

The protective effect of FXIII Val34Leu polymorphism against deep vein thrombosis: a report from Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO)

SM Sajadi* S Samie** M Kheyrandish*** MH Ahmadi**** Z Atae*****

* MSc in Hematology, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

**Corresponding author, MSc in Biochemistry, Iranian Blood Transfusion Organization Research Center, Tehran, Iran

**PhD in Immunology, Iranian Blood Transfusion Organization Research Center, Tehran, Iran

**** MSc in Hematology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

*****BSc in Biology, Iranian Blood Transfusion Organization Research Center, Tehran, Iran

*Abstract

Background: The coagulation factor XIII is a pro-transglutaminase enzyme with tetrameric structure. An exchange of G for A in exon 2 of A subunit results in replacement of valine with leucine in amino acid 34. As a result of this substitution mutation, the clots produced are fragile and loose therefore it seems that FXIII Val34Leu polymorphism acts as a factor for individual protection against thrombosis

Objectives: To determine the prevalence and role of FXIII Val34Leu polymorphism against deep vein thrombosis.

Methods: This was a retrospective case-control study performed on 116 patients with DVT who were referred to Thrombosis and Homeostasis Laboratory affiliated to Iranian Blood Transfusion Organization. Also, 100 healthy individuals (blood donors) were recruited as control. Following DNA extraction and application of PCR and RFLP techniques in presence of restriction enzyme CfoI, the genotypes of FXIII Val34Leu polymorphism were identified. The data were analyzed using chi square test as well as calculation of OD ratio and 95% confidence interval.

Findings: The prevalence of FXIII Val34Leu polymorphism among the case and control groups was 22.4% and 37.4%, respectively. While the allele frequency of leucine in case group was 14.7% it was 20.2 % in control group. No significant correlation between polymorphism and sex was established.

Conclusion: According to our data, no association between the FXIII Val34Leu polymorphism and protection against deep vein thrombosis was demonstrated. Therefore, it seems that this polymorphism occurs as a natural phenomenon and unaffected by gender.

Keywords: Polymorphism, Coagulation factor XIII, Deep Vein Thrombosis, PCR-RFLP

Corresponding Address: IBTO bldg, Hemmat Exp. Way, Next to the Milad Tower, P.O.Box 14665-1157, Tehran, Iran

Email: S.Samiee@ibto.ir

Tel: +98 912 3873143

Received: 2008/09/11

Accepted: 2009/06/21

نقش محافظت‌کننده پلی‌مرفیسم FXIII Val34Leu در مقابل ترمبوز ورید عمقی در بیماران

مراجعه‌کننده به سازمان انتقال خون ایران

سید مهدی سجادی* شهرام سمیعی** دکتر مریم خیراندیش*** محمد حسین احمدی**** زهرا عطایی*****

* مری و عضو هیأت علمی گروه هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایلام
 ** مری و عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
 *** استادیار و عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
 **** مری و عضو هیأت علمی گروه علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
 ***** کارشناس بیولوژی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

آدرس مکاتبه: تهران، تقاطع شیخ فضل... و شهید همت، ستاد مرکزی سازمان انتقال خون ایران، مرکز تحقیقات، تلفن ۰۹۱۲۳۸۳۱۴۳

Email: S.Samiee@ibto.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۳۱

*چکیده

زمینه: یک جهش (جای‌گزینی تیمیدین با گواتین) در اگزون ۲ از زیر واحد A در عامل ۱۳ انعقادی، ساختارهای فیبرینی ضعیف‌تری را ضمن فرآیند انعقاد به وجود می‌آورد که به نظر می‌رسد نتیجه آن محافظت شخص در مقابل حمله‌های ترمبوز وریدی است.

هدف: مطالعه به منظور تعیین شیوع و نقش محافظت‌کننده پلی‌مرفیسم FXIII Val34Leu در مقابل ترمبوز وریدهای عمقی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه موردی - شاهدهی بر روی ۱۱۶ بیمار مبتلا به ترمبوز ورید عمقی که از دی ماه سال ۱۳۸۱ تا خرداد ماه ۱۳۸۴ به آزمایشگاه مرکزی سازمان انتقال خون (تهران) ارجاع داده شده بودند و ۱۰۰ فرد همسان از نظر سن و جنس انجام شد. پس از استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، ژنوتیپ‌های پلی‌مرفیسم FXIII Val34Leu با روش RFLP و در حضور آنزیم محدودگر CfoI شناسایی شدند. داده‌ها با آزمون آماری مجذور کای تحلیل شدند.

یافته‌ها: شیوع پلی‌مرفیسم FXIII Val34Leu در گروه بیماران و افراد سالم به ترتیب ۲۲/۴٪ و ۳۷/۴٪ به دست آمد. فراوانی آلل لوسین در دو گروه بیماران و افراد سالم به ترتیب ۱۴/۷٪ و ۲۰/۲٪ بود. بین شیوع این پلی‌مرفیسم و جنسیت افراد نیز ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. **نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌ها به نظر می‌رسد، پلی‌مرفیسم FXIII Val34Leu فقط یک رخداد طبیعی است و فاقد تأثیر محافظتی در برابر ترمبوز ورید عمقی است.

کلیدواژه‌ها: پلی‌مرفیسم، عامل ۱۳ انعقادی، ترمبوز ورید عمقی، PCR-RFLP

*مقدمه

شروع می‌شود.^(۴-۶) سپس در حضور یون‌های کلسیم، FXIII شکل فعال خود را پیدا می‌کند.^(۵،۴) چهار نوع پلی‌مرفیسم شایع در ژن عامل ۱۳ انعقادی وجود دارد که باعث تغییرات آمینواسیدی در موقعیت‌های Val34Leu، Val650Ile، Pro564Leu و Glu651Gln می‌شوند.^(۴) اخیراً پلی‌مرفیسم دیگری تحت عنوان Tyr204Phe شناخته شده است.^(۱) در میان این پلی‌مرفیسم‌ها، پلی‌مرفیسم FXIII Val34Leu مهم‌ترین نقش را در فعالیت عامل ۱۳ انعقادی دارد.^(۷) این پلی‌مرفیسم شایع باعث جای‌گزینی نوکلئوتید گوانین (G) به جای تیمیدین (T) (جهش بی‌معنی از نوع

عامل ۱۳ انعقادی خون یک پروترانس گلوتامیناز با ساختار تترامریک است که از دو زیر واحد پیش‌آنزیمی مشابه (FXIIIa) و دو زیر واحد پروتئینی ناقل (FXIIIb) تشکیل شده است.^(۱) عامل XIII برای پایدار شدن شبکه فیبرینی پس از اثر ترومبین بر فیبرینوژن و تشکیل لخته ضروری است. ژن کدکننده FXIIIa با ۱۶۰ کیلو باز در موقعیت ۲۴-۲۵ بازوی کوتاه کروموزوم ۶ قرار دارد و پروتئینی متشکل از ۷۳۱ آمینو اسید را بیان می‌کند.^(۳،۲) در حالت طبیعی عامل ۱۳ انعقادی غیرفعال است و فعال شدن آن با شکسته شدن پپتید ۳۷ آمینواسیدی از پایانه آمینی زیر واحد A توسط ترومبین

نوکلئوتید گوانین مشخص شده در توالی پرایمر معکوس یک ناهمخوانی را در انتهای 3' نشان می‌دهد (نوکلئوتید اصلی در این محل آدنین A است) که باعث ایجاد ناحیه محدود کننده برای آنزیم محدود کننده CfoI در توالی طبیعی (GCG/C) می‌شود که این فعالیت در حضور تیمیدین به جای G (آلل لوسین) از دست می‌رود (GCT/C) برای واکنش PCR دستور کار تکثیر زیر استفاده شد (جدول شماره ۱).

جدول ۱- برنامه ترموسایکلر برای تکثیر

FXIIIVal34Leu

دوره	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	مرحله
۱	۲	۹۵	تقلیب اولیه
۴۰	۱	۹۵	تقلیب
	۱	۵۵	اتصال
	۱	۷۲	گسترش
۱	۵	۷۲	گسترش نهایی

پس از انجام PCR و مشاهده باندها به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز ۴ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، ژنوتیپ پلی‌مریسم با استفاده از روش RFLP در حضور آنزیم CfoI تعیین شد. جهت هضم آنزیمی، محصول PCR در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت با آنزیم انکوبه شد. نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی نشان داد که محصول PCR، ۱۱۴ جفت باز طول داشت. بعد از هضم آنزیمی توسط آنزیم محدود کننده CfoI، قطعه هضم شده در نمونه‌هایی با ژنوتیپ نوع وحشی (والین / والین) ۹۴ جفت باز بود (شماره‌های ۳ و ۵ و ۶). در نوع هموزیگوت (لوسین / لوسین) محصول‌های PCR به صورت هضم نشده باقی ماندند، در حالی که در انواع هتروزیگوت (والین / لوسین) هر دو محصول PCR دست نخورده و قطعه ۹۴ جفت بازی در ژل آگارز ۴ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید قابل رویت بودند (شکل شماره ۱).

جابه جایی) و در نتیجه جای‌گزینی والین به لوسین در فاصله ۳ آمینواسیدی جایگاه فعال شدن ترومبین (Arg37-Gly38) در زیر واحد A می‌شود. (۴-۶ و ۸-۱۰)

این جای‌گزینی، ساختارهای فیبرینی ضعیف‌تری را به وجود می‌آورد. بر این اساس است که پلی‌مریسم FXIII Val34Leu را در جریان سکتة قلبی و ترومبوز وریدی محافظت کننده می‌دانند. (۴-۶)

پلی‌مریسم FXIII Val34Leu ناهمگونی نژادی گسترده‌ای دارد؛ به طوری که شیوع آن در قفقازی‌ها ۴۴/۳ درصد، سیاهپوستان ۲۸/۹ درصد و آسیایی‌ها ۲/۵ درصد گزارش شده است. (۳،۳۲) تاکنون گزارشی از شیوع این پلی‌مریسم در جمعیت ایرانی ارائه نشده است. لذا، این مطالعه با هدف تعیین شیوع و نقش محافظتی FXIII Val34Leu در ارتباط با ترومبوز ورید عمقی انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه مورد -شاهدی بر روی ۱۱۶ بیمار مبتلا به ترومبوز ورید عمقی که از دی ماه ۱۳۸۱ تا خرداد ماه ۱۳۸۴ در مراکز درمانی مختلف شهر تهران مراجعه و جهت غربالگری عوامل ترومبوز به آزمایشگاه مرکزی سازمان انتقال خون تهران ارجاع داده شده بودند (گروه مورد) انجام شد. گروه شاهد (۱۰۰ نفر) نیز از بین افراد سالم اهداکننده خون مراجعه کننده به پایگاه انتقال خون وصال تهران انتخاب شدند. پس از جمع‌آوری نمونه‌های کامل خون بیماران، DNA با استفاده از کیت Roche (Roche applied science cat no:11796828001) استخراج شد. پلی‌مریسم FXIII Val34Leu به وسیله روش مبتنی بر تکثیر ژن و ایجاد ناحیه محدود کننده بررسی شد. اولیگونوکلئوتیدهای (پرایمرهای) به کار رفته در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در بخش کیت‌سازی سازمان انتقال خون ایران با توالی زیر ساخته شدند:

مستقیم

5'- ACTTCCAGGACCGCCTTTGGAGGC-3'

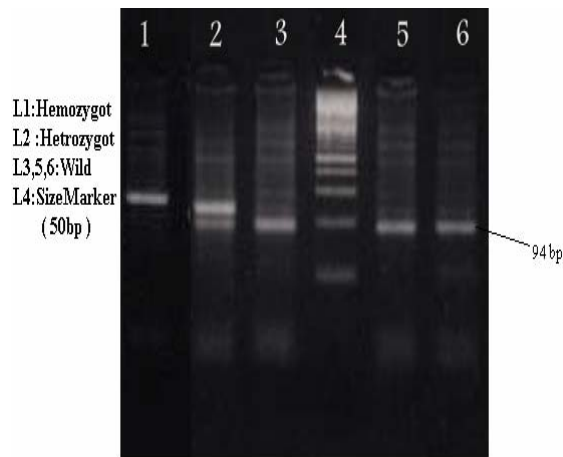
معکوس

5'-GTTGACGCCCGGGGCACCG-3'

سالم شباهت قابل توجهی را با نتایج به دست آمده در کشور ترکیه (۱۹/۲ درصد) نشان داد. (۶) شیوع پلی مورفیسم در مقایسه با کشورهای غیر آسیایی نیز تفاوت چشمگیری داشت. به عنوان مثال، در انگلستان شیوع پلی مورفیسم FXIII Val34Leu در افراد سالم ۵۱ درصد و در افراد مبتلا به DVT، ۳۷ درصد و در برزیل این آمار در افراد ترومبوتیک و سالم به ترتیب ۴۱/۲ درصد و ۳۸/۶ درصد گزارش شده است. (۱۱-۱۳)

کاتو و همکاران در مطالعه‌ای پلی مورفیسم FXIII Val34Leu را به عنوان یک عامل محافظت کننده در مقابل ترومبوز وریدهای عمقی دانسته‌اند. (۱۱) این در حالی است که فرانکو و همکاران چنین اثری را تنها به شکل هموزیگوت این پلی مورفیسم نسبت می‌دهند. (۱۴) در مطالعه حاضر تأثیر محافظتی این پلی مورفیسم مشاهده نشد، چرا که اختلاف شیوع آن در دو گروه بیمار و شاهد معنی‌دار نبود. از این رو، به نظر می‌رسد حضور این پلی مورفیسم با مقاومت در مقابل ابتلا به وقایع ترومبوتیک مرتبط نیست. لازم به ذکر است که یافته مشابهی نیز توسط بالوگ و همکاران گزارش شده است. (۸) کم‌تر بودن گروه شاهد نسبت به گروه مورد در مطالعه‌های دیگر نیز وجود داشت. (۱۴،۳) در مورد اثر پروترومبوتیک این پلی مورفیسم بایستی توجه داشت که ترومبوز وریدی و شریانی یک اختلال چند عاملی است و در جوامع و نواحی جغرافیایی مختلف، توزیع متفاوتی دارد و این موضوع به دلیل ترکیب عوامل خطر ژنتیکی و محیطی گوناگون است. به عنوان مثال، شیوع ترومبوز وریدی در ژاپن کم است که شاید به این علت باشد که در این کشور جهش‌های عامل ۵ لیدن (FVL) و G20210A در ژن عامل ۲ که از عوامل مستعد کننده ترومبوز هستند، شیوع بسیار کمی دارند. (۱۵)

با توجه به شیوع بالای این پلی مورفیسم در بیماران ترومبوتیک ایرانی (۲۴/۳ درصد) در مقایسه با شیوع آن در سایر کشورهای آسیایی (۲/۵ درصد) و شیوع متفاوت آن در جوامع مختلف، انجام مطالعه با حجم بیش‌تر



شکل ۱- باندهای محصول PCR پس از اثر آنزیم Cfol

داده‌ها با نرم افزار SPSS ۱۱/۵ و آزمون آماری مجذور کای تحلیل شدند. ارزش احتمالی کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

* یافته‌ها:

میانگین سنی در گروه مورد 38 ± 14 و در گروه شاهد 38 ± 16 سال بود. دو گروه از نظر سنی اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند. در گروه مورد، ۴۶ درصد افراد مرد و ۵۴ درصد زن بودند. در گروه شاهد، ۵۳ درصد زن و ۴۷ درصد مرد بودند و به لحاظ جنسی نیز اختلاف آماری معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت. شیوع پلی مورفیسم FXIII Val34Leu در بیماران گروه مورد ۲۲/۴ درصد و در گروه شاهد ۳۷/۴ درصد بود. فراوانی آلل جهش یافته (الل لوسین) در دو گروه مورد و شاهد به ترتیب ۱۴/۷ و ۲۰/۲ درصد بود ($p=0/082$, $Odds = 0/725$). (Ratio)

* بحث و نتیجه‌گیری:

در این مطالعه شیوع پلی مورفیسم FXIII Val34Leu در افراد سالم ۲۲/۴ درصد و در افراد بیمار ۳۷/۴ درصد و در مقایسه با کشورهای آسیایی دیگر از قبیل کره و ژاپن (تقریباً صفر) بسیار بیش‌تر بود. (۳) اما در مورد افراد

- myocardial infarction. *Circ J* 2006 Mar; 70(3): 239-42
7. de Lange M, Andrew T, Snieder H, et al. Joint linkage and association of six single-nucleotide polymorphisms in the factor XIII-A subunit gene point to V34L as main functional locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Aug; 26(8): 1914-19
8. Jensen R. Clinical presentation of arterial thrombosis vs. venous thrombosis. *Clini Hemos Rev* 2002; 16(8): 1-6
9. Roldam V, Corral J, Marin F, et al. Effect of factor XIII Val34Leu polymorphism on thrombolytic therapy in premature myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2002 Aug; 88(2): 354-5
10. Elbaz A, Poirier O, Canaple S, et al. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. *Blood* 2000 Jan 15; 95(2): 586-91
11. Catto AJ, Kohler HP, Bannan S, et al. Factor XIII Val34Leu: a novel association with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998 Apr; 29(4): 813-6
12. Catto AJ, Kohler HP, Coore J, et al. Association of common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* 1999 Feb 1; 93(3): 906-8
13. Corral J, Iñesta JA, Gonzalez-Conejero R, et al. Polymorphisms of clotting factors modify the risk for intracranial hemorrhage. *Blood* 2001 May 15; 97(10): 2979-82
14. Franco RF, Reitsma PH, Lourenco D, et al. Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the etiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999 May; 81(5): 676-9
15. Attie-Castro FA, Zago MA, Lavinha J, et al. Ethnic heterogeneity of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Thromb Haemost* 2000 Oct; 84(4): 601-3

توصیه می‌شود، تا نتیجه دقیق‌تری از شیوع این پلی‌مورفیسم در جمعیت ایرانی و نقش محافظتی آن به دست آید.

*سپاس‌گزاری:

بدین وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و همکاران بخش کیت‌سازی سازمان انتقال خون ایران در انجام این طرح پژوهشی تشکر می‌شود.

*مراجع:

1. Diz-Kucukkaya R, Hancer VS, Inanc M, et al. Factor XIII Val34Leu polymorphism does not contribute to the prevention of thrombotic complication in patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2004; 13(1): 32-5
2. Cho KH, Kim BC, Kim MK, Shin BA. No association of Factor XIII Val34Leu polymorphism with primary intracerebral hemorrhage and healthy controls in Korean population. *J Korean Med Sci* 2002 Apr; 17(2): 249-53
3. Wells P, Anderson JL, Scarvelis DK, et al. Factor XIII Val34Leu variant is protective against venous thromboembolism: A huge review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2006 Jul 15; 164(2): 101-9
4. Francis CW. Factor XIII polymorphism and venous thromboembolism. *Arch Pathol Lab Med* 2002 Nov; 126(11): 1391-3
5. Balogh I, Szoke G, Karpati L, et al. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 2000 Oct 1; 96(7): 2479-86
6. Hancer VS, Diz Kucukkaya R, Bilge AK, et al. The association between Factor XIII Val34Leu polymorphism and early