



ยูนิตย่อย B ของแฟกเตอร์ XIII: ความสัมพันธ์ กับการสลายพันธะ A_2B_2 และความเสี่ยงต่อ การเกิด ภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด

Factor XIII B-subunit : relation to A_2B_2
dissociation and the risk of venous thrombosis

นันทรัตน์ โฆมานะสิน*

บทคัดย่อ

ยูนิตย่อย B ของ แฟกเตอร์ XIII (FXIIIB) ทำหน้าที่เป็นตัวพา (carrier) และคงเสถียรภาพ (stabiliser) ของ ยูนิตย่อย A (FXIIIA) ซึ่งทั้งสองยูนิตย่อยนี้รวมกันเป็น FXIII ในรูปของ A_2B_2 tetramer ในกระแสเลือด เมื่อถูกกระตุ้นด้วยทรอมบิน (thrombin) และแคลเซียมไอออน FXIIIA จะแยกตัวออกจาก FXIIIB ทำให้ FXIII อยู่ในรูปที่ถูกกระตุ้น และทำหน้าที่เชื่อมข้ามไฟบริน ดังนั้นหากมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ FXIIIB หรือปฏิกิริยาการจับกันระหว่างทั้งสองยูนิตย่อยก็อาจมีผลต่อการทำหน้าที่ของ FXIII มีรายงานเกี่ยวกับ polymorphism ที่พบบน exon III ของ FXIIIB ที่ถอดรหัสสำหรับ sushi domain ที่ 2 ได้แก่ FXIIIB His95Arg polymorphism ซึ่งเป็น polymorphism ใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงาน ว่ามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด (venous thrombosis) และเนื่องจากการสันนิษฐานว่า sushi domain อาจทำหน้าที่ในการจับกับ FXIIIA FXIIIB His95Arg polymorphism จึงอาจมีผลต่อปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง FXIIIA และ FXIIIB จากการศึกษาเพื่อพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวพบว่า FXIIIB His95Arg polymorphism มีผลทำให้การสลายพันธะระหว่าง A_2B_2 tetramer ในพลาสมาเกิดได้ง่ายขึ้น แต่ผลการศึกษา

* ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

ligand-binding constant (kd) ระหว่าง purified FXIIIA และ purified FXIIIB ไม่สนับสนุนผลการศึกษาที่พบในพลาสมา ในขณะนี้จึงยังไม่สามารถสรุปบทบาทของ sushi domains ในการจับกับ FXIIIA เพื่อเกิดเป็น FXIII A₂B₂ tetramer รวมทั้งบทบาทในการทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด

คำรหัส: แฟกเตอร์ XIII ● polymorphism ● ภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด

Abstract

Factor XIII B-subunit : relation to A₂B₂ dissociation and the risk of venous thrombosis

Nantarat Komanasin*

The B-subunit of factor XIII appears to function as a carrier and stabiliser for the A-subunit. Both A- and B-subunits combine solely through non-covalent bond to form a tetramer (A₂B₂) structure in the circulation. Upon activation by thrombin and calcium ions, the A-subunit dissociates from the B-subunit and cross-links fibrin. It is most likely that alteration in the concentration of the B-subunit or binding interaction between the subunits may in turn affect FXIII activity. FXIIIB His95Arg polymorphism is found in exon III encoding for the second sushi domain and shows an association with an increase risk of venous thrombosis. Since the sushi domains of the B-subunit are likely to function as a protein binding module, it is possible that the polymorphism may influence A- and B-subunit interaction and binding kinetics. This hypothesis has been explored and shown that the FXIIIB His95Arg polymorphism weakens the heterologous association of the subunits in plasma system but not in purified system. Further studies are required to evaluate the role of sushi domains in binding to the A-subunit and in the pathophysiology of venous thrombosis.

Key words: Factor XIII ● polymorphism ● venous thrombosis

*Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, 40002

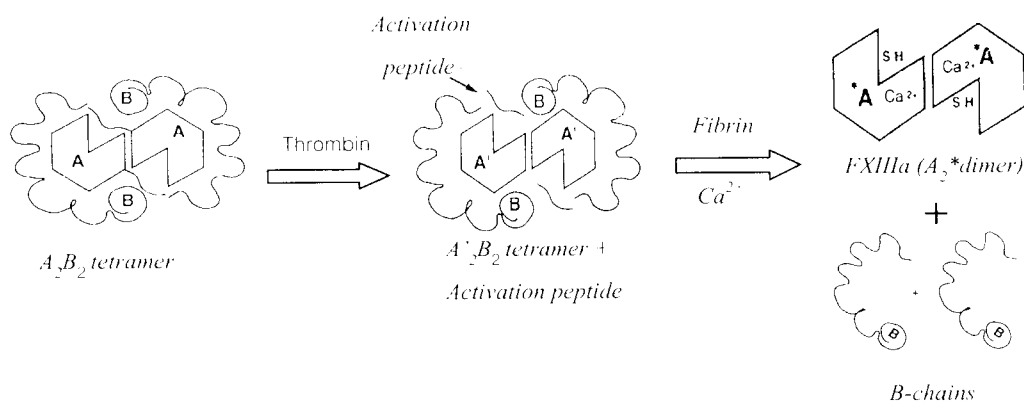
บทนำ

แฟกเตอร์ XIII (factor XIII; FXIII) เป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่ไม่มีคุณสมบัติเป็น serine protease แต่มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนสุดท้ายของการสร้างลิ่มเลือด โดยการสร้างพันธะ isopeptide เชื่อมระหว่าง fibrin monomers ที่อยู่ติดกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มเสถียรภาพของลิ่มเลือด พบว่าในผู้ที่มิภาวะพร่อง FXIII จะมีภาวะเลือดออกผิดปกติ บาดแผลหายช้า และมีการแท้งในระหว่างตั้งครรภ์ ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ FXIII อย่างกว้างขวางทั้งในเรื่องเกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ซึ่งนำไปสู่การอธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง FXIII กับการทำให้เกิดภาวะเลือดออกผิดปกติหรือภาวะหลอดเลือดมีลิ่มเลือด (thrombosis) ซึ่งการศึกษาส่วนใหญ่เน้นที่หน่วยย่อย A (A-subunit; FXIIIa) ของ FXIII ทั้งนี้เนื่องจากเป็นส่วนที่มี catalytic site ในขณะที่การศึกษาเกี่ยวกับหน่วยย่อย B (B-subunit; FXIIIb) ซึ่งเชื่อว่าทำหน้าที่เพิ่มเสถียรภาพให้กับ FXIIIa มีอยู่น้อยมาก หากมี

การเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของโปรตีนหรือจีนที่ควบคุมการแสดงออกของ FXIIIb ก็อาจมีผลกระทบต่อหน้าที่ของ FXIII ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของ FXIIIb โดยใช้ polymorphism เป็นต้นแบบจึงเป็นอีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจและอาจนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ที่ชัดเจนของหน่วยย่อย B ในบทความนี้จึงได้รวบรวมองค์ความรู้เกี่ยวกับ FXIIIb ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้าง หน้าที่ และจีน (gene) ที่ควบคุมการแสดงออก polymorphism ที่มีรายงานและความสัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดและหัวใจ รวมทั้งความสัมพันธ์กับหน้าที่ของ FXIIIb ในการจับกับ FXIIIa

โครงสร้างและหน้าที่ของ FXIII ในกระบวนการห้ามเลือด

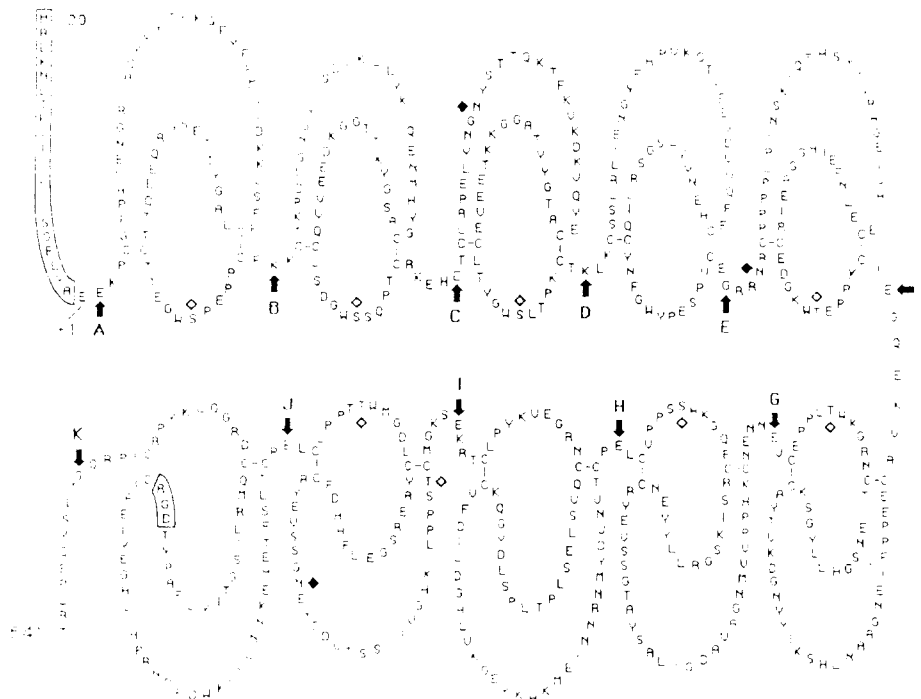
FXIII เป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่มีคุณสมบัติเป็น protransglutaminase อยู่ในพลาสมาในรูปของ tetramer ระหว่าง 2 หน่วยย่อยของ FXIIIa



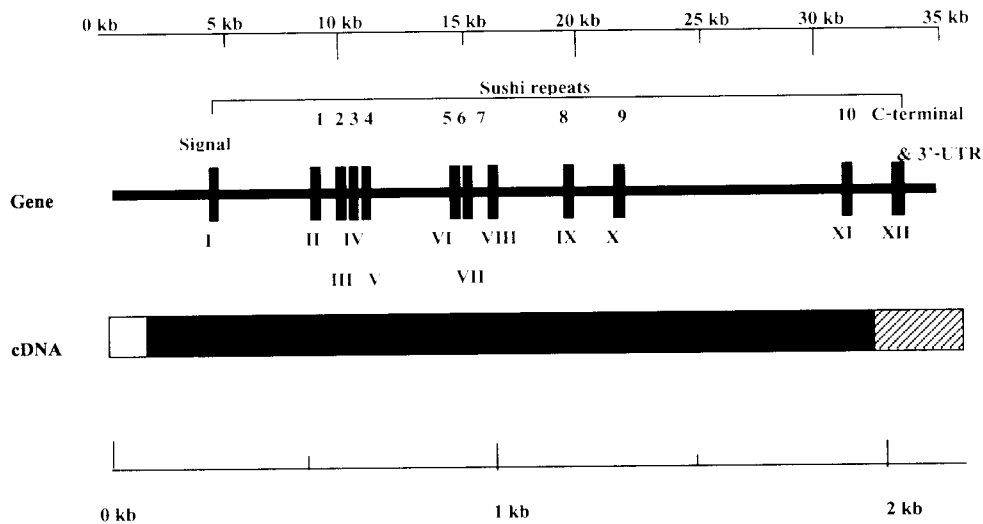
รูปที่ 1: โครงสร้างของ FXIII A_2B_2 tetramer และการกระตุ้น FXIII⁹ A': modified FXIIIa, A*: activated FXIIIa

และ 2 ยูนิตย่อยของ FXIIIB ซึ่งแต่ละยูนิตย่อยจะจับกันด้วยพันธะ non-covalent เป็น A_2B_2 ¹ มีน้ำหนักโมเลกุล 325.8 กิโลดาลตัน โดย FXIIIA และ FXIIIB มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 83.2 และ 79.7 กิโลดาลตัน ตามลำดับ²⁻⁴ FXIIIA ประกอบด้วยกรดอะมิโน 731 ตัว มีโครงสร้างเป็น globular structure และมีส่วนที่มี catalytic site, calcium binding site รวมทั้ง activation peptide⁵⁻⁶ สำหรับ FXIIIB ประกอบด้วยกรดอะมิโน 641 ตัว มีโครงสร้างเป็น filamentous structure⁷⁻⁸ FXIIIA มีบทบาทที่สำคัญในการถูกกระตุ้นด้วย thrombin โดย thrombin จะตัดที่พันธะระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 37 (Arg) และตำแหน่งที่ 38 (Gly) เพื่อปลดปล่อย activation peptide ออกจาก FXIIIA แล้ว แคลเซียมไอออนจะทำให้ FXIIIB แยกออกจาก

FXIIIA แล้วเผย catalytic site ทำให้ FXIII เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ FXIII ที่ถูกกระตุ้น (FXIIIa)⁹ (รูปที่ 1) ซึ่งทำหน้าที่ในการเชื่อมข้าม (cross-link) ระหว่างโปรตีนชนิดต่างๆ เช่น ระหว่างโมเลกุลของไฟบริน และระหว่างไฟบรินและ α 2-plasmin inhibitor (α 2-PI) จากปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นมีความทนทานต่อการถูกย่อยด้วย plasmin ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของลิ่มเลือดในการห้ามเลือด นอกจากนี้ยังมีโปรตีนชนิดอื่นที่เป็นซับสเตรทของ FXIIIa ได้แก่ fibronectin, vitronectin, von Willebrand factor และ แพลกเตอร์ V¹⁰⁻¹¹ สำหรับหน้าที่ของ FXIIIB ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากลักษณะโครงสร้างที่เป็น glycosylated protein จึงสันนิษฐานว่า FXIIIB ทำหน้าที่ช่วยให้ FXIIIA มีเสถียรภาพ และเป็น



รูปที่ 2: โครงสร้างปฐมภูมิของ FXIIIB ซึ่งตำแหน่งที่เป็น intron แสดงโดยลูกศรและอักษรพิมพ์ใหญ่ สำหรับตำแหน่งที่จับกับ potential N-linked carbohydrate แสดงโดยสัญลักษณ์รูปเพชรที่^{1,14}



รูปที่ 3: โครงสร้างของจีนและ cDNA ของ FXIII B ซึ่งตำแหน่งของ 5'-untranslated, coding และ 3'-untranslated regions ของ cDNA แสดงโดย สีเหลี่ยมโปร่ง สีเหลี่ยมทึบ และสีเหลี่ยมลายเส้น ตามลำดับ¹

ตัวพา (carrier) ให้ FXIII A ซึ่งมีลักษณะเป็น hydrophobic ไลโปโพลีเปปไทด์ในพลาสมาได้^{3,8,12}

โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) และจีน (gene) ที่ควบคุมการแสดงออกของ FXIII B

FXIII B เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 641 ตัว⁷⁻⁸ โดยร้อยละ 98 ของกรดอะมิโนจะประกอบเป็น 10 tandem repeats มีลักษณะคล้าย sushi ซึ่งเป็นอาหารที่มีชื่อเสียงของญี่ปุ่น 10 อันมาเรียงกันเรียกว่า sushi domains (รูปที่ 2) โดยแต่ละ repeat มีขนาดเท่าๆ กัน คือประมาณ 189 bp ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 60 ตัว ซึ่งแต่ละ repeat มีกรดอะมิโนชนิด Cys, Pro, Gly, Tyr และ Trp อยู่ในตำแหน่งเดียวกัน นอกจากนี้แต่ละ repeat ยังประกอบด้วย Cys 4 ตัว และมีการสร้างพันธะ disulphide ระหว่าง Cys ตัวที่ 1

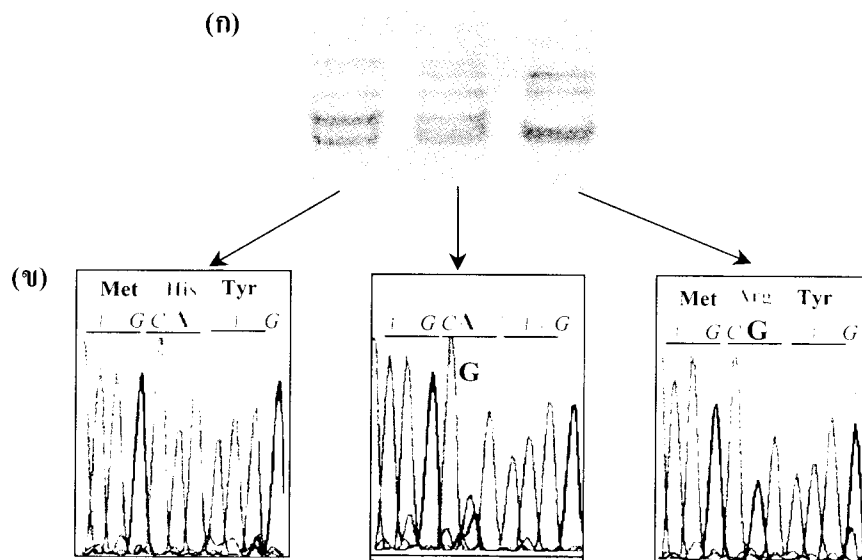
และ 3 และตัวที่ 2 และ 4 ทำให้ sushi domain แต่ละอันเชื่อมกันด้วยพันธะ disulphide 2 พันธะ^{7-8,13-14} ลักษณะโครงสร้างแบบ sushi domains นั้นนอกจากพบใน FXIII B แล้วยังพบได้ในโปรตีนชนิดอื่นอีกประมาณ 26 ชนิดซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนชนิดอื่น ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่า sushi domains ของ FXIII B ทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีน นอกจากโครงสร้างดังกล่าวแล้วกรด อะมิโน 20 ตัวแรกที่ปลายด้านอะมิโน (amino terminal) มีลักษณะเป็น leader sequence ซึ่งเป็นลักษณะที่เฉพาะของ secretory protein^{8,14} ซึ่งอาจบ่งชี้ว่า FXIII B ถูกปล่อยเข้าสู่กระแสเลือดหลังจากการสร้างที่ตับ จีนที่ควบคุมการแสดงออกของ FXIII B อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 (q31-q32.1)¹⁵ มีขนาด 28 kb ประกอบด้วย 12 exons (exon I-XII) ซึ่งถูกแยกด้วย 11 introns (intron A-K) (รูปที่ 3) exon มีขนาดอยู่ในช่วง 64-221 bp โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 192 bp¹⁶ โดย exon I และ

XII ถอดรหัส (code) สำหรับ leader sequence และปลายด้าน carboxyl ของ FXIIB ตามลำดับ สำหรับ exon II-XI ถอดรหัสสำหรับ sushi domain 1-10 ตามลำดับ

FXIIB polymorphism และโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ

Board ได้รายงาน allelic variant ของ FXIIB เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 โดยใช้เทคนิค electrophoresis และ specific immunofixation¹⁶ พบ polymorphism 3 ชนิด ได้แก่ FXIIB*1, FXIIB*2 และ FXIIB*3 หลังจากนั้นนักวิจัยอีกหลายกลุ่มที่ได้ศึกษา FXIIB locus โดยใช้เทคนิค electrophoresis, isoelectric focusing และ electroblotting ซึ่งได้รายงาน variant ใหม่อีก 5 ชนิด ได้แก่ FXIIB*4, FXIIB*5, FXIIB*13, FXIIB*14 และ FXIIB*15¹⁷⁻²⁰ ต่อมาหลังจากที่

Ichinose และคณะ⁸ และ Bottenus และคณะ¹⁴ ได้รายงานโครงสร้างปฐมภูมิและลำดับกรดอะมิโนของจีนที่ควบคุมการแสดงออกของ FXIIB ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ FXIIB ในระดับ DNA และมีการรายงาน mutation ของ FXIIB หลายชนิดซึ่งมีผลทำให้เกิดภาวะพร่อง FXIII²¹⁻²⁴ นอกจากนี้ยังมีการค้นพบ polymorphism อีกหลายชนิดในส่วน of intron, 3' non coding region, exon XI และ exon XII^{14,21-22} แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง FXIIB polymorphism ทั้งในระดับโปรตีนและ DNA กับการแสดงออกของ FXIIB และ/หรือกับการเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ เนื่องจากได้มียางานเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ของ FXIIIA (Val34Leu) กับการป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด (arterial and venous thrombosis)²⁵⁻³³ แต่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด



รูปที่ 4: SSCP (ก) และ sequence electropherograms (ข) เพื่อแสดงการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ จาก A เป็น G ที่ตำแหน่ง 8259 บน exon III ของจีนที่ควบคุมการแสดงออกของ FXIII แล้วทำให้มีการเปลี่ยนของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 95 จาก His เป็น Arg³⁶

ภาวะเลือดออกในสมอง (intracranial hemorrhage)³⁴⁻³⁵ ในขณะที่ยังไม่มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphism ของ FXIIIB กับภาวะดังกล่าว และเนื่องจาก FXIIIB ทำหน้าที่เพิ่มเสถียรภาพของ FXIIIA ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ FXIIIB อาจมีผลต่อการทำหน้าที่ของ FXIIIA และอาจสัมพันธ์กับการเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ ในปี ค.ศ. 2001 Komanasin³⁶ จึงได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ FXIIIB โดยใช้ primer 13 คู่ในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของแต่ละ exon รวมทั้งในส่วนของ 5' และ 3' non coding region ของ FXIIIB แล้วตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) จากการศึกษาดังกล่าวพบ polymorphism 3 ชนิดใน exon III, XI และ XII เมื่อทำ nucleotide sequencing พบว่า

polymorphism ใน exon XI และ XII มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 29470 จาก C เป็น T ใน exon XI และมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 30899 จาก G เป็น A ใน exon XII ส่วนที่เป็น 3'-untranslated region ซึ่ง polymorphism ทั้งสองเป็นชนิดเดียวกับที่รายงานโดย Bottenus และคณะ¹⁴ และ Hashigushi และคณะ²¹ ตามลำดับ ในขณะที่ polymorphism ใน exon III เป็นชนิดที่ยังไม่เคยรายงาน และมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 8259 จาก A เป็น G แล้วมีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 95 ของ FXIIIB จาก histidine (His) เป็น arginine (Arg) (FXIIIB His95Arg) (รูปที่ 4) เมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์กับของ polymorphism ที่เกิดขึ้นกับ exon XII และ III กับการแสดงออกของ FXIIIB และกับโรคหลอดเลือดและหัวใจ พบว่า FXIIIB G30899A มีผลทำให้ระดับของ FXIIIB สูงขึ้น แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ³⁶⁻³⁷

ตารางที่ 1: ความถี่ของ FXIIIB His95Arg polymorphism ในผู้ป่วย CAD, stroke, venous thrombosis และกลุ่มควบคุม (control)³⁶

Subjects	His/His(%)	His/Arg+Arg/Arg(%)	p-values
CAD vs Control	82.1 vs 84.4 (n=207) (n=243)	17.9 vs 15.6 (n=45) (n=45)	>0.05
Stroke vs Control	81.1 vs 82.9 (n=362) (n=401)	18.9 vs 17.1 (n=84) (n=83)	>0.05
Venous thrombosis vs Control	77.6 vs 84.9 (n=166) (n=247)	22.4 vs 15.1 (n=48) (n=44)	0.035

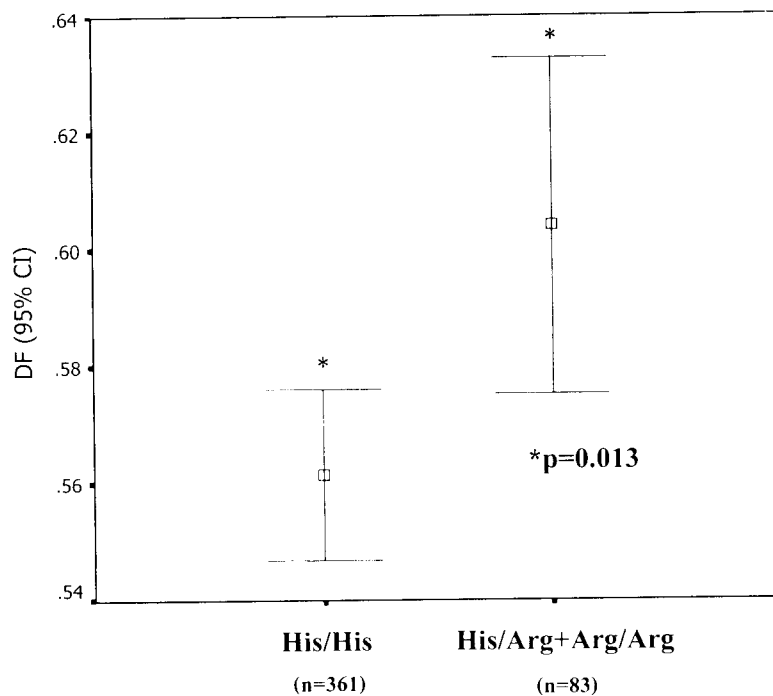
สำหรับ FXIIIB His95Arg เมื่อตรวจกรอง ด้วยเทคนิค PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยใช้เอนไซม์ *NsiI* ในกลุ่มคนผิวขาว Caucasian ที่มีสุขภาพแข็งแรง ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดแดงเลี้ยงหัวใจ (coronary artery disease; CAD) ผู้ป่วย stroke และผู้ป่วยหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด โดยผู้ป่วยแต่ละกลุ่มจะมีกลุ่มควบคุมซึ่งมีสุขภาพแข็งแรง มีจำนวนเพศหญิงและเพศชายใกล้เคียงกันและมีอายุอยู่ในช่วงเดียวกัน (sex-and-age match) พบว่าความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) ของ FXIIIB His/His และ His/Arg+Arg/Arg (วิเคราะห์จีโนไทป์ His/Arg และ Arg/Arg ร่วมกันเนื่องจากความถี่จีโนไทป์ของ Arg/Arg มีค่าต่ำมาก) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วย CAD กับกลุ่มควบคุม และผู้ป่วย stroke กับกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) แต่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือดและกลุ่มควบคุม โดยความถี่จีโนไทป์ของ His/Arg+Arg/Arg ในผู้ป่วยสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.035$) (ตารางที่ 1) โดยผู้ป่วยที่มี Arg allele มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือดเป็น 1.8 เท่าของผู้ที่มี His allele (odds ratio = 1.8, 95% confidence interval = 1.1-2.9) จากผลการศึกษาข้างต้นชี้ว่า FXIIIB Arg95 อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด

ความสัมพันธ์ของ FXIIIB

His95Arg polymorphism กับการสลายพันธะ A_2B_2

FXIII ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือดในรูปของ A_2B_2 tetramer ซึ่งสันนิษฐานว่าส่วนของ sushi domains ของ FXIIIB อาจมีบทบาทในการจับกันระหว่าง FXIIIA และ FXIIIB เพื่อทำให้เกิดเป็น A_2B_2 tetramer แต่ยังไม่ทราบว่าส่วนใดของ sushi domain ที่มีบทบาทนี้ FXIIIB His95Arg เป็น

polymorphism ที่เกิดขึ้นกับ exon III ที่ถอดรหัสสำหรับ sushi domain ที่ 2 และเนื่องจาก Komanasin และคณะ^{36,38} พบความสัมพันธ์ระหว่าง FXIIIB His95Arg polymorphism กับการเกิดภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด จึงสันนิษฐานได้ว่า FXIIIB His95Arg อาจทำให้การสลายพันธะ (dissociation) ระหว่างยูนิตย่อย A และ B ในโมเลกุลของ FXIII เกิดได้ง่ายขึ้น ทำให้มีระดับของ FXIII ที่ถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้น แล้วทำให้มีการเชื่อมข้ามของไฟบรินมากขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด จึงได้มีการศึกษาถึงผลของ polymorphism นี้กับการสลายพันธะ ของยูนิตย่อย A และ B โดยการวัดปริมาณของ FXIIIA₂B₂ complex ในพลาสมาด้วยวิธี enzyme linked immunoassay (ELISA)^{36,39} จากนั้นแยกยูนิตย่อย A และ B ออกจากกันโดยใช้ thrombin และแคลเซียม แล้ววัดปริมาณ FXIIIA₂B₂ complex ที่เหลืออยู่ และคำนวณเป็น dissociated fraction [DF = (A_2B_2 before thrombin activation - A_2B_2 after thrombin activation) / A_2B_2 before thrombin activation)]^{36,38} พบว่าพลาสมาของผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น His/Arg และ Arg/Arg มีค่า DF สูงกว่าพลาสมาของผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น His/His อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5) จากผลการศึกษาทำให้สันนิษฐานได้ว่า การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 8259 จาก A เป็น G บน exon III ของจีนที่ควบคุมการแสดงออกของ sushi domain ที่ 2 ของ FXIIIB อาจทำให้การจับกันระหว่างยูนิตย่อย A และ B ไม่แน่นเท่าปกติ จึงทำให้ยูนิตย่อยทั้งสองแยกตัวออกจากกันได้ง่ายขึ้น เพื่อเป็นการพิสูจน์สมมุติฐานนี้จึงได้มีการศึกษา ligand-receptor binding constant (Kd) ระหว่าง FXIIIA และ FXIIIB ที่สกัดจากพลาสมาของผู้ที่มีจีโนไทป์เป็น FXIIIB His/His และ Arg/Arg โดยการผสม purified FXIIIA ในปริมาณต่างๆ กับ 300 ng ของ purified FXIIIB ที่มีจีโนไทป์เป็น His/His หรือ Arg/Arg แล้วตรวจวัดปริมาณ A_2B_2



รูปที่ 5: Dissociated fraction (DF) ของ FXIII A₂B₂ ในแต่ละจีโนไทป์ของ FXIIIB His95Arg polymorphism ซึ่ง DF ในผู้ที่มี Arg allele มีค่าสูงกว่าผู้ที่มี His allele อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.013)³⁶

ที่เกิดขึ้น จากนั้นคำนวณ Kd จาก double reciprocal plot ระหว่างความเข้มข้นของ FXIIIA และ FXIIIA₂B₂³⁶ พบว่า Kd ของทั้งสองจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างกัน (FXIIIB His95 vs FXIIIB Arg95 = 1.24×10^7 (mol/l)⁻¹ vs 1.23×10^7 (mol/l)⁻¹)

จะเห็นว่าผลจากการศึกษาปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง purified FXIIIA และ purified FXIIIB ไม่สอดคล้องกับผลของการศึกษาการสลายพันธะของ FXIIIA₂B₂ ในพลาสมา ซึ่งอาจเนื่องมาจากในการคัดเลือกพลาสมาสำหรับเตรียม purified FXIIIA ไม่ได้คำนึงถึง polymorphism อื่นๆ ของ FXIIIA ที่มีผลต่อแอกติวิตีของ FXIII เช่น Val34Leu, Pro564Leu และ Tyr204Phe จึงอาจสันนิษฐานได้ว่ามีปัจจัยอื่นในพลาสมาและ/หรือ

polymorphism ชนิดอื่นนอกเหนือจาก FXIIIB His95Arg ที่มีผลต่อการสลายพันธะระหว่าง A₂B₂ ดังนั้นหากมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง หรืออาจศึกษาปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง purified FXIIIA และ purified FXIIIB โดยวิธีที่มีความไวสูง เช่น surface plasmon resonance อาจนำไปสู่การอธิบายถึงบทบาทของ sushi domain ของ FXIIIB ในการจับกับ FXIIIA ในการเกิดเป็น FXIIIA₂B₂ ในพลาสมา

บทสรุป

FXIII เป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มเสถียรภาพของลิ่มเลือด ทำให้ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นไม่ถูกสลายไปก่อนที่จะห้ามเลือดได้อย่างสมบูรณ์ ในปัจจุบันได้มีการศึกษาถึง

ความสัมพันธ์ของ FXIII กับภาวะเลือดออกผิดปกติและภาวะหลอดเลือดมีลิ่มเลือดอย่างกว้างขวางโดยศึกษาถึงในระดับโมเลกุล ได้มีการค้นพบการเปลี่ยนแปลงของจีนที่ควบคุมการแสดงออกของ FXIIIA และ FXIIIB หลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กับภาวะเลือดออกผิดปกติ สำหรับในส่วนที่เกี่ยวข้องกับภาวะหลอดเลือดมีลิ่มเลือดมีรายงานเฉพาะในส่วนของ FXIIIA สำหรับรายงานเกี่ยวกับ FXIIIB ยังมีอยู่น้อยมาก Komanasin และคณะ^{36,38} ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ FXIIIB กับภาวะหลอดเลือดมีลิ่มเลือด ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่า FXIIIB มีบทบาทในการทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดมีลิ่มเลือดสรุปได้เพียงว่า FXIIIB His95Arg มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด และสันนิษฐานว่า FXIIIB His95Arg polymorphism อาจไม่ได้เป็นปัจจัยหลักเกี่ยวกับการเกิดภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือด นอกจากนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้จากบทบาทของ FXIIIB Arg95 ในการทำให้การสลายพันธะระหว่าง A₂B₂ tetramer เกิดขึ้นได้ง่ายกว่าปกติ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ FXIIIB ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะหลอดเลือดดำมีลิ่มเลือดจึงเป็นเรื่องหนึ่งที่น่าสนใจและน่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมซึ่งอาจทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับบทบาทของ sushi domains ในการจับกับ FXIIIA เพื่อเกิดเป็น FXIIIA₂B₂ tetramer

เอกสารอ้างอิง

1. Ichinose A. The physiology and biochemistry of factor XIII. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham E, eds. Haemostasis and thrombosis. 3rd ed. London: Chuechill Livingstone 1994: 531-46.
2. Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA. Human factor XIII from plasma and platelets. Molecular weights, subunit structures, proteolytic activation, and cross-linking of fibrinogen and fibrin. J Biol Chem 1973;248:1395-407.
3. Chung SI, Lewis MS, Flok JE. Relationships of the catalytic properties of human plasma and platelet transglutaminase (activated blood coagulation factor XIII) to their subunit structures. J Biol Chem 1974;249:940-50.
4. Ashcroft AE, Grant PJ, Ariens R. A study of human coagulation factor XIII A-subunit by electrospray ionisation mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2000;14:1607-11.
5. Ichinose A, Hennekens LE, Fujikawa K, Davie EW. Amino acid sequence of the a-subunit of human factor XIII. Biochemistry 1986;25:6900-6906.
6. Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for the a subunit of human factor XIII (plasma transglutaminase), a blood coagulation factor. Proc Nat Acad Sci 1988;85:5829-33.
7. Takagi T, Doolittle RF. Amino acid sequence studies on factor XIII and the peptide released during its activation by thrombin. Biochemistry 1974;13:750-6.
8. Ichinose A, McMullen BA, Jujikawa K, Davie EW. Amino acid sequence of the b subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments. Biochemistry 1986;25:4633-38.
9. Ariens RA, Lai T, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. Blood 2002;100:743-54.
10. Aeschlimann D, Paulsson M.

- Transglutaminase: protein cross-linking enzymes in tissue and body fluid. *Thromb Haemost* 1994;71:402-15.
11. McDonagh J, Fukue H. Determinants of substrate specificity for factor XIII. *Sem Thromb Hemost* 1996;22:369-76.
 12. Mary A, Achyuthan KE, Greenberg CS. b-chains prevent the proteolytic inactivation of the a-chains of plasma factor XIII. *Biochem et Biophys Acta* 1988; 966:328-33.
 13. Lozier J, Takahashi N, Putnam FW. Complete amino acid sequence of human plasma b2- glycoprotein I. *Proc Nat Acad Sci* 1984;81:3640-4.
 14. Bottenus RE, Ichinose A, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for the b subunit of human factor XIII. *Biochemistry* 1990;29:11195-209.
 15. Webb GC, Coggan M, Ichinose A, Board PG. Localization of the factor XIII B subunit gene (F13B) to chromosome bands 1q31-32.1 and restriction fragment length polymorphism at the locus. *Hum Genet* 1989;81:157-60.
 16. Board PG. Genetic polymorphism of the B subunit of human coagulation factor XIII. *Am J Hum Genet* 1980;32:348-53.
 17. Board PG. Genetic heterogeneity of the B subunit of coagulation factor XIII: resolution of type 2. *Ann Hum Genet* 1984;48:223-8.
 18. Nakamura S, Ohue O, Abe K. Genetic polymorphism of coagulation factor XIII B subunit in the japanese population: description of three new rare alleles. *Hum Genet* 1986;73:183-5.
 19. Dykes DD, Polesky HT. The use of the serum protein factor XIIIb (F XIIIb) in parentage testing. *Am J Pathol* 1987;88:627-30.
 20. Leifheit HJ, Cleve H. Analysis of genetic polymorphism of coagulation factor XIII (FXIIIb) by isoelectric focusing. *Electrophoresis* 1988;9:426-9.
 21. Hashiguchi T, Saito M, Morishita E, Matsuda T, Ichinose A. Two genetic defects in patient with complete deficiency of the b-subunit for coagulation factor XIII. *Blood* 1993;82:145-50.
 22. Hashiguchi T, Ichinose A. Molecular and cellular basis of deficiency of the b subunit for factor XIII secondary to a Cys430-Phe mutation in the seventh Sushi domain. *J Clin Invest* 1995;95:1002-8.
 23. Izumi T, Hashiguchi T, Castaman G, Tosetta A, Rodeghiero F. Type I factor XIII deficiency is caused by a genetic defect of its b subunit: insertion of triplet AAC in exon III leads to premature termination in the second Sushi domain. *Blood* 1996;87:2769-74.
 24. Souri M, Higashi Y, Girolami A. A founder effect is proposed for factor XIII B subunit deficiency caused by the insertion of triplet AAC in exon III encoding the second Sushi domain. *Thromb Haemost* 1998;80:211-3.
 25. Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Geming N, Carte A, Mikkola H, Grant PJ. Association of common polymorphism in the FXIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1998;79:8-13.
 26. Catto AJ, Kohler HP, Coore J, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the FXIII gene with venous thrombosis. *Blood*

- 1999;93:906-8.
27. Franco RF, Reitsma PH, Lourenco D, Maffei FH, Morelli V, Tavella MH, et al. Factor XIII Val34Leu is a genetic factor involved in the aetiology of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999;81:676-9.
 28. Wartiovaara U, Perola M, Mikkola H, Tötterman K, Savolainen V, Penttilä A, et al. Association of FXIII Val34Leu with decreased risk of myocardial infarction in Finnish males. *Atherosclerosis* 1999;142:295-300.
 29. Franco RF, Pazin-Filho A, Tavella AH, Simões MV, Marin-Neto JA, Zago MA. FXIII Val34Leu and the risk of myocardial infarction. *Haematologica* 2000;85:67-71.
 30. Renner W, Köppel H, Hoffman C, Schallmoser K, Stenger O, Toplak H, et al. Prothrombin G20210A, factor V Leiden, and factor XIII Val34Leu: common mutations of blood coagulation factors and deep vein thrombosis in Austria. *Thromb Res* 2000;99:35-9.
 31. Canavy I, Henry M, Morange PE, Tired L, Ebagosti A, Bory M, et al. Genetic polymorphisms and coronary artery disease in the South of France. *Thromb Haemost* 2000;83:213-6.
 32. Gemmati D, Serino ML, Ongaro A, et al. 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;67:183-8.
 33. Van Hylckama Vlieg A, Komansin N, Ariëns RAS, Poort SR, Grant PJ, Bertina RM, et al. Factor XIII Val34Leu polymorphism, factor XIII antigen levels and activity and the risk of deep vein thrombosis. *Br J Haematol* 2002;119:169-75.
 34. Catto AJ, Kohler HP, Banna S, Stickland M, Carter A, Grant PJ. Factor XIII Val34Leu: a novel association with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998;29:813-6.
 35. Corral J, Iniesta JA, González-Conejero R, Villalón, Vicente V. Polymorphisms of clotting factor modify risk for primary intracranial hemorrhage. *Blood* 2001;97:2979-82.
 36. Komansin N. Functional analysis of the B-subunit of factor XIII. Leeds: The University of Leeds, 2001. 295 pp. PhD Thesis.
 37. Komansin N, Carter AM, Futers TS, Ariëns RAS, Grant PJ. Factor XIIB G30899A polymorphism and messenger RNA stability [Abstract]. *Thromb Haemost* 2001 (suppl).
 38. Komansin N, Futers TS, van Hylckama Vlieg A, Carter AM, Ariëns RAS, Rosendaal FR, et al. The His95Arg polymorphism in the factor XIII B-subunit and the risk of venous thrombosis [Abstract]. *Thromb Haemost* 2001 (suppl).
 39. Komansin N, Futers FS, Ariëns RAS, Grant PJ. A novel polymorphism in the factor XIII B subunit (His95Arg) in relation to the dissociation of the A₂B₂ tetramer [Abstract]. *Thromb Haemost* 1999 (suppl) : P38.