

Ksenia Bykowska, Barbara Vertun-Baranowska, Jerzy Windyga,
Stanisław Łopaciuk

Polimorfizm Val34Leu czynnika XIII a ryzyko żylnych choroby zakrzepowo-zatorowej

The factor XIII Val34Leu polymorphism and the risk of venous thromboembolism

Z Samodzielnej Pracowni Krzepnięcia Krwi i Hemostazy
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. S. Łopaciuk

Słowa kluczowe: Czynniki XIII – Polimorfizm – Zakrzepica żylna – Czynniki V Leiden
Key words: Factor XIII – Polymorphism – Venous thrombosis – Factor V Leiden

STRESZCZENIE: Niedawno doniesiono, że u osób z polimorfizmem genu czynnika XIII (Val34Leu) zmniejszone jest ryzyko wystąpienia zakrzepicy żylnych. Celem obecnej pracy było określenie częstości występowania tego polimorfizmu u pacjentów z wywiadem żylnych choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻChZZ) i w ogólnej populacji polskiej oraz zbadanie jego wpływu na kliniczną ekspresję mutacji typu Leiden genu czynnika V. Badania zostały przeprowadzone w grupie 295 niespokrewnionych ze sobą pacjentów, u 295 osób zdrowych dobranych do pacjentów pod względem płci i wieku, oraz u 195 heterozygotycznych nosicieli czynnika V Leiden. Stan heterozygotyczny wobec czynnika XIII Val34Leu wykryto u 128 (43,4%) pacjentów z wywiadem ŻChZZ, u 127 (43,1) osób zdrowych grupy kontrolnej, u 44/107 (41,1%) objawowych heterozygot wobec czynnika V Leiden i u 33/88 (37,5%) heterozygot bezobjawowych. Stan homozygotyczny wobec tego polimorfizmu (genotyp Leu/Leu) stwierdzono odpowiednio u 20 (6,8%), 31 (10,5%), 6 (5,6%) i 5 (5,7%) osób badanych grup. Różnice w częstości występowania allelu Leu34 pomiędzy grupami pacjentów, osób zdrowych i nosicieli czynnika V Leiden nie były statystycznie znamienne ($p > 0,05$). Wyniki tej pracy wskazują, że czynnik XIII Val34Leu nie ma ochronnego znaczenia w występowaniu zakrzepicy żylnych i nie wpływa na przebieg kliniczny mutacji typu Leiden genu czynnika V. Polimorfizm ten w ogólnej populacji polskiej występuje podobnie często jak w innych krajach europejskich.

SUMMARY: A polymorphism in the factor XIII gene (Val34Leu) has recently been reported to protect against venous thrombosis. The aim of the present study was to investigate the prevalence of this polymorphism in patients with a history of venous thromboembolism (VTE) and, on a wider scale, in the Polish population, as well as to evaluate its possible effect on clinical expression of the factor V Leiden mutation. The study was carried out on 295 unrelated patients, 295 sex- and age-matched healthy subjects and 195 heterozygotes for factor V Leiden.

Heterozygocytę dla czynnika XIII Val34Leu stwierdzono u 128 (43,4%) pacjentów z historią choroby zakrzepniczej (VTE), 127 (43,1%) kontrolnych, 44/107 heterozygot dla czynnika V Leiden i 33/88 (37,5%) heterozygot bezobjawowych. Homozygocytę dla tego polimorfizmu (genotyp Leu/Leu) stwierdzono odpowiednio u 20 (6,8%), 31 (10,5%), 6 (5,6%) i 5 (5,7%) osób z poszczególnych grup badawczych. Różnice w częstości allelu Leu34 między pacjentami, kontrolnymi i heterozygotami dla czynnika V Leiden nie były statystycznie istotne ($p > 0,05$). Wyniki badań wskazują, że allel XIII Val34Leu nie jest czynnikiem ochronnym przeciwko zakrzepicy żyłnej i nie wpływa na przebieg choroby zakrzepniczej. Częstość występowania tego polimorfizmu w populacji polskiej jest podobna do częstości obserwowanej w innych krajach Europy.

Wstęp

Czynnik krzepnięcia XIII występuje w osoczu jako heterotetramer A_2B_2 , przy czym podjednostka A jest zymogenem, a podjednostka B – białkiem przenośnikowym. Pod wpływem trombiny i w obecności jonów wapnia czynnik XIII jest przekształcany w aktywną transglutaminazę, która stabilizuje skrzeplinę wprowadzając kowalencyjne wiązania krzyżowe typu ϵ (γ -glutamyl) – lizyny pomiędzy łańcuchami γ i α sąsiadujących ze sobą monomerów fibryny (18). Substratem dla aktywowanego czynnika XIII są także inne białka układu krzepnięcia krwi i fibrynolizy, w tym α_2 -antyplazmina przyłączana za pomocą takich samych wiązań kowalencyjnych do łańcuchów α fibryny (19). Skrzeplina stabilizowana w porównaniu do skrzepliny utworzonej w nieobecności czynnika XIII ma większą oporność mechaniczną i jest mniej podatna na fibrynolizę.

Mutacja Val34Leu genu czynnika XIII została opisana po raz pierwszy w 1994 r. przez Mikkołę i wsp. (14). Mutacja ta występuje w eksonie 2 genu podjednostki A (zlokalizowanego w chromosomie 6), a jej wynikiem jest zastąpienie waliny przez leucynę w pozycji 34 peptydu aktywacyjnego, w odległości trzech aminokwasów od miejsca trawienia czynnika XIII przez trombinę (Arg37-Gly38). Attie-Castro i wsp. (3) zwrócili uwagę na znaczną heterogenność etniczną tego polimorfizmu. Allel Leu34 występuje często wśród ludności rasy białej, znacznie rzadziej u ludności czarnej i bardzo rzadko u Japończyków.

W ostatnich latach doniesiono, że polimorfizm Val34Leu czynnika XIII wywiera działanie chroniące ludzi przed zawałem serca (9, 11, 12) i udarem niedokrwiennym mózgu. (7, 11). Stwierdzono też, że w obecności allelu Leu34 zmniejszone jest ryzyko występowania zakrzepicy żyłnej (5, 10). Wyniki tych badań nie zostały jednak potwierdzone przez innych autorów w odniesieniu zarówno do zakrzepów tętniczych (6), jak i do zakrzepicy żyłnej (1, 6, 13).

Polimorfizm czynnika XIII mógłby wpływać na zawartość tego czynnika w osoczu, proces jego aktywacji lub swoistą aktywność transglutaminazy. Stwierdzono, że aktywacja wariantu Leu34 w porównaniu do odmiany Val34 odbywa się szybciej i wymaga mniejszych stężeń trombiny, jednakże aktywność swoista transglutaminazy przy wysokim stężeniu trombiny jest taka sama w odniesieniu do obu genotypów (2, 16, 17, 20). Szybsza aktywacja zmutowanego czynnika XIII nie może być przyczyną jego działania ochroniącego przed zakrzepami. Dotychczasowe badania nie wyjaśniły, w jaki sposób allel Leu34 mógłby zapobiegać rozwojowi zakrzepicy.

Celem obecnej pracy było określenie częstości występowania allelu Leu34 u pacjentów z wywiadem żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej i w ogólnej populacji polskiej oraz zbadanie jego wpływu na kliniczną ekspresję mutacji typu Leiden genu czynnika V.

Material i metody

Pacjenci: 295 niespokrewnionych ze sobą osób w wieku 15–77 lat, kierowanych do Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) w Warszawie na badania w kierunku trombofilii. Osoby te przebyły żylną chorobę zakrzepowo-zatorową (ŻChZZ) przed 45 rokiem życia, doznały incydentu zakrzepowego z nawrotami bez względu na wiek lub przebyły zakrzepicę żylną o nietypowej lokalizacji.

Grupa kontrolna: 295 niespokrewnionych ze sobą osób zdrowych (pracowników szpitala lub krwiodawców), mieszkańców centralnej Polski, dobranych do pacjentów względem płci i wieku.

Nosiciele czynnika V Leiden: 195 osób w wieku 20–65 lat, u których wcześniej w IHIT wykryto stan heterozygotyczny wobec mutacji typu Leiden genu czynnika V.

Odczynniki: deoksyrybotrifosfonukleotydy firmy Appller Corp. (Foster City, USA), akrylamid i bisakrylamid firmy Sigma (St. Louis, USA) i zestaw do barwienia srebrem firmy Techniki Elektroforetyczne (Warszawa).

Metody badań: DNA izolowano z krwi żyłnej, pobieranej na EDTA, metodą wysalania według Millera i wsp. (15). Mutację Val34Leu genu czynnika XIII wykrywano badając polimorfizm pojedynczej nici DNA (SSCP) według Kohlera i wsp. (12). Fragmenty DNA rozdzielano przy pomocy aparatu DNA Pointer (Techniki Elektroforetyczne, Warszawa) i analizowano ich wielkość po wybarwieniu żeli poliakrylamidowych srebrem (21).

Wyniki

Wyniki analizy polimorfizmu Val34Leu czynnika XIII zestawiono w tabeli 1. Polimorfizm wykryto u 148 spośród 295 pacjentów z wywiadem ŻChZZ, przy czym 43,4% pacjentów było heterozygotami, a 6,8% – homozygotami względem allelu Leu34. Polimorfizm ten występował u 158 spośród 295 osób zdrowych grupy kontrolnej; w 43,1% przypadków stwierdzono stan heterozygotyczny, a w 10,5% – stan homozygotyczny.

Tabela 1. Polimorfizm Val34Leu czynnika XIII u pacjentów z wywiadem zakrzepicy żyłnej i w grupie kontrolnej osób zdrowych

Table 1. The factor XIII Val34Leu polymorphism in patients with a history of venous thromboembolism and in control group of healthy subjects

	Zakrzepica żylna n = 295	Kontrola n = 295
Wiek, lata (śr. ± SD)	37,1 ± 11,3	37 ± 11,4
Mężczyźni/kobiety	140/155	140/155
Czynnik XIII:		
Val/Val	147 (49,8%)	137 (46,4%)
Val/Leu	128 (43,4%)	127 (43,1%)
Leu/Leu	20 (6,8%)	31 (10,5%)*
Val/Leu + Leu/Leu	148 (50,2%)	158 (53,6%)*

*p > 0,05

Tabela 2 przedstawia częstość występowania polimorfizmu Val34Leu czynnika XIII wśród heterozygotycznych nosicieli czynnika V Leiden. Polimorfizm wykryto u 88 spośród 195 badanych heterozygot, przy czym w 39,5% przypadków nosiciele czynnika V byli heterozygotami, a w 5,6% – homozygotami względem allelu Leu34. Nie było istotnych różnic w częstości występowania polimorfizmu Val34Leu pomiędzy objawowymi i bezobjawowymi nosicielami czynnika V Leiden.

Tabela 2. Polimorfizm Val34Leu czynnika XIII u objawowych i bezobjawowych heterozygot wobec czynnika V Leiden

Table 2. The factor XIII Val34Leu polymorphism in symptomatic and asymptomatic heterozygotes for factor V Leiden

	Nosiciele mutacji genu czynnika V Leiden		Razem n = 195
	Objawowi n = 107	Bezobjawowi n = 88	
Wiek, lata (śr. 1 SD)	39,3 ± 11,8	42,9 ± 17,0	41,0 ± 14,3
Mężczyźni/kobiety	51/56	42/46	93/102
Czynnik XIII:			
Val/Val	57 (53,3%)	50 (56,8%)	107 (54,9%)
Val/Leu	44 (41,1%)	33 (37,5%)	77 (39,5%)
Leu/leu	6 (5,6%)	5 (5,7%)	11 (5,6%)
Val/Leu + Leu/Leu	50 (46,7%)	38 (43,2%)	88 (45,1%)

Omówienie wyników

W obecnej pracy nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania polimorfizmu Val34Leu czynnika XIII pomiędzy pacjentami z wywiadem ŻChZZ a grupą kontrolną osób zdrowych. Uzyskane wyniki są zgodne z badaniami przeprowadzonymi w Hiszpanii (6), Francji (1) i we Włoszech (13). Badania te nie potwierdzają działania allelu Leu34 ochraniającego przed zakrzepicą żylną. Na tego rodzaju działanie wskazywały doniesienia dwóch grup badaczy. Franco i wsp. (10) badając 189 pacjentów, którzy przeżyli jeden epizod ŻChZZ, i 187 osób zdrowych z południowo-wschodniej Brazylii stwierdzili częstsze występowanie genotypu Leu/Leu wśród pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej (OR 0,16; 95% CI 0,05–0,5); częstość występowania genotypu Val/Leu w obu grupach była podobna. Badania Catto i wsp. (5), którymi objęto 226 pacjentów z ŻChZZ i 224 osoby zdrowe ze Zjednoczonego Królestwa (UK), wykazały częste występowanie zarówno genotypu Leu/Leu, jak i genotypu Val/Leu w grupie pacjentów (OR 0,56; 95% CI 0,38–0,82). Przyczyną rozbieżności w wynikach prac różnych autorów oceniających wpływ allelu Leu34 na występowanie zakrzepicy żyłnej mogły być różne kryteria doboru pacjentów i różnice etniczne badanych populacji.

W obecnej pracy nie stwierdzono także istotnych różnic w częstości występowania polimorfizmu Val34Leu czynnika XIII pomiędzy objawowymi i bez-

objawowymi nosicielami czynnika V Leiden (46,7% vs. 43,2%). Wyniki tych badań wskazują, że allel Leu34 nie ma wpływu na kliniczną ekspresję mutacji typu Leiden genu czynnika V. Zaobserwowano wprawdzie nieco rzadsze występowanie genotypu Leu/Leu zarówno u objawowych, jak i bezobjawowych heterozygot względem czynnika V Leiden (odpowiednio u 5,6% i 5,7%) w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych (u 10,5%), jednak przyczyną tej różnicy nieznamiennej statystycznie ($p > 0,05$) mogła być mała liczebność grupy heterozygot. Balough i wsp. (4) stwierdzili podobną częstość występowania stanu heterozygotycznego i homozygotycznego wobec polimorfizmu Val34Leu czynnika XIII wśród pacjentów z wrodzoną trombofilią na tle mutacji Leiden genu czynnika V lub mutacji G20210A genu protrombiny i osób zdrowych grupy kontrolnej. Natomiast Franco i wsp. (8) obserwowali tendencję do zmniejszenia ryzyka ŻChZZ w obecności allelu Leu34 u nosicieli czynnika V Leiden w wieku powyżej 30 lat.

Wyniki obecnej pracy wskazują, że polimorfizm Val34Leu czynnika XIII w ogólnej populacji polskiej występuje podobnie często jak w innych krajach europejskich (1, 4, 5, 6, 13).

Piśmiennictwo

1. Alhenc-Gelas M, Reny JL, Aubry ML, Aïach M, Emmerich J. The FXIII Val34Leu mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 1117–1118.
2. Anwar R, Gallivan L, Edmonds SD, Markham AF. Genotype/phenotype correlations for coagulation factor XIII: specific normal polymorphisms are associated with high or low factor XIII specific activity. *Blood* 1999; **93**: 897–905.
3. Attie-Castro FA, Zago MA, Lavinha J, Elion J, Rodriguez-Delfin L, Guerreiro JF, Franco RF. Ethnic heterogeneity of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 601–603.
4. Balogh I, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, Komaromi I, Haramura G, Pflieger G, Mikkola H, Muszbek L. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 2000; **96**: 2479–2487.
5. Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with venous thrombosis. *Blood* 1999; **93**: 906–908.
6. Corral J, Gonzalez-Conejero R, Iñiesta JA, Rivera J, Martinez C, Vicente V. The FXIII Val34Leu polymorphism in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica* 2000; **85**: 293–297.
7. Elbaz A, Poirier O, Canaple S, Chedru F, Cambien F, Amarencu P. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. *Blood* 2000; **95**: 586–591.
8. Franco RF, Middeldorp S, Meinardi JR, van Pampus ECM, Reitsma PH. Factor XIII Val34Leu and the risk of venous thrombolism in factor V Leiden carriers. *Brit J Haemat* 2000; **111**: 118–121.
9. Franco RF, Pazin-Filho A, Tavella MH, Simoes MV, Martin-Neto J, Zago MA. Factor XIII Val34Leu and the risk of myocardial infarction. *Haematologica* 2000; **85**: 67–71.
10. Franco RF, Reitsma PH, Lourenco D, Maffei FH, Morelli V, Tavella MH, Araujo AG, Piccinato CE, Zago MA. Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the aetiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; **81**: 676–679.
11. Gemmati D, Serino ML, Ongaro A, Tognazzo S, Moratelli S, Resca R, Moretti M, Scapoli GL. A common mutation in the gene for coagulation factor XIII-A (Val34Leu): a risk factor for primary intracerebral hemorrhage is protective against atherothrombotic diseases. *Am J Hematol* 2001; **67**: 183–188.
12. Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Gerning N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1998; **79**: 8–13.

13. Margaglione M, Bossone A, Brancaccio V, Ciampa A, Di Minno G. Factor XIII Val34Leu polymorphism and risk of deep vein thrombosis. *Tromb Haemost* 2000; **84**: 1118–1119.
14. Mikkola H, Syriälä M, Rasi V, Vahtera H, Hamalainen E, Peltonen L, Palotie A. Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood* 1994; **84**: 517–525.
15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988; **16**: 1215.
16. Muszbek L. Deficiency causing mutations and common polymorphisms in the factor XIII-A gene. *Thromb Haemost*, 2000; **84**: 524–527.
17. Muszbek L, Wartiovaara U, Balogh I, Szoke G, Haramura G, Karpati L, Katona E, Harsfalvi J, Mikkola H, Palotie A. Biochemical characterization of Val34Leu mutant factor XIII. *Haemostasis* 2000; **30**: (suppl 1): 1–212.
18. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 1999; **94**: 271–305.
19. Sakata Y, Aoki N. Significance of cross-linking α_2 -plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J Clin Invest* 1982; **69**: 536–542.
20. Wartiovaara U, Mikkola H, Szoke G, Haramura G, Karpati L, Balogh I, Lassila R, Muszbek L, Palotie A. Effect of Val34Leu polymorphism on the activation of the coagulation factor XIIIa. *Tromb Haemost* 2000; **84**: 595–600.
21. Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R. Silver staining of protein in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1981; **197**–203.

Praca wpłynęła do Redakcji 25.06.2002 r. i została zakwalifikowana do druku 16.09.2002 r.

Adres Autorów:

Instytut Hematologii i Transfuzjologii
ul. Chocimska 5
00-957 Warszawa