

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. مهم‌ترین 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 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 مسؤل: 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 می‌توانند ژنتیکی یا اکتسابی باشند. بعضی از علت‌های اکتسابی از قبیل افزایش سن، بی‌حرکی، جراحی ارتوپدی، داروهای ضد بارداری خوراکی و سندرم آنتی‌فسفولیپید، قرن‌هاست که شناخته شده‌اند. اما علت‌های ژنتیکی مثل کمبود آنتی‌ترومبین، نقص PrC، فاکتور V لیدن و پروترومبین 20210A اخیراً شناخته شده‌اند (۲).

امروزه تحقیقات کنونی در مورد بیماری‌های پیچیده‌ای مثل سکتة قلبی، بیشتر بر روی تعیین واریانت‌های ژنتیکی که خطر ابتلا به بیماری‌های ترومبوتیک را افزایش می‌دهند متمرکز شده است (۳-۵). در میان مطالعه‌ها 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 بیماری‌های ترومبوتیک نشان داده است (۶). بنابراین بعضی از پلی مرفیسم‌ها و موتاسیون‌ها که باعث ایجاد تغییر در این فاکتور خطر فیزیولوژیکی می‌شوند، استعداد ابتلا به ترومبوز را هم تحت تاثیر قرار می‌دهند.

FXII یک سرین پروتئاز ۸۰ کیلودالتونی با غلظت پلاسمايي $30 \mu\text{g/ml}$ می‌باشد. تماس FXII با سطوحی با شارژ منفی، منجر به شکاف پروتئولیتیک و فعال شدن آن می‌شود. FXIIa می‌تواند FXI را فعال کند و هم‌چنین به نظر می‌رسد در تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین هم مشارکت می‌نماید (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 می‌باشد 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، منقطه‌ای 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 می‌باشد (۱۰). غلظت پلاسمايي 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 می‌شود (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 هم‌چنین اثر پلی مرفیسم C46T در ژن FXII و میزان فعالیت این فاکتور در ابتلا به بیماری‌های ترومبوتیک توسط یک مطالعه شاهد-موردی بررسی شد. پیدا کردن چنین ارتباط‌هایی به شناسایی مکانیزم‌های درگیر در ترومبوز کمک کرده و می‌تواند ارایه‌دهنده راه حل‌های مناسب برای کاهش موارد مرگ و میر ناشی از ترومبوز باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع مورد - شاهدهی بود. در این پروژه، از نمونه خون ۱۲۰ بیمار مراجعه‌کننده به مرکز جامع درمان کودکان هموفیل ایران که مبتلا به بیماری‌های 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 هیچ‌گونه سابقه‌ای از بیماری‌های 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 (۱۳ ± ۴۲) سال و گروه کنترل متشکل از ۱۸ (۴۵٪) فرد مؤنث و ۲۲ (۵۵٪) فرد مذکر با رنج سنی ۶۰ - ۲۰ (۱۲ ± ۴۱) سال بودند.

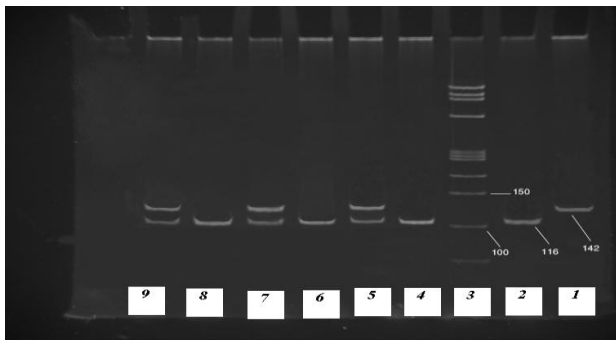
نمونه خون گرفته شده از هر دو گروه ۱۰ ml بود که ۲ml آن بر روی ضد انعقاد سیترا ته برای اندازه‌گیری میزان فعالیت FXII و ۸ ml آن بر روی ضد انعقاد EDTA برای انجام آزمایش‌های ژنتیکی تهیه شد. پلاسماي نمونه سیترا ته

BsaHI site (if Y=C)
FXII C46T polymorphism



GATAGGCAGCTGGACCAACGGACGGAYGC
CATGAGGGCTCTGCTGCTCCTGGGGTTCCT
GCTGGTGAGCTTGGAGTCAACACTTTCGGT
GAGTGCTGTGGGAACCAGGATTGTCCCAG
GATTGTTCTGGGGGGTTCGCTATCA

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 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. هم چنین 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 (-4C→T)، C46T، DNA توسط روش فنل - کلروفورم از سلول های خونی جمع آوری شده در EDTA استخراج شد. سپس آگزون 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 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 ۱۴ version انجام شد. Student t test برای بررسی تفاوت میانگین بین گروه ها استفاده شد. سطح فعالیت FXII

ترومبوتیک در مقایسه با گروه کنترل (۳/۹۴-۰/۸۳ = ۰/۹۵) CI و ۱/۸۱ (۱۰/۷-۰/۴۵ = ۰/۹۵) 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 (نفر ۱۲۰)	کنترل (نفر ۴۰)	Odds Ratio	CI 95%
CC	(۵۰)۶۰	(۶۵)۲۶	۱ *	۱ *
CT	(۴۱/۷)۵۰	(۳۰)۱۲	۱/۸۱	۰/۸۳-۳/۹۴
TT	(۸/۳)۱۰	(۵)۲	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 $۹۶/۵ \pm ۲۳/۴$ و $۱۲۳ \pm ۳۰/۳$)، TT کمترین میزان فعالیت (به ترتیب $۵۲/۸ \pm ۱۱/۸$ و $۵۸ \pm ۱۱/۳$) و CT حد متوسطی از فعالیت (به ترتیب $۸۰/۵ \pm ۱۴/۵$ و $۹۷/۳ \pm ۲۳$) را داشت. میانگین فعالیت پلاسمایی FXII در گروه کنترل $۱۱۲ \pm ۳۲/۲$ و در گروه بیماران $۸۶/۲ \pm ۲۳$ بود و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P=۰/۰۲$). 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).

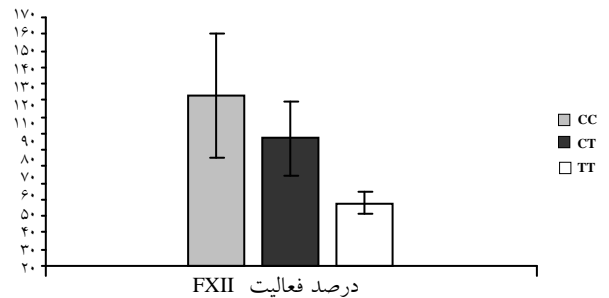
جدول ۲: خطر بیماری‌های ترومبوتیک در همراهی با سطوح مختلف فعالیت FXII

درصد فعالیت FXII	بیمار	کنترل	Odds Ratio	CI = 95%
> ۶۸٪	(۸۰)۹۶	(۹۵)۳۸	۱ *	۱ *
< ۶۸٪	۲۴(۲۰)	(۵)۲	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 ($P=۰/۰۰۲$). ژنوتیپ TT کمترین میزان فعالیت FXII ($۵۸ \pm ۱۱/۳$) را در مقایسه با ژنوتیپ CT ($۹۷/۳ \pm ۲۳$) و ژنوتیپ CC ($۱۲۳ \pm ۳۰/۳$) 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، $۱۲۳ \pm ۳۰/۳$ ، در ژنوتیپ CT، $۹۷/۳ \pm ۲۳$ و در ژنوتیپ TT، $۵۸ \pm ۱۱/۳$ 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 $۴۱/۷٪$ و $۸/۳٪$) بیشتر از گروه کنترل (به ترتیب ۳۰٪ و ۵٪) بود. هم چنین فراوانی آلل C و T در بیماران به ترتیب $۷۱٪$ و $۲۹٪$ و در گروه کنترل به ترتیب $۸۰٪$ و $۲۰٪$ 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^A₆CCAUGG) 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 کوهرلر و همکارانش در جمعیت انگلیسی بود (۱۹، ۱۸). بر عکس فراوانی آللی C به T یافت شده در جمعیت Oriental (ژاپنی)، ۰/۳۳/۰/۲۷ بود که می‌تواند توسط تفاوت‌های قومی و جغرافیایی توضیح داده شود (۱۲).

گزارش شده است که فعالیت پلاسمایی FXII در جمعیت Oriental (۵۶/۳ ± ۱۲۵/۴) کمتر از جمعیت قفقازی (۳۰/۳ ± ۱۵۰) 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٪، (۱/۲۱-۱/۰۷ = ۹۵٪ CI) 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 سطح 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

ترومبوتیک مورد مطالعه پیدا نشد (۲۴). این نشان می‌دهد 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 سکنه قلبی به صورت یک الگوی تقریباً خطی افزایش می‌یابد، ولی این نسبت مرگ و میر در افرادی که فعالیت FXII آن‌ها کمتر از ۱۰٪ نرمال بود افزایش نداشت در حالی که این به نظر متضاد می‌آید (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 موتاسیون‌هایی دارند که سبب کاهش FXII می‌شود اما بقای کلی آن‌ها را تغییر نمی‌دهد (۳۰). علاوه بر این‌ها FXII یک پروتئین پلاسمایی است که هم انعقاد و هم فیبرینولیز را فعال می‌کند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که سطح پلاسمایی FXII در نتیجه فعال شدن ترومبوز و فیبرینولیز در طی شکل‌گیری ترومبوز کاسته می‌شود (۳۰).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نتایج مطالعه‌های قبلی که نشان‌دهنده کاهش کارایی 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 شکل‌گیری ترومبوز می‌باشد و در واقع کاهش فعالیت FXII در نتیجه شرایط ترومبوز به وجود آمده و یک شاخص خطر برای ترومبوز است.

مطرح است زیرا بسیاری از افراد با نقص کامل FXII، هیچ علامت بارز کلینیکی را بروز نمی‌دهند. بعضی از مطالعه‌ها سطوح پایین FXII را با خطر افزایش یافته برای ترومبوآمبولیسم سیاهرگی و شریانی همراه می‌دانند (۲۴-۲۰، ۱). در حالی که مطالعه‌های دیگری، فعالیت افزایش یافته FXII را در بیماران با سندرم‌های قلبی حاد گزارش کرده‌اند (۲۶، ۲۵). برخی نیز گزارش کرده‌اند 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 بیماری‌های ترومبوتیک مطرح است. برخی از دانشمندان ژنوتیپ TT را به عنوان فاکتور خطر برای سکنه ایسکمیک و ترومبوز عروق مغزی گزارش کرده‌اند (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 می‌شود که سطوح کم فعالیت FXII دلیل ترومبوز نیست بلکه نتیجه آن است (۳۰). می‌توان به این صورت استدلال نمود که مطالعه‌های پیشین و این مطالعه نشان می‌دهد وجود پلی مرفیسم C46T در FXII، در جایی که آلل T یک کدون شروع متیونین جدید را به وجود می‌آورد، کارایی ترجمه را کاهش می‌دهد و در نتیجه فعالیت FXII کاسته می‌شود (۱۸، ۱۲). بنابراین پلی مرفیسم C46T تنها یک مارکر نیست بلکه تا حدی یک تعیین کننده قوی سطوح پلاسمایی FXII می‌باشد. علی‌رغم 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

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, Almasy 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 XIIa 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.¹*¹*Hematology Department, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*²*Center 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