخشی از مطالعه.

فهرست منابع

[1] FDA news release: FDA approves updated warfarin (Coumadin) prescribing information new genetic information may help providers improve initial dosing estimates of the anticoagulant for individual patients. 2007; Available from: http://www.fda.gov/NewsEvents/%20Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108967.htm.

[2] Krajčíová Ľ, Petrovič R, Déžiová Ľ, Chandoga J,

Turčáni P, Frequency of selected single nucleotide polymorphisms influencing the warfarin pharmacogenetics in Slovak population. ***Eur J Haematol*** 4 (2014) 320-328.

[3] Landefeld CS, Beyth RJ, Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. ***Am J Med*** 3 (1993) 315-328.

[4] Park SM, Lee JK, Chun SI, Lee HI, Kwon SU, Kang DW, Kim JS, VKORC1 and CYP2C9 genotype variations in relation to warfarin dosing in korean stroke patients. ***J Stroke*** 2 (2013) 115-121.

[5] Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL, Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. ***Thromb Haemost*** 91 (2004) 87-94.

[6] Salehifar E, Farhadi F, Janbabai G, Ahangar N, Frequency of VKORC1 gene polymorphisms and its association with warfarin dose requirement in patients from Mazandaran province. ***J Mazand Univ Med Sci*** 94 (2012) 44-52 (Persian).

[7] Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, et al, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. ***Clin Pharmacol Ther*** 4 (2011) 625-629.

[8] Gaikwad T, Ghosh K, Shetty S, VKORC1 and CYP2C9 genotype distribution in Asian countries. ***Thromb Res*** 3 (2014) 537-544.

[9] Waples RS, Testing for Hardy-Weinberg proportions: have we lost the plot? ***J Hered*** 106 (2015) 1-19.

[10] Natarajan S, Ponde CK, Rajani RM, Jijina F, Gursahani R, Dhairyawan PP, Ashavaid TF. Effect of CYP2C9 and VKORC1 genetic variations on warfarin dose requirements in Indian patients. ***Pharmacol Rep*** 1 (2013)1375-1382.

[11] Tabatabi M, Monfaredan A, Bargahi N, CYP2C9 gene allelic variation and the required dose of warfarin in patients with a history of thrombosis in NorthWest of Iran. ***Med J Tabriz Univ Med Sci*** 34 (2012) 75-80 (Persian).

[12] Shalia KK, Doshi SM, Parikh S, Pawar PP, Divekar SS, Varma SP, Mehta R, Doctor T, Shah VK, Saranath D, Prevalence of VKORC1 and CYP2C9 gene polymorphisms in Indian population and its effect on warfarin response. ***J Assoc Physicians India*** 60 (2012) 34-38.

[13] Baniasadi S, Beizaee S, Kazemi B, Behzadnia N, Shafaghi B, Bandehpour M, et al, Novel VKORC1 mutations associated with warfarin sensitivity. ***Cardiovasc Ther*** 4 (2011)1-5 (Persian).

[14] Azarpira N, Namazi S, Hendijani F, Banan M, Darai M, Investigation of allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and VKORC1 in Iran. ***Pharmacol Rep*** 4 (2010) 740-746.

[15] Tabatabi M, Monfaredan A, Bargahi N, Oskouyi S, Evaluate the frequency polymorphism 1639 G> A gene VKORC1 in patients with cardiovascular disorders in North West of Iran. ***Arak Univ Med Sci*** 4 (2013) 40-46 (Persian).

[16] Hadjipanagi D, Chrysanthou S, Voskarides K, Deltas C, Genetic polymorphisms in warfarin and tacrolimus-related genes VKORC1, CYP2C9 and CYP3A5 in the Greek-Cypriot population. ***BMC Res Notes*** 7 (2014) 123.

[17] Lund K, Gaffney D, Spooner R, Etherington AM, Tansey P, Tait RC, Polymorphisms in VKORC1 have more impact than CYP2C9 polymorphisms on early warfarin International Normalized Ratio control and bleeding rates. ***Br J Haematol*** 2 (2012) 256-261.

[18] Gu Q, Kong Y, Schneede J, Xiao YB, Chen L, Zhong QJ, Wang XF, Hao J, Chen BC, Chen JJ, VKORC1-1639G>A, CYP2C9, EPHX1691A>G genotype, body weight, and age are important predictors for warfarin maintenance doses in patients with mechanical heart valve prostheses in southwest China. ***Eur J Clin Pharmacol*** 12 (2010) 1217-1227.

[19] Bodin L, Verstuyft C, Tregouet D-A, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, Jaillon P, Beaune P, Laurent-Puig P, Becquemont L, Loriot MA, Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. ***Blood*** 1 (2005) 135-140.

[20] Kamal El-Din MA, Farhan MS, El Shiha RI, El-Kaffas RM, Mousa SM, Frequency of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms and their influence on warfarin dose in Egyptian pediatric patients. ***Paediatr Drugs*** 4 (2014) 337-341.

Research paper

Allele and genotype frequencies of VKORC1 in Birjand population

Fariba Emadian Razavi [1], Asghar Zarban[2], Fatemeh Hajipoor[3], Gholamreza Anani Sarab[4], Mohsen Naseri[3*]

1. Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
2. Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
3. Genomic Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran
4. School of Paramedical, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

Received: 21 December 2015 Accepted: 7 November 2015

Abstract

Introduction: Administration of warfarin, the most common oral anticoagulant, is usually accompanied with limitations. Anticoagulant effect of warfarin has wide inter-patients variations due to pharmacodynamics, pharmacokinetics and especially pharmacogenetics factors. Polymorphisms of VKORC1 gene is one of the genetic factors influencing adjustment of warfarin dosage. In order to better determine the appropriate dosage of the drug, this study was conducted to find out the allele and genotype frequencies of VKORC1 gene in population of Birjand city.

Methods: One hundred-fifteen patients who referred to Imam Reza and Vali-asr hospitals of Birjand city for PT and INR tests, were selected for this experimental study. After genomic DNA extraction, all amplified PCR products of VKORC1 were sequenced to determine the genotypes. Statistical analysis was performed using SPSS software.

Results: The average age of patients was 57.7 ± 12.9, 55 were women and 60 were men. Normal, heterozygous and homozygous mutant genotypes of -1639 G>A variant, had a frequency of 40.3%, 30.5%, 17.5% in men; and 50%, 36.7%, 5% in women, respectively. Regarding 1173C>T variant, normal, heterozygous and homozygous mutant genotypes had a frequency of 38.9%, 38.9%, 22.2% in men; and 52.6%, 40.4%, 7% in women, respectively. Two new mutations as g.3660G> A and g.3565G> T with the frequency of 2.7% and 0.9% in -1639 G>A promoter region of VKORC1 gene were observed. Finally, -1639G and 1173C alleles had a high frequency (68.1% and 62.6%, respectively) in people of Birjand city.

Conclusion: Our results indicate that there are significant differences in the frequency of VKORC1 genetic variants in people of Birjand city compared to other parts of Iran. The ethnic differences can affect sensitivity to warfarin. Therefore, knowing the genotype of the patients before starting warfarin therapy will help to have a precise and efficient therapy.

Keywords: Coagulation, Optimal dose, Polymorphism, VKORC1, Warfarin

Please cite this article as follows:
Emadian Razavi F, Zarban A, Hajipoor F, Anani Sarab G, Naseri M, Allele and genotype frequencies of VKORC1 in Birjand population. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 1 (2017) 201-210.

*Corresponding author e-mail: naseri_m2003@yahoo.com
Available online at: http://ijpp.phypha.ir
E-mail: ijpp@phypha.ir