Archive of SID

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۷ شماره ۱ بهار ۸۹ (۸-۱)

مقاله پژوهشی

ارتباط پلی‌مرفیسم 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 پلی‌مرفیسم C46T در ژن این فاکتور تعیین می‌شود. در این مطالعه، خطر ابتلا به بیماری‌های ترومبوتیک در همراهی با این پلی‌مرفیسم بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع مورد ـ شاهدی 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 پلی‌مرفیسم 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(۲۱/۱- ۱/۰۷ = ٪۹۵ CI و ۴/۷۵ =OR). در مورد ژنوتیپ‌های CT و TT به ترتیب OR برای بیماران ترومبوتیک در مقایسه با کنترل، (۳/۹۴-۰/۸۳ = ٪۹۵ CI) ۱/۸۱ و (۱۰/۷-۰/۴۵ = ٪۹۵ CI) ۲/۱۷ بود.

نتیجه گیری

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

کلمات کلیدی: ترومبوز، پلی‌مرفیسم(ژنتیک)، نسبت شانس

تاریخ دریافت : ۸۸/ ۵/۱۸
تاریخ پذیرش : ۸۸/۱۲/۲۶

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

www.SID.ir

Archive of SID

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، بی‌تحرکی، 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 سکته قلبی، بیشتر بر روی تعیین واریانت‌های ژنتیکی که خطر ابتلا به بیماری‌های ترومبوتیک را افزایش می‌دهند متمرکز شده است(۵-۳). 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 پلی‌مرفیسم‌ها 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 پلاسمایی ۳۰ µg/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 هم چنین به نظر می‌رسد در تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین هم مشارکت می‌نماید(۸، ۷). 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 تیپI، 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 exon 14 است. محل ژنی آن بر روی کروموزوم ۵ و در ناحیه 5q33-qter می‌باشد(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 می‌شود(۱۲).

در این مطالعه فراوانی پلی‌مرفیسم C46T در یک نمونه تصادفی از بالغین سالم ارزیابی و بررسی شد که آیا این پلی‌مرفیسم با فعالیت کمتر FXII همراه بوده یا نه و هم چنین اثر پلی‌مرفیسم 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 روش ها

مطالعه انجام شده از نوع مورد ـ شاهدی 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 نفرکنترل 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 وکنترل 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 ml ۱۰ بود که ۲ml آن بر روی ضد انعقاد سیتراته برای اندازه‌گیری میزان فعالیت FXII و ml ۸ آن بر روی ضد انعقاد EDTA برای انجام آزمایش‌های ژنتیکی تهیه شد. پلاسمای نمونه سیتراته

www.SID.ir

Archive of SID

بلافاصله بعد از خونگیری توسط سانتریفوژ بـا دور ۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق جدا شد و سپس پلاسمای جدا شده به لوله‌های پلاستیکی منتقل شد و تا زمان انجـام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. نمونه‌های خون تهیه شده بر روی EDTA از زمان اخذ نمونه تا زمـان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

برای سنجیدن فعالیت FXII، زمان لخته شدن با اسـتفاده از پلاســمای فاقــد FXII و معــرف aPTT (تکنوکلــون ـ روسیه) توسط دستگاه کواگولومتر Ca-1500 (سیس مکـس ـ آلمان) اندازه‌گیری شد.

برای بررسی پلی‌مرفیسم(C46T (-4C→T، DNA توسـط روش فنل ـ کلروفرم از سلول‌های خونی جمع‌آوری شـده در EDTA استخراج شد. سپس اگـزون ۱ ژن FXII توسـط PCR تکثیر گردیـد. تـوالی آغازگرهـای اسـتفاده شـده بـه صورت زیر بود:

آغـازگر جلوبرنـده(Forward): 5'-GAT AGG CAG CTG GAC CAA CG-3'
آغـازگر معکـوس(Reverse): 5'-TGA TAG CGA CCC CCC AGA AC-3'

طول قطعه تکثیری حاصـل از PCR ، ۱۴۲ bP بـود. تـوالی اطراف پلـی‌مرفیـسم C46T دارای جایگـاه شکـست بـرای آنزیم BsaHI بود. چنانچه پلی‌مرفیسم مورد نظر به صـورت C یا فرم wild باشـد(GACGCC)، جایگـاه شکـست بـرای آنزیم BsaHI مهیا می‌شود بنابراین قطعه ۱۴۲ bp به ۲ قطعه ۲۶ bp و ۱۱۶ bp شکـسته مـی‌گـردد(شـکل ۱). ولـی در صــورتی کــه پلــی‌مرفیــسم مــورد نظــر بــه صــورت T باشد(GATGCC)، جایگاه شکست آنـزیم BsaHI تخریـب می‌شود بنابراین شکستی صورت نمی‌گیرد.

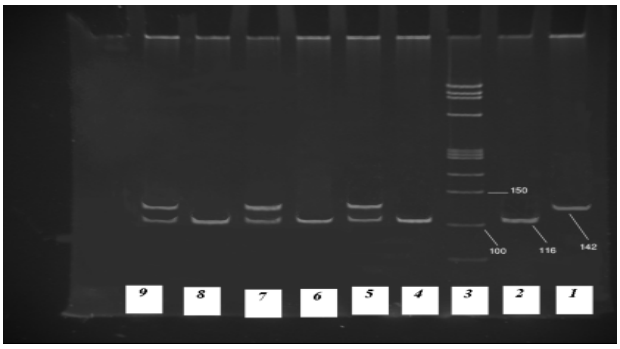
بعد از انکوباسیون ۱۲ سـاعته محـصول PCR بـا آنـزیم BsaHI در دمـــــای ۳۷ °C ، الکتروفـــــورز روی ژل پلـی‌آکریلامیـد ۸٪ در ولتـاژ ۱۵۰V بـه مـدت ۹۰ دقیقـه و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، باندها در زیر نور UV قابـل رؤیت بودند(شکل ۲).

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نـرم‌افـزار SPSS ۱۴ version انجام شـد. Student t test بـرای بررسـی تفـاوت میانگیـن بیـن گـروه‌هـا استفـاده شـد. سطح فعالیت FXII

BsaHI site (if Y=C)
FXII C46T polymorphism

GATAGGCAGCTGGACCAACGGACGGA**Y**GC
CATGAGGGCTCTGCTGCTCCTGGGGTTCCT
GCTGGTGAGCTTGGAGTCAACACTTTCGGT
GAGTGCTGTGGGAACCAGGATTGTCCCAG
GATTGTTCTGGGGGGTCGCTATCA

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



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR روی ژل پلی‌اکریلامید: به ترتیب از سمت راست، ستون ۱ ژنوتیپ TT ، ستون‌های ۸،۶،۴،۲ ژنوتیپ CC ، ستون‌های ۹،۷،۵ ژنوتیپ CT و ستون ۳ مارکر استفاده شده برای تخمین اندازه قطعات حاصله از شکست را نشان می‌دهند.

پلاسمایی در میان گـروه‌های مختلـف ژنوتیپـی بـا استفاده از ANOVA یک سویه بررسی شد. ۰/۰۵ >p از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.Odds ratio برای بررسـی خطـر نسبی همراه ترومبوز محاسبه شد. هم‌چنین برای بـه دسـت آوردن سـطح مبنـای رفـرانس بـرای FXII ، صـدک دهـم محاسبه گردید.

یافته ها

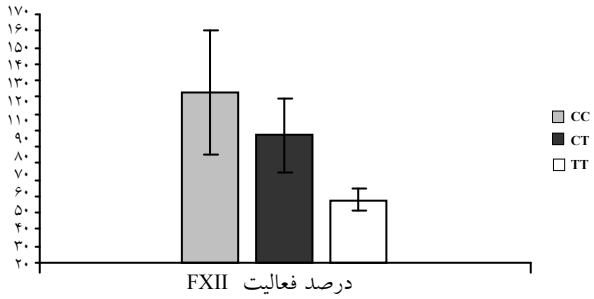
در بیـن ۴۰ فرد گـروه کنتـرل، ۲۶ نفــر(۶۵٪) حامــل

www.SID.ir

Archive of SID

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 پلی‌مرفیسم 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 (۱۱/۳ ± ۵۸) را در مقایسه با ژنوتیپ CT (۲۳ ± ۹۷/۳) و ژنوتیپ CC (۳۰/۳ ± ۱۲۳) نشان داد.



نمودار ۱: توزیع سطوح فعالیت FXII بر حسب پلی‌مرفیسم C46T : میانگین فعالیت FXII به ترتیب از ستون چپ به راست در ژنوتیپ CC، ۳۰/۳ ± ۱۲۳ ، در ژنوتیپ CT ،۲۳ ± ۹۷/۳ و در ژنوتیپ TT ، ۱۱/۳ ± ۵۸ 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 OR (Odds Ratio) 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 ترومبوتیک در مقایسه با گروه کنترل(۳/۹۴-۰/۸۳ = ۹۵٪ CI) ۱/۸۱ و (۱۰/۷-۰/۴۵ = ۹۵٪ CI) ۲/۱۷ 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 CT و TT

ژنوتیپ	بیمار (۱۲۰ نفر)	کنترل (۴۰ نفر)	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 ۲۳/۴ ± ۹۶/۵ و ۳۰/۳ ± ۱۲۳)، TT کمترین میزان فعالیت(به ترتیب ۱۱/۸ ± ۵۲/۸ و ۱۱/۳ ± ۵۸) و CT حد متوسطی از فعالیت(به ترتیب ۱۴/۵ ± ۸۰/۵ و۲۳ ± ۹۷/۳) را داشت. میانگین فعالیت پلاسمایی FXII در گروه کنترل ۳۲/۲ ± ۱۱۲ و در گروه بیماران ۲۳ ± ۸۶/۲ 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 بیمارهای 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

www.SID.ir

Archive of SID

در این مطالعه صدک دهم ۶۸ بود بنابراین فعالیت FXII بیشتر از ۶۸٪ ، بـه عنـوان رفـرانس در نظـر گرفتـه شـد و فعالیت‌های کمتر از ۶۸٪ با آن مقایسه گردید(جدول ۲).

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده مـی‌شـود، OR بـری مواردی با فعالیـت کمتـر از ۶۸٪، (۱/۰۷-۲۱/۱ = ۹۵٪ CI) ۴/۷۵ اسـت. بنـابراین فعالیـت FXII کمتـر از ۶۸٪ ، یـک فاکتور خطر برای ترومبوز می‌باشد.

بحث

مطالعه‌ها نشان داده است که میزان فعالیت FXII در بـین افراد و نژادهای مختلف، به دلایل ژنتیکی و محیطی بـسیار متفـاوت اسـت. فاکتورهـای متعـددی مثـل اسـتروژن، اینترلوکین۶ ، ذرات لیپوپروتئینی خاص و آنـدوتلیومی کـه دچار نقص عملکـردی اسـت، روی سـطوح FXII چـه در داخل بدن موجود زنده، چه در شرایط آزمایـشگاهی تـاثیر می‌گذارند(۱۶-۱۴). در این مطالعه، مشاهده‌های قبلـی کـه نشان‌دهنده کاهش سطح فعالیت FXII در افراد بـا ژنوتیـپ 46T در ناحیه پروموتور بود، تایید شـد کـه ایـن بـه دلیـل کارایی کمتر ترجمه در جایگزینی T به جای C بوده است.

با توجه به شکل ۱، دیده می‌شود که پلی‌مرفیـسم 46T ، یک کدون ATG را که 5bp فرادست کـدون شـروع اصـلی ATG است، به وجود می‌آورد. استفاده از این کـدون ATG فرضی ممکن است یک پپتید با تنها ۲ اسید آمینه متیونین و پرولین در چارچوب مختلف به وجود آورد زیرا یک کدون خاتمـه TGA کـه 7bp در فرودسـت کـدون ATG شـروع است، ظاهر می‌شود. ولی بـا وجـود ایـن کـه کـدون ATG دیگـری در سـمت '۵ کـدون شـروع اصـلی در 46T-FXII وجود دارد، باز هم کدون شروع ATG دوم یا همان کـدون اصلی برای ترجمه تشخیص داده می‌شود. امـا مقـدار FXII به طـور واضـحی در مقایـسه بـا 46C کاسـته مـی‌شـود. ۲ مکانیسم مطابق با تئوری کوزاک برای توضیح این پدیده در نظر گرفته می‌شود(۱۷). یکی به دلیل این کـه کـدون ATG اول در یک زمینه نامطلوب بـرای شـروع قـرار دارد، leaky scanning بعضی از ریبوزم ها را قادر می‌سازد که به دومین کدون ATG برسند و از آنجا شروع کنند. دیگری به خـاطر این که ORF بسیار کوچک 9bp در استفاده از کـدون ATG 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 همگـانی پذیرفتـه شـده کـوزاک (kozak's consensus sequence) یعنی ($GCC^{A}_{G}CCAUGG$) کـه سـیگنال شـروع کننده ترجمه است را تخریب می‌کند و ایـن مـسأله ممکـن است از تـشخیص صـحیح نقطـه شـروع ترجمـه ممانعـت کند(۱۲).

در این مطالعه فراوانی آللـی C بـه T در یـک جمعیـت کوچک ایرانی(تعداد آلل: ۸۰)، ۰/۲ / ۰/۸ بـود کـه دقیقـا" مشابه فراوانی آللی یافت شده توسط کانـاجی در جمعیـت قفقازی(تعداد آلل: ۴۰) می‌باشـد(۱۲). هـم چنـین فراوانـی ژنوتیپی در این مطالعه مطابق فراوانی ژنوتیپی یافـت شـده توسط اندلر و همکارانش در جمعیت اتریشی کـه نماینـده جمعیت اروپای میانه است و فراوانـی یافـت شـده توسـط کوهلر و همکارانش در جمعیت انگلیسی بود(۱۹، ۱۸). بـر عکس فراوانی آللی C به T یافت شده درجمعیت Oriental (ژاپنی) ،۰/۲۷ / ۰/۷۳ بود که می‌تواند توسـط تفـاوت‌هـای قومی و جغرافیایی توضیح داده شود(۱۲).

گـزارش شـده اسـت کـه فعالیـت پلاسـمایی FXII در جمعیـــت Oriental (۵۶/۳ ± ۱۲۵/۴) کمتـــر از جمعیـــت قفقازی(۳۰/۳ ± ۱۵۰) است که توسط تفاوت‌های آللی بین دو نژاد قابل توجیه می‌باشد(۱۲). در این مطالعـه اگـر چـه فراوانی آللی یافت شده دقیقا" مطابق فراوانی یافت شده در جمعیت قفقازی بـود، ولـی میـزان فعالیـت FXII (۳۲/۲ ± ۱۱۲) کمتـر از جمعیـت قفقـازی بـه دسـت آمـد کـه ایـن می‌تواند به دلیل تعداد کم نمونه در هـر دو مطالعـه باشـد. علاوه بر این اگر چه پلی‌مرفیسم C46T در ژن FXII تعیـین کننده قوی سطح پلاسمایی FXII است، ولـی تنهـا فـاکتور مؤثر نیست. هم چنان که قبلا" نیز اشـاره شـد، فاکتورهـای دیگری نیز وجود دارند که تـأثیر زیـادی روی سـطح FXII دارند. بنابراین مطالعه‌هایی وسیع‌تر و با در نظرگیـری همـه فاکتورهای مؤثر روی سطح FXII برای روشـن کـردن ایـن تفاوت نیاز است.

در مـورد اهمیـت کلینیکـی نقص FXII ، نتایج متضادی

www.SID.ir

Archive of SID

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 پلی‌مرفیسم C46T در بروز بیماری‌های ترومبوتیک مطرح است. برخی از دانشمندان ژنوتیپ TT را به عنوان فاکتور خطر برای سکته 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 پلی‌مرفیسم C46T در FXII ، در جایی که آلل T یک کدون شروع متیونین جدید را به وجود می‌آورد، کارآیی ترجمه را کاهش می‌دهد و در نتیجه فعالیت FXII کاسته می‌شود(۱۸، ۱۲). بنابراین پلی‌مرفیسم 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 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 سکته قلبی به صورت یک الگوی تقریبا" 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 کارآیی ترجمه و در نتیجه کاهش سطوح FXII در جایگزینی آلل T به جای C در پلی‌مرفیسم 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.

References :

1- 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.
2- Rosendaal FR. Risk factors in venous thrombotic disease. Thromb Haemost 1999; 82(2): 610-9.
3- Meschia JF. Addressing the heterogeneity of the ischemic stroke phenotype in the Human genetics research. Stroke 2002; 33(12): 2770-4.
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.
5- Franco RF, Reitsma PH. Gene polymorphism of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic

www.SID.ir

Archive of SID

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, Rojkjaer 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 5́-untranslated regon 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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*

www.SID.ir