

ارتباط پلی مرفیسم C46T در ژن فاکتور XII با میزان فعالیت این فاکتور و خطر ابتلا به بیماری‌های ترومبوتیک

پریسا رائی قائمی^۱، احمد کاظمی^۲، فریدون علا^۳، محمد جاذبی^۴، فرناز رزمخواه^۱

چکیده

سابقه و هدف

تعدادی از نقص‌های ژنتیکی شناخته شده، منجر به افزایش خطر ترومبوز می‌شوند. نتایج مطالعه‌های پیشین نشان داده‌اند که FXII در پاتوژنز بیماری‌های ترومبوتیک درگیر است. فعالیت پلاسمایی FXII، قویاً توسط پلی مرفیسم C46T در ژن این فاکتور تعیین می‌شود. در این مطالعه، خطر ابتلا به بیماری‌های ترومبوتیک در همراهی با این پلی مرفیسم بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع مورد - شاهدهی بود. ۱۶۰ نفر شامل ۱۲۰ بیمار ترومبوتیک و ۴۰ فرد کنترل که از نظر سن و جنس با گروه بیماران تطابق داشتند، مورد مطالعه قرار گرفتند. میزان فعالیت FXII، با روش اندازه‌گیری زمان انعقاد توسط پلاسمای فاقد FXII و پلی مرفیسم C46T با استفاده از روش RFLP در هر دو گروه بررسی شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه، مشاهده‌های قبلی که نشان‌دهنده تفاوت در سطح فعالیت FXII در افراد با ژنوتیپ‌های مختلف FXII بود، تایید شد. مهم‌تر این که سطوح فعالیت FXII کمتر از ۶۸٪ با خطر افزایش یافته برای ترومبوز همراه بود (OR = ۴/۷۵ و CI ۹۵٪ = ۱/۰۷ - ۲۱/۱). در مورد ژنوتیپ‌های CT و TT به ترتیب OR برای بیماران ترومبوتیک در مقایسه با کنترل، (CI ۹۵٪ = ۰/۸۳ - ۳/۹۴) و ۱/۸۱ (CI ۹۵٪ = ۰/۴۵ - ۱۰/۷) و ۲/۱۷ (CI ۹۵٪ = ۰/۴۵ - ۱۰/۷) بود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده شد که پلی مرفیسم C46T یک تعیین‌کننده قوی سطوح پلاسمایی FXII است. علی‌رغم اهمیت این پلی مرفیسم در سطوح FXII، هیچ ارتباطی بین آلل موتاسیون یافته T با خطر افزایش یافته بیماری‌های ترومبوتیک مورد مطالعه پیدا نشد. بنابراین استنباط می‌شود که سطوح پایین فعالیت FXII دلیل ترومبوز نمی‌باشد بلکه نتیجه آن است.

کلمات کلیدی: ترومبوز، پلی مرفیسم (ژنتیک)، نسبت شانس

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۱۸

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۶

- ۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - دانشگاه علوم پزشکی ایران
- ۲- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران - تهران - تقاطع شهید همت و شیخ فضل اله - جنب برج میلاد - کدپستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۸۳
- ۳- فوق تخصص خون و انکولوژی - کانون هموفیلی کودکان
- ۴- کارشناس ارشد هماتولوژی - کانون هموفیلی کودکان

مقدمه

ترومبوز یکی از علل متداول مرگ و میر در جهان و به خصوص در جوامع صنعتی است. ترومبوزهای شریانی و وریدی هر دو وقایع تهدیدکننده زندگی و از مسایل مهم سلامت عمومی هستند (۱). فاکتورهای خطر ترومبوز می توانند ژنتیکی یا اکتسابی باشند. بعضی از علت های اکتسابی از قبیل افزایش سن، بی تحرکی، جراحی ارتوپدی، داروهای ضد بارداری خوراکی و سندرم آنتی فسفولیپید، قرن هاست که شناخته شده اند. اما علت های ژنتیکی مثل کمبود آنتی ترومبین، نقص PrC، فاکتور V لیدن و پروترومبین 20210A اخیراً شناخته شده اند (۲).

امروزه تحقیقات کنونی در مورد بیماری های پیچیده ای مثل سکته قلبی، بیشتر بر روی تعیین واریانت های ژنتیکی که خطر ابتلا به بیماری های ترومبوتیک را افزایش می دهند متمرکز شده است (۳-۵). در میان مطالعه ها بر روی فاکتورهای انعقادی، سطوح فاکتور XII یکی از مواردی است که به شدت تحت تاثیر وراثت است و ارتباط ژنتیکی قابل توجهی را با بیماری های ترومبوتیک نشان داده است (۶). بنابراین بعضی از پلی مرفیسم ها و موتاسیون ها که باعث ایجاد تغییر در این فاکتور خطر فیزیولوژیکی می شوند، استعداد ابتلا به ترومبوز را هم تحت تاثیر قرار می دهند.

FXII یک سرین پروتئاز ۸۰ کیلودالتونی با غلظت پلاسمایی $30 \mu\text{g/ml}$ می باشد. تماس FXII با سطوحی با شارژ منفی، منجر به شکاف پروتئولیتیک و فعال شدن آن می شود. FXIIa می تواند FXI را فعال کند و هم چنین به نظر می رسد در تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین هم مشارکت می نماید (۷، ۸). اگر چه در شرایط آزمایشگاهی، FXII نقش اساسی در شروع انعقاد و فیبرینولیز دارد ولی نقش فیزیولوژیکی آن هنوز مورد بحث است.

فاکتور XII دارای چندین دومین (Domain) ساختاری می باشد که به ترتیب از انتهای آمینی به صورت پپتید نشانه، دومین فیبرونکتین تیپ II، دومین مشابه فاکتور رشد اپیدرمال (EGF)، دومین فیبرونکتین تیپ I، دومین دوم مشابه EGF، دومین kringle، منقطه ای سرشار از پرولین و دومین کاتالیتیک هستند (۹).

ژن کدکننده FXII، 12kb طول دارد و شامل 13 intron و 14 exon است. محل ژنی آن بر روی کروموزوم ۵ و در ناحیه 5q33-qter می باشد (۱۰). غلظت پلاسمایی FXII، بین افراد و نژادهای مختلف بسیار متفاوت است (۱۱). اخیراً نشان داده شده است که جایگزینی T به جای C در نوکلئوتید ۴۶ ژن FXII باعث تولید یک کدون متیونین شروع جدید، در نتیجه کارایی کم ترجمه و تولید سطوح کم FXII می شود (۱۲).

در این مطالعه فراوانی پلی مرفیسم C46T در یک نمونه تصادفی از بالغین سالم ارزیابی و بررسی شد که آیا این پلی مرفیسم با فعالیت کمتر FXII همراه بوده یا نه و هم چنین اثر پلی مرفیسم C46T در ژن FXII و میزان فعالیت این فاکتور در ابتلا به بیماری های ترومبوتیک توسط یک مطالعه شاهد-موردی بررسی شد. پیدا کردن چنین ارتباط هایی به شناسایی مکانیزم های درگیر در ترومبوز کمک کرده و می تواند ارایه دهنده راه حل های مناسب برای کاهش موارد مرگ و میر ناشی از ترومبوز باشد.

مواد و روش ها

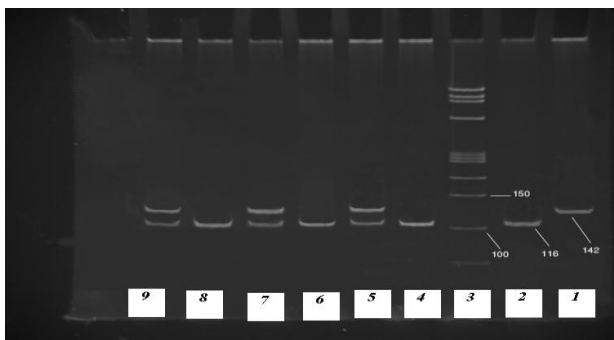
مطالعه انجام شده از نوع مورد - شاهدهی بود. در این پروژه، از نمونه خون ۱۲۰ بیمار مراجعه کننده به مرکز جامع درمان کودکان هموفیل ایران که مبتلا به بیماری های ترومبوتیک بودند (۲۴ نفر آمبولی ریوی، ۳۶ نفر ترومبوز وریدی عمقی، ۳۶ نفر ترومبوز عروق مغزی و ۲۴ نفر انفارکتوس ریوی) و ۴۰ نفر کنترل استفاده شد. مبنای انتخاب گروه کنترل، نداشتن هیچ گونه سابقه ای از بیماری های ترومبوتیک در گذشته و حال بود. توزیع سنی و جنسی در ۲ گروه بیمار و کنترل مثل هم بودند. گروه بیمار شامل ۵۵ (۴۵/۸٪) فرد مؤنث و ۶۵ (۵۴/۲٪) فرد مذکر با رنج سنی ۶۴ - ۲۱ (42 ± 13) سال و گروه کنترل متشکل از ۱۸ (۴۵٪) فرد مؤنث و ۲۲ (۵۵٪) فرد مذکر با رنج سنی ۶۰ - ۲۰ (41 ± 12) سال بودند.

نمونه خون گرفته شده از هر دو گروه ۱۰ ml بود که ۲ml آن بر روی ضد انعقاد سیترا ته برای اندازه گیری میزان فعالیت FXII و ۸ ml آن بر روی ضد انعقاد EDTA برای انجام آزمایش های ژنتیکی تهیه شد. پلاسمای نمونه سیترا ته

BsaHI site (if Y=C)
FXII C46T polymorphism

GATAGGCAGCTGGACCAACGGACGGAYGC
CATGAGGGCTCTGCTGCTCCTGGGGTTCCT
GCTGGTGAGCTTGGAGTCAACACTTTCGGT
GAGTGCTGTGGGAACCAGGATTGTCCCAG
GATTGTTCTGGGGGGTCTGCTATCA

شکل ۱: توالی قطعه تکثیری حاصل از PCR (142bp): جایگاه پلی مرفیسم C46T و محل اثر آنزیم BsaHI با فلش نشان داده شده است. اگر Y=C باشد، جایگاه شکست برای آنزیم BsaHI مهیا می شود بنابراین قطعه ۱۴۲ bp به ۲ قطعه ۲۶ bp و ۱۱۶ bp شکسته می شود. اگر Y=T باشد این قطعه به صورت دست نخورده یعنی به همان صورت ۱۴۲ bp باقی می ماند.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR روی ژل پلی اکریلامید: به ترتیب از سمت راست، ستون ۱ ژنوتیپ TT، ستون های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ ژنوتیپ CC، ستون های ۱۰، ۱۱، ۱۲ ژنوتیپ CT و ستون ۱۳ مارکر استفاده شده برای تخمین اندازه قطعات حاصله از شکست را نشان می دهند.

پلاسمایی در میان گروه های مختلف ژنوتیپی با استفاده از ANOVA یک سویه بررسی شد. $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. Odds ratio برای بررسی خطر نسبی همراه ترومبوز محاسبه شد. همچنین برای به دست آوردن سطح مبنای رفرانس برای FXII، صدک دهم محاسبه گردید.

یافته ها

در بین ۴۰ فرد گروه کنترل، ۲۶ نفر (۶۵٪) حامل

بلافاصله بعد از خونگیری توسط سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق جدا شد و سپس پلاسمای جدا شده به لوله های پلاستیکی منتقل شد و تا زمان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید. نمونه های خون تهیه شده بر روی EDTA از زمان اخذ نمونه تا زمان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند.

برای سنجیدن فعالیت FXII، زمان لخته شدن با استفاده از پلاسمای فاقد FXII و معرف aPTT (تکنوکلون - روسیه) توسط دستگاه کواگولومتر Ca-1500 (سیس مکس - آلمان) اندازه گیری شد.

برای بررسی پلی مرفیسم C46T (-4C→T)، DNA توسط روش فنل - کلروفرم از سلول های خونی جمع آوری شده در EDTA استخراج شد. سپس اگزون ۱ ژن FXII توسط PCR تکثیر گردید. توالی آغازگرهای استفاده شده به صورت زیر بود:

آغازگر جلو برنده (Forward): 5'-GAT AGG CAG CTG GAC CAA CG-3'
آغازگر معکوس (Reverse): 5'-TGA TAG CGA CCC CCC AGA AC-3'

طول قطعه تکثیری حاصل از PCR، ۱۴۲ bp بود. توالی اطراف پلی مرفیسم C46T دارای جایگاه شکست برای آنزیم BsaHI بود. چنانچه پلی مرفیسم مورد نظر به صورت C یا فرم wild باشد (GACGCC)، جایگاه شکست برای آنزیم BsaHI مهیا می شود بنابراین قطعه ۱۴۲ bp به ۲ قطعه ۲۶ bp و ۱۱۶ bp شکسته می گردد (شکل ۱). ولی در صورتی که پلی مرفیسم مورد نظر به صورت T باشد (GATGCC)، جایگاه شکست آنزیم BsaHI تخریب می شود بنابراین شکستی صورت نمی گیرد.

بعد از انکوباسیون ۱۲ ساعته محصول PCR با آنزیم BsaHI در دمای ۳۷ °C، الکتروفورز روی ژل پلی اکریلامید ۸٪ در ولتاژ ۱۵۰V به مدت ۹۰ دقیقه و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، باندها در زیر نور UV قابل رؤیت بودند (شکل ۲).

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS version ۱۴ انجام شد. Student t test برای بررسی تفاوت میانگین بین گروه ها استفاده شد. سطح فعالیت FXII

ترومبوتیک در مقایسه با گروه کنترل ($3/94-0/83 = 0/95$) CI و $1/81$ و ($0/45-10/7 = 0/95$) CI بود. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر و با حجم نمونه اختیار شده نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های CT و TT، فاکتور خطر ترومبوز نیستند.

جدول ۱: خطر بیماری‌های ترومبوتیک در همراهی با ژنوتیپ‌های TT و CT

ژنوتیپ	بیمار (۱۲۰ نفر)	کنترل (۴۰ نفر)	Odds Ratio	CI 95%
CC	۵۰ (۴۱/۷)	۲۶ (۶۵)	۱ *	۱ *
CT	۵۰ (۴۱/۷)	۱۲ (۳۰)	۱/۸۱	۰/۸۳-۳/۹۴
TT	۱۰ (۸/۳)	۲ (۵)	۲/۱۷	۰/۴۵-۱۰/۷

* گروه رفرانس: افراد با ژنوتیپ CC

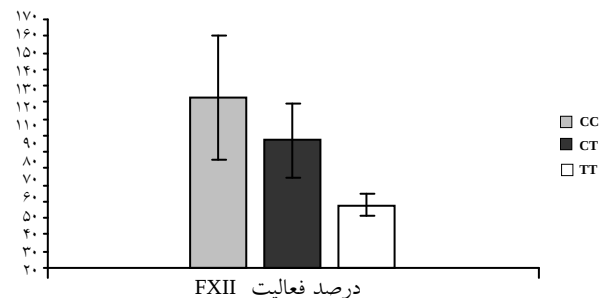
در هر دو گروه بیمار و کنترل، CC بالاترین میزان فعالیت (به ترتیب $23/4 \pm 96/5$ و $30/3 \pm 123$)، TT کمترین میزان فعالیت (به ترتیب $11/8 \pm 52/8$ و $11/3 \pm 80/5$) و CT حد متوسطی از فعالیت (به ترتیب $14/5 \pm 80/5$ و $23 \pm 97/3$) را داشت. میانگین فعالیت پلاسمایی FXII در گروه کنترل $32/2 \pm 112$ و در گروه بیماران $23 \pm 86/2$ بود و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P=0/02$). بنابراین این فرض مطرح شد که شاید کاهش فعالیت FXII در ابتلا به بیماری‌های ترومبوتیک نقش داشته باشد. برای اثبات درستی یا نادرستی این فرضیه، Odds Ratio محاسبه شد. برای تعیین سطح مبنایی به عنوان رفرانس، صدک دهم فعالیت FXII محاسبه گردید (۱۳).

جدول ۲: خطر بیماری‌های ترومبوتیک در همراهی با سطوح مختلف فعالیت FXII

درصد فعالیت FXII	بیمار	کنترل	Odds Ratio	CI = 95%
$> 68\%$	۹۶ (۸۰)	۳۸ (۹۵)	۱ *	۱ *
$< 68\%$	۲۴ (۲۰)	۲ (۵)	۴/۷۵	۱/۰۷-۲۱/۱

* گروه رفرانس: افراد با فعالیت FXII بیشتر از ۶۸٪

ژنوتیپ CC، ۱۲ نفر (۳۰٪) حامل ژنوتیپ CT و ۲ نفر (۵٪) حامل ژنوتیپ TT بودند. بنابراین فراوانی آلل C، ۸۰٪ و فراوانی آلل T، ۲۰٪ محاسبه شد. سطوح پلاسمایی فعالیت FXII بر حسب ژنوتیپ در نمودار نشان داده شده است (نمودار ۱). سطوح پلاسمایی فعالیت FXII که به عنوان عملکرد پلی مرفیسم C46T مورد ارزیابی قرار گرفت، تفاوت آماری قابل توجهی در بین گروه‌های مختلف ژنوتیپی نشان داد ($P=0/02$). ژنوتیپ TT کمترین میزان فعالیت FXII ($11/3 \pm 58$) را در مقایسه با ژنوتیپ CT ($23 \pm 97/3$) و ژنوتیپ CC ($30/3 \pm 123$) نشان داد.



نمودار ۱: توزیع سطوح فعالیت FXII بر حسب پلی مرفیسم C46T: میانگین فعالیت FXII به ترتیب از ستون چپ به راست در ژنوتیپ CC، $30/3 \pm 123$ ، در ژنوتیپ CT، $23 \pm 97/3$ و در ژنوتیپ TT، $11/3 \pm 80/5$ می‌باشد.

در هر دو گروه بیمار و کنترل، CC بیشترین درصد فراوانی و TT کمترین درصد فراوانی را به خود اختصاص داده است. درصد فراوانی CC در گروه کنترل (۶۵٪) بیشتر از گروه بیماران (۵۰٪) ولی درصد فراوانی CT و TT در گروه بیمار (به ترتیب $41/7\%$ و $8/3\%$) بیشتر از گروه کنترل (به ترتیب 30% و 5%) بود. هم چنین فراوانی آلل C و T در بیماران به ترتیب 71% و 29% و در گروه کنترل به ترتیب 80% و 20% بود. بنابراین خطر ترومبوز در ژنوتیپ‌های CT و TT از طریق محاسبه Odds Ratio (OR) بررسی شد (جدول ۱).

همان طور که در جدول ۱ دیده می‌شود، ژنوتیپ CC به عنوان گروه رفرانس در نظر گرفته شد و در مورد ژنوتیپ‌های CT و TT، به ترتیب OR برای بیماران

اول ترجمه می‌شود، زیر واحدهای ریبوزومی 40S اسکن را ادامه می‌دهند و دوباره ترجمه را از کمی فرودست‌تر شروع می‌کنند. در نتیجه دو کدون شروع ترجمه ATG مجاور هم کارایی ترجمه را کاهش می‌دهند. علاوه بر این 46T توالی همگانی پذیرفته شده کوزاک (kozak's consensus sequence) یعنی (GCC^ACCAUGG) که سیگنال شروع کننده ترجمه است را تخریب می‌کند و این مسأله ممکن است از تشخیص صحیح نقطه شروع ترجمه ممانعت کند (۱۲).

در این مطالعه فراوانی آللی C به T در یک جمعیت کوچک ایرانی (تعداد آلل: ۸۰)، ۰/۲ □ ۰/۸ بود که دقیقاً مشابه فراوانی آللی یافت شده توسط کاناجی در جمعیت قفقازی (تعداد آلل: ۴۰) می‌باشد (۱۲). هم چنین فراوانی ژنوتیپی در این مطالعه مطابق فراوانی ژنوتیپی یافت شده توسط اندلر و همکارانش در جمعیت اتریشی که نماینده جمعیت اروپای میانه است و فراوانی یافت شده توسط کوهلر و همکارانش در جمعیت انگلیسی بود (۱۹، ۱۸). بر عکس فراوانی آللی C به T یافت شده در جمعیت Oriental (ژاپنی)، ۰/۷۳/۰/۲۷ بود که می‌تواند توسط تفاوت‌های قومی و جغرافیایی توضیح داده شود (۱۲).

گزارش شده است که فعالیت پلاسمایی FXII در جمعیت Oriental (۱۲۵/۴ ± ۵۶/۳) کمتر از جمعیت قفقازی (۱۵۰ ± ۳۰/۳) است که توسط تفاوت‌های آللی بین دو نژاد قابل توجه می‌باشد (۱۲). در این مطالعه اگر چه فراوانی آللی یافت شده دقیقاً مطابق فراوانی یافت شده در جمعیت قفقازی بود، ولی میزان فعالیت FXII (۳۲/۲ ± ۱۱۲) کمتر از جمعیت قفقازی به دست آمد که این می‌تواند به دلیل تعداد کم نمونه در هر دو مطالعه باشد. علاوه بر این اگر چه پلی‌مریسم C46T در ژن FXII تعیین کننده قوی سطح پلاسمایی FXII است، ولی تنها فاکتور مؤثر نیست. هم چنان که قبلاً نیز اشاره شد، فاکتورهای دیگری نیز وجود دارند که تأثیر زیادی روی سطح FXII دارند. بنابراین مطالعه‌هایی وسیع‌تر و با در نظرگیری همه فاکتورهای مؤثر روی سطح FXII برای روشن کردن این تفاوت نیاز است.

در مورد اهمیت کلینیکی نقص FXII، نتایج متضادی

در این مطالعه صدک دهم ۶۸ بود بنابراین فعالیت FXII بیشتر از ۶۸٪، به عنوان رفرانس در نظر گرفته شد و فعالیت‌های کمتر از ۶۸٪ با آن مقایسه گردید (جدول ۲). همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، OR برای مواردی با فعالیت کمتر از ۶۸٪، (۱/۰۷-۲۱/۱) CI ۹۵٪، یک ۴/۷۵ است. بنابراین فعالیت FXII کمتر از ۶۸٪، یک فاکتور خطر برای ترومبوز می‌باشد.

بحث

مطالعه‌ها نشان داده است که میزان فعالیت FXII در بین افراد و نژادهای مختلف، به دلایل ژنتیکی و محیطی بسیار متفاوت است. فاکتورهای متعددی مثل استروژن، اینترلوکین ۶، ذرات لیپوپروتئینی خاص و آندوتلیومی که دچار نقص عملکردی است، روی سطوح FXII چه در داخل بدن موجود زنده، چه در شرایط آزمایشگاهی تأثیر می‌گذارند (۱۶-۱۴). در این مطالعه، مشاهده‌های قبلی که نشان‌دهنده کاهش سطح فعالیت FXII در افراد با ژنوتیپ 46T در ناحیه پروموتور بود، تأیید شد که این به دلیل کارایی کمتر ترجمه در جایگزینی T به جای C بوده است. با توجه به شکل ۱، دیده می‌شود که پلی‌مریسم 46T، یک کدون ATG را که 5bp فرادست کدون شروع اصلی ATG است، به وجود می‌آورد. استفاده از این کدون ATG فرضی ممکن است یک پپتید با تنها ۲ اسید آمینه متیونین و پرولین در چارچوب مختلف به وجود آورد زیرا یک کدون خاتمه TGA که 7bp در فرودست کدون ATG شروع است، ظاهر می‌شود. ولی با وجود این که کدون ATG دیگری در سمت ۵' کدون شروع اصلی در 46T-FXII وجود دارد، باز هم کدون شروع ATG دوم یا همان کدون اصلی برای ترجمه تشخیص داده می‌شود. اما مقدار FXII به طور واضحی در مقایسه با 46C کاسته می‌شود. ۲ مکانیسم مطابق با تئوری کوزاک برای توضیح این پدیده در نظر گرفته می‌شود (۱۷). یکی به دلیل این که کدون ATG اول در یک زمینه نامطلوب برای شروع قرار دارد، leaky scanning بعضی از ریبوزم‌ها را قادر می‌سازد که به دومین کدون ATG برسند و از آنجا شروع کنند. دیگری به خاطر این که ORF بسیار کوچک 9bp در استفاده از کدون ATG

مطرح است زیرا بسیاری از افراد با نقص کامل FXII، هیچ علامت بارز کلینیکی را بروز نمی دهند. بعضی از مطالعه ها سطوح پایین FXII را با خطر افزایش یافته برای ترومبوآمبولیسم سیاهرگی و شریانی همراه می دانند (۲۴-۲۰، ۱). در حالی که مطالعه های دیگری، فعالیت افزایش یافته FXII را در بیماران با سندرم های قلبی حاد گزارش کرده اند (۲۶، ۲۵). برخی نیز گزارش کرده اند که سطوح مختلف FXII هیچ تاثیری در بروز ترومبوز ندارد (۲۸، ۲۷، ۱۶). هم چنین نتایج متضادی در مورد نقش پلی مرفیسم C46T در بروز بیماری های ترومبوتیک مطرح است. برخی از دانشمندان ژنوتیپ TT را به عنوان فاکتور خطر برای سکتة ایسکمیک و ترومبوز عروق مغزی گزارش کرده اند (۲۹، ۱۳).

در این مطالعه فعالیت FXII کمتر از ۶۸٪ با خطر افزایش یافته برای ترومبوز همراه بود. ولی هیچ ارتباطی بین آلل T در حالت هتروزیگوت و هموزیگوت با خطر افزایش یافته برای بیمارهای ترومبوتیک مورد مطالعه پیدا نشد. بنابراین استنباط می شود که سطوح کم فعالیت FXII دلیل ترومبوز نیست بلکه نتیجه آن است (۳۰). می توان به این صورت استدلال نمود که مطالعه های پیشین و این مطالعه نشان می دهد وجود پلی مرفیسم C46T در FXII، در جایی که آلل T یک کدون شروع متیونین جدید را به وجود می آورد، کارآیی ترجمه را کاهش می دهد و در نتیجه فعالیت FXII کاسته می شود (۱۸، ۱۲). بنابراین پلی مرفیسم C46T تنها یک مارکر نیست بلکه تا حدی یک تعیین کننده قوی سطوح پلاسمایی FXII می باشد. علی رغم اهمیت ژنوتیپ FXII در سطوح این فاکتور، در مطالعه انجام شده توسط بچ و همکارانش و هم چنین در این مطالعه، هیچ ارتباطی بین ژنوتیپ T46T این فاکتور و بیماران

ترومبوتیک مورد مطالعه پیدا نشد (۲۴). این نشان می دهد که سطوح کم فعالیت FXII، یک فاکتور خطر نیست بلکه یک علامت خطر است (۳۰). هم چنین اندلر و همکارانش نشان دادند که با کم شدن فعالیت FXII، نسبت خطر مرگ و میر موارد ناشی از سکتة قلبی به صورت یک الگوی تقریباً خطی افزایش می یابد، ولی این نسبت مرگ و میر در افرادی که فعالیت FXII آن ها کمتر از ۱۰٪ نرمال بود افزایش نداشت در حالی که این به نظر متضاد می آید (۳۱). فرضیه پیشنهادی این است که ارتباط خطی بین فعالیت کم FXII و نسبت مرگ و میر ممکن است بازتاب پیشرفت آترواسکلروزیس و التهاب باشد و افراد با فعالیت خیلی کم FXII، احتمالاً موتاسیون هایی دارند که سبب کاهش FXII می شود اما بقای کلی آن ها را تغییر نمی دهد (۳۰). علاوه بر این ها FXII یک پروتئین پلاسمایی است که هم انعقاد و هم فیبرینولیز را فعال می کند. بنابراین پیشنهاد می شود که سطح پلاسمایی FXII در نتیجه فعال شدن ترومبوز و فیبرینولیز در طی شکل گیری ترومبوز کاسته می شود (۳۰).

نتیجه گیری

در این مطالعه نتایج مطالعه های قبلی که نشان دهنده کاهش کارآیی ترجمه و در نتیجه کاهش سطوح FXII در جایگزینی آلل T به جای C در پلی مرفیسم ۴۶ این فاکتور بود، تایید شد. علاوه بر این نشان داده شد که کاهش فعالیت FXII در بیماران ترومبوتیک به علت مصرف این فاکتور در طی انعقاد و فیبرینولیز در هنگام شکل گیری ترومبوز می باشد و در واقع کاهش فعالیت FXII در نتیجه شرایط ترومبوز به وجود آمده و یک شاخص خطر برای ترومبوز است.

References :

- Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, et al. A Quantitative-Trait Locus in the Human Factor XII Gene Influences Both Plasma Factor XII Levels and Susceptibility to Thrombotic Disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70(3): 567-74.
- Rosendaal FR. Risk factors in venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999; 82(2): 610-9.
- Meschia JF. Addressing the heterogeneity of the ischemic stroke phenotype in the Human genetics research. *Stroke* 2002; 33(12): 2770-4.
- Austin H, Chimowitz MI, Hill HA, Chaturvedi S, Wechsler LR, Wityk RJ, et al. Genetics and Stroke in the Young Study Group. Cryptogenic stroke in relation to genetic variation in clotting factors and other genetic polymorphisms among young men and women. *Stroke* 2002; 33: 2762-8.
- Franco RF, Reitsma PH. Gene polymorphism of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic

- disease. *Br J Haematol* 2001; 115: 491-506.
- 6- Souto JC, Almasi L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, *et al.* Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1452-9.
 - 7- Schousboe I, Feddersen K, Rojkaer R. Factor XIIIa is a kinetically favorable plasminogen activator. *Thromb Haemost* 1999; 82(3): 1041-6.
 - 8- Braat EA, Dooijeward G, Rijken DC. Fibrinolytic properties of activated FXII. *Eur J Biochem* 1999; 263(3): 904-11.
 - 9- Pixley RA, Colman RW. Factor XII; Hageman Factor, in: Lorand L, Mann KG, eds: *Proteolytic Enzymes in Coagulation, Fibrinolysis, and Complement Activation*. Academic Press. San Diego, CA, 1993. p. 51.
 - 10- Royle NJ, Niglei M, Cool D, MacGillivray RTA, Hamerton JL. Structural gene encoding human factor XII is located at 5q33-qter. *Somat Cell Mol Genet* 1988; 14(2): 217-21.
 - 11- Saito H, Ratnoff OD, Pensky J. Radioimmunoassay of human Hageman factor (factor XII). *J Lab Clin Med* 1976; 88(3): 506-14.
 - 12- Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N, *et al.* A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low transition efficiency and decrease in plasma FXII level. *Blood* 1998; 91(6): 2010-4.
 - 13- Santamaria A, Mateo J, Tirado I, Oliver A, Belvis R, Marti-Fabregas J, *et al.* Homozygosity of the T allele of the 46 C→T polymorphism in the F12 gene is a risk factor for acute coronary artery disease in Spanish population. *Hematologica* 2004; 89(7): 878-9.
 - 14- Citarella F, Felici A, Brouwer M, Wagstaff J, Fantoni A, Hack CE. Interleukin-6 downregulates factor XII production by human hepatoma cell line (HepG2). *Blood* 1997; 90(4): 1501-7.
 - 15- Miller GJ, Esnouf MP, Burgess AI, Cooper JA, Mitchell JP. Risk of coronary heart disease and activation of factor XII in middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(10): 2103-6.
 - 16- Colhoun HM, Zito F, Norman Chan N, Rubens MB, Fuller JH, Humphries SE. Activated factor XII levels and factor XII 46C>T genotype in relation to coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes and healthy subjects. *Atherosclerosis* 2002; 163(2): 363-9.
 - 17- Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 1989; 108(2): 229-41.
 - 18- Endler G, Exner M, Mannhalter C, Meier S, Ruzicka K, Handler S, *et al.* A Common C-T Polymorphism at nt 46 in the Promoter Region of Coagulation Factor XII is Associated With Decreased Factor XII Activity. *Thromb Res* 2001; 101(4): 255-60.
 - 19- Kohler HP, Futers TS, Grant PJ. FXII (46C→T) polymorphism and in vivo generation of FXII activity. *Thromb Haemost* 1999; 81(5): 745-7.
 - 20- Gallimore MJ, Harris SL, Jones DW, Winter M. Plasma levels of factor XII, prekallikrein and high molecular weight kininogen in normal blood donors and patients having suffered venous thrombosis. *Thromb Res* 2004; 114(2): 91-6.
 - 21- Tirado I, Soria JM, Mateo J, Oliver A, Souto JC, Santamaria A, *et al.* Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C→T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2004; 91: 899-904.
 - 22- Zito F, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Humphries SE. Association of the factor XII 46C>T polymorphism with risk of coronary heart disease (CHD) in the WOSCOPS study. *Atherosclerosis* 2002; 165(1): 153-8.
 - 23- Doggen CJ, Rosendaal FR, Meijers JC. Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: opposite and synergistic effects of factors XI and XII. *Blood* 2006; 108(13): 4045-51.
 - 24- Bach J, Endler G, Winkelmann BR, Boehm BO, Maerz W, Mannhalter C, *et al.* Coagulation factor XII activity, activated factor XII, distribution of factor XII C46T gene polymorphism and coronary risk. *J Thromb Haemost* 2008; 6(2): 291-6.
 - 25- Ishii K, Oguchi S, Murata M, Mitsuyoshi Y, Takeshita E, Ito D, *et al.* Activated factor XII levels are dependent on factor XII 46C/T genotypes and factor XII zymogen levels, and are associated with vascular risk factors in patients and healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11(3): 277-84.
 - 26- Altieri P, Devoto E, Spallarossa P, Rossettin P, Garibaldi S, Bertero G, *et al.* Acute coronary syndromes do not promote prolonged in vivo FXII-dependent prothrombotic activity. *Thromb Res* 2005; 115(1-2): 65-72.
 - 27- Endler G, Mannhalter C, Sunder-Plassmann H, Lalouschek W, Kapiotis S, Exner M, *et al.* Homozygosity for the C→T polymorphism at nucleotide 46 in 5'-untranslated region of the factor XII gene protects from development of acute coronary syndrome. *Br J haematol* 2001; 115: 1007-9.
 - 28- Oguchi S, Ito D, Murata M, Yoshida T, Tanahashi N, Fukuuchi Y, *et al.* Genotype distribution of the 46C/T polymorphism of coagulation factor XII in the Japanese population: absence of its association with ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Haemost* 2000; 83(1): 178-9.
 - 29- Reuner KH, Jenetzky E, Aleu A, Litfin F, Mellado P, Kloss M, *et al.* Factor XII C46T gene polymorphism and the risk of cerebral venous thrombosis. *Neurology* 2008; 70(2): 129-32.
 - 30- Kanaji T. Lower factor XII activity is a risk marker rather than a risk factor for cardiovascular disease: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2008; 6(6): 1053-4.
 - 31- Endler G, Marsik C, Jilma B, Schickbauer T, Quehenberger P, Mannhalter C. Evidence of a U-shaped association between factor XII activity and overall survival. *J Thromb Haemost* 2007; 5 (6) : 1143-8.

Original Article

Correlation of FXII 46CT polymorphism with FXII activity and risk of thrombotic diseases

Rasi Ghaemi P.¹, Kazemi A.¹, Ala F.², Jazebi M.², Razmkhah F.¹¹Hematology Department, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran²Center of Pediatric Hemophilia, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

There are a number of well-characterized genetic defects that lead to increased risk of thrombosis. Results from previous studies have indicated that plasma FXII activity levels are strongly determined by a 46CT polymorphism in the FXII gene. In the present study, the risk of thrombophilic diseases related to this polymorphism was investigated.

Materials and Methods

One hundred sixty individuals were included in this case-control study: 120 patients diagnosed with thrombophilia and 40 age-gender-matched controls. For each subject, FXII activity level was measured using a one-step clotting assay, and 46CT polymorphism was genotyped using a PCR-RFLP techniques.

Results

In this study, FXII activity < 68% was associated with an increased risk of thrombophilia with an adjusted odds ratio of 4.75 (CI 95% = 1.07 – 21.1). In CT and TT genotypes, the adjusted odds ratios were respectively 1.81 (CI 95% = 0.83-3.94) and 2.17 (CI 95% = 0.45-10.7) for thrombotic patients compared with the controls. Thus, we did not find any association of the mutated T allele in the heterozygous or homozygous state with an increased risk of thrombophilia.

Conclusions

This study showed that 46CT is a strong determinant of FXII activity. However, there was not any association between mutant T allele and increased risk of thrombosis. Therefore, it was speculated that reduced FXII activity is not the cause but the outcome of thrombosis. In other words, lower FXII activity is not a risk factor for thrombosis, rather it simply represents a risk marker.

Key words: Thrombosis, polymorphism (Genetic), Odds Ratio
Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 7(1): 1-8

Received: 9 Aug 2009

Accepted: 17 Mar 2010

Correspondence: Kazemi A., PhD of Hematology. Associate Professor of Hematology Department, Iran University of Medical Sciences.

P.O.Box: 14155-6183, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88052982; Fax : (+9821) 88054355

E-mail: iakazemi@iums.ac.ir