



Trombotik Risk Değerlendirmesi **Sık Rastlanan, Tedavi Edilebilir Genetik Bir Hastalık İçin** **Moleküler ve Konvansiyonel Testler***

Richard D. PRESS¹

Thomas G. DELOUGHERY¹

Venöz tromboemboli (VTE) oldukça sık gözlenmektedir. Yılda her 1000 kişiden yaklaşık birini etkilemekte, 60,000 kişinin ölümüne neden olmakta ve tüm bir yaşam boyunca klinik prevalansı yaklaşık % 5 civarında bulunmaktadır (1,2). Son zamanlara kadar tıp dünyası trombofiliyi genetik bir hastalık olarak görmüyordu. Fakat bugün, birkaç gende spesifik genetik defektlerin belirlendiği ortak bir hastalığın en iyi örneklerinden birini oluşturmaktadır. Gerçekte, tüm VTE vakalarının yarısına yakını en az bir genetik mutasyon sonucu gelişmektedir. Diğer genellikle tedavisi olmayan klasik genetik hastalıkların tersine VTE'nin antikoagülan tedavisi sadece semptomatik olayların tedavisinde değil aynı zamanda yüksek rekürren riskli hastalarda gelişebilecek olayların önlenmesinde de etkilidir.

Trombofilik olarak bilinen hiperkoagüle durum, koagülasyon veya antikoagülasyon şelalesinde yer alan bir veya birkaç üyedeki kalıtsal veya akkiz defektler sonucu gelişir. Bu defektler sonuçta alt ekstremite lerin derin ven trombozu, pulmoner emboli ve/veya sekellerine yol açar. VTE geçiren fakat trombofilisi olmayan hastalarla karşılaştırıldığında, hiperkoagüle hastalarda, VTE daha genç yaşlarda (45 yaşından önce) ortaya çıkar, tekrarlayıcı özelliindedir, pozitif aile hikayesi vardır, emboli olağan dışı ana-

tomik bölgelerde (serebral, mezenterik veya vena cava venleri) gelişir ve spontan olaylar bilinen bir eksternal provokasyonun etkisi olmadan (veya minimal) gözlenir.

Tıp dünyası VTE için çeşitli akkiz risk faktörleri belirlemiştir. Bu akkiz pro-trombotik riskler genellikle reverzibl olduğu için kalıcı, irreverzibl kalıtsal trombotik risk faktörlerinden ayırt edilmeleri gerekmektedir. Antikoagülan tedavinin süresi ve dozu trombotik provokasyonun kalıcı veya geçici olmasına göre düzenlenmektedir. Bu nedenle, akkiz ve/veya kalıtsal risk faktörlerinin spesifik laboratuvar testleriyle araştırılması çok sık rastlanan bu hastalığın uygun bir şekilde takibi için gereklidir.

Trombofilinin Kalıtsal Nedenleri

Trombofilik hastaların % 60 kadarında hastalıkla ilişkili olan altı büyük genetik değişiklikten bir veya birkaçı bulunur. Ve son altı yılda araştırmacılar trombofilide rol oynayan üç yeni ortak gen belirlemişlerdir: faktör V, protrombin ve MTHFR. Bugün kalıtsal trombofilili tüm vakaların yarısından fazlasında bu genlerde defektler belirlenmiştir. Bu genlerin her birindeki mutasyonlar, iyi korunmuş, tek nükleotidli yer değiştirmeler olup DNA çalışmaları trombotik riski belirlemede gün geçtikçe artmaktadır. Bununla beraber, antikoagülan proteinlerdeki -

¹ Oregon Health Sciences University, Portland.

* Clinical Laboratory News Dergisinin Ocak 2000 sayısından çevrilmiştir.

antitrombin III, protein C ve protein S- defektlerin toplamı tüm VTE'li hastaların % 10'undan daha azını oluşturmalarına rağmen daha fazla tanınmaktadır. Buna rağmen bu testler, klinik trombofilik araştırmalarında toplumda daha sık görülen fakat daha az tanınan faktör V Leiden defektinden daha fazla istenmektedir. Laboratuvar test uygulamalarındaki bu çelişki göstermektedir ki laboratuvar uzmanları, bu hastaların büyük çoğunluğunu takip eden klinisyenlere daha etkin laboratuvar danışmanlık hizmeti sunmaları gerekmektedir.

Daha önceden bahsedilen genetik defektlerin tersine, protein C, protein S ve antitrombin III'deki trombofilik genetik değişiklikler oldukça heterojendir. Böylece DNA mutasyon testleri teknik olarak komplekstir ve klinik uygulamada nadiren yapılmaktadır. Bunun yerine, laboratuvarlar fonksiyonel kromojenik veya pıhtılaşmaya dayalı testlerle protein C, protein S ve antitrombin III yetersizliklerini değerlendirmelidir. Bu antikoagülan proteinler için immunolojik çalışmalar ihtiyatla uygulanmalıdır çünkü, bazı mutasyonlarda fonksiyonel olmayan proteinler üretilmektedir.

Faktör V Leiden (R506Q) ve Aktive Protein C Rezistansı

1993 yılından önce kalıtsal trombofilinin incelenmesi protein C, protein S ve antitrombin III'ün fonksiyonel testleriyle sınırlıydı, fakat testlerle belirlenen anormal sonuçlar VTE'li hastaların sadece % 7'sini oluşturuyordu (3). Trombofilinin laboratuvar değerlendirmesinde Dahlback ve arkadaşlarının yeni ve çok sık rastlanan bir kalıtsal trombofilik sendromu belirlemeleriyle yeni bir dönem başladı: aktive protein C'ye (APC) karşı herediter rezistans. APC aktive olmuş pıhtılaşma faktörleri V ve VIII'i parçalamakta ve inaktive edebilmektedir. Araştırmacılar, ortama APC ilave ederek ve etmeyerek aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) oranını ölçerek bozukluğu değerlendirmişlerdir (4). Kısa süre sonra, Bertina ve arkadaşları APC rezistansının sorumlusunun faktör V geninin 1691 nükleotidinde tek, iyi korunmuş bir G→A mutasyonu olduğunu keşfettiler (5). Sonuçta oluşan aminoasitteki yer değiştirme -506. sırada yer alan glutamin yerine arginin- faktör V'in APC tarafından tanınan, parçalanan ve inaktive edilen bölgesinde lokalizedir. Sıklıkla faktör V Leiden olarak bilinen R506Q mutasyonu pıhtılaşma faktörünün

inaktivasyonunda bir yetersizlik oluşturarak tromboza eğilimi artırmaktadır. Protein C, protein S ve antitrombin III yetersizlikli hastalardaki genetik heterojenitenin tersine, APC rezistanslıların % 95'inden fazlasında benzer faktör V R506Q mutasyonu vardır.

Keşfedildikten kısa süre sonra faktör V Leiden'in, en sık gözlenen kalıtsal trombofilik nedeni olduğu anlaşıldı: VTE hastalarının yaklaşık % 20'sinde, familial veya rekürren VTE'lilerin yarısına yakınında ve genel U.S popülasyonunun % 3-7'sinde bulunmaktadır. Avrupa dışı toplumlarda çok daha az rastlanmaktadır. Tromboz riski, heterozigot faktör V Leiden taşıyıcılarında 3-7 kat, homozigot taşıyıcılarda ise 50-100 kat artmıştır. Çok yüksek prevalans göstermesi nedeniyle APC rezistansı, trombofilik çalışmasına giren tüm hastalarda araştırılmalıdır.

APC rezistansı tarama testi, ekzojen APC'nin varlığında ve yokluğunda çalışılan aPTT'nin bir oranından ibarettir ve % 100'e yakın sensitivite ve spesifiteye sahiptir. APC rezistansının doğrulama testi olan faktör V Leiden mutasyon analizi, düşük veya sınırdaki APC rezistansı sonucu elde edilen tüm hastalarda, heterozigot ve homozigot formları ayırtmak için çalışılmalıdır. Bu mutasyonu belirlemek için bir PCR metodu kullanılmaktadır (6).

Trombofilinin klinik değerlendirmesindeki rolüne ilave olarak faktör V Leiden DNA testi risk altındaki asemptomatik aile üyelerinin incelenmesinde tercih edilen metodur. Asemptomatik faktör V Leiden taşıyıcılarının akrabalarına tromboz hikayeleri olmadığı sürece antikoagülan tedavi uygulanmamakla birlikte, cerrahi girişim, gebelik, oral kontraseptif kullanımı veya uzun süreli hareketsizlik gibi artmış spesifik risk periyotlarından önce antikoagülan profilaksisi uygulanması yönünden değerlendirilmelidir.

Protrombin G20210A Mutasyonu

Protrombin (faktör II) genindeki bir mutasyon ikinci sıklıkta görülen kalıtsal trombofilik nedendir. 1996'da tanımlanmış olup protrombin geninin 3'-untransle bölgesinde 20210 nükleotidinde iyi korunmuş, G→A tek baz-çifti yer değişimi olmaktadır (7). Taşıyıcılarda yüksek plazma protrombin konsantrasyonlarına karşı bir eğilim vardır. Heterozigotlar, normal beyaz popülasyonun yaklaşık % 2'sini ve rekürren veya familial trombotik olayların



% 20 kadarını oluşturmaktadır. Bu protrombin G20210A heterozigotları diğer risk faktörleri olmaksızın VTE riskini 2-5 kat artırmakta ayrıca özellikle oral kontraseptif kullanımı gibi diğer trombofilik risk faktörleri de beraberinde bulunuyorsa VTE riski daha da artmaktadır (8,9).

Diğer kalıtsal trombofilik sendromların tersine, protrombin G20210A mutasyonunun laboratuvara dayalı tanısı sadece, bir PCR yöntemiyle nükleotid yer değiştirmesinin saptanmasıyla konmaktadır. APC rezistansı gibi, protrombin mutasyonunun varlığı rekürren, familial, erken başlangıçlı veya provoke edilmemiş tüm VTE'li hastalarda araştırılmalıdır. Protrombin mutasyonu taşıyıcılarının birinci derece yakınları da DNA analizi ile tanınmalıdır. Faktör V Leiden taşıyıcılarında olduğu gibi bu mutasyonun varlığında da yüksek risk taşıyan periyotlardan önce antikoagülan profilaksisi gerekebilmektedir.

Termolabil MTHFR ve Hiperhomosisteinemi

Tiyol içeren homosistein amino asitinin yüksek düzeyleri, venöz trombozun son yıllarda belirlenen diğer bir bağımsız risk faktörüdür. Popülasyonun % 5 kadarını oluşturabilen hiperhomosisteinemi hastalarda VTE riskinde 2-3 kat artış vardır. Bu risk, faktör V Leiden veya protrombin G20210A mutasyonlarından birinin birlikteliğinde sinerjik olarak artmaktadır (8). Hiperhomosisteineminin sık görülen nedenleri arasında folat, B6 veya B12 vitaminlerinin yetersiz alımı ve homosistein metabolizmasında rol oynayan sistationin β -sentaz veya metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimlerinin kalıtsal defektleri bulunmaktadır. Özellikle çok sık görülen termolabil (tl-) MTHFR varyantının üç durumda önemli bir predispozan risk faktörü olduğu gösterilmiştir: folata bağımlı hiperhomosisteinemi; arteriyel vasküler hastalık; ve gebelikte ilişkili vasküler hastalıklar. MTHFR mutasyonu çok sıktır ve homozigot formu normal popülasyonun % 5-15'inde bulunur (10,11). Bazı çalışmalarla tl-MTHFR mutasyonunun iki kopyasının varlığının venöz tromboz için önemli bir risk faktörü olduğu gösterilmiş ise de diğer çalışmalar bu ilişkiyi gösterememiştir (12). Ayrıca, kromatografik veya immunolojik metodlarla homosistein ölçümleri arteriyel veya venöz trombofilik hastalarının incelenmesinde uygulanırken tl-MTHFR mutasyon analizi gebelik komplikasyonlu hastalarda ve nedeni belirlenemeyen

hiperhomosisteinemi hastalarda ve yakınlarında yapılabilmektedir.

Trombofilik Gen Değerlendirmesinde Moleküler Metotlar

Faktör V Leiden, protrombin G20210A ve tl-MTHFR mutasyonlarını saptamak için sıklıkla kullanılan moleküler metotlar hasta DNA'sının PCR amplifikasyonu ile başlamakta ve sonra ya allel-spesifik restriksiyon-fragman uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP), allel-spesifik PCR amplifikasyonu veya membranlarda veya mikro planlarda allel-spesifik hibridizasyonu ile devam etmektedir. FDA, trombofilik ile ilgili bu mutasyon testleri için geliştirilen reaktifleri onaylamadığından ticari olarak bulunmamaktadır. Bununla beraber doğruluğu ve kesinliği ispatlanmış araştırma amaçlı geliştirilen testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bu testler yoğun emek, özel teknikler ve eğitimli personel gerektirdiği ve test ücretleri de pahalı olduğu için tüm laboratuvarlarda çalışılmamaktadır.

DNA hazırlama işlemlerinin otomasyonunda olabilecek yenilikler, amplifikasyon reaksiyonunun düzenlenmesi ve oluşan amplikonun saptanması DNA'ya dayalı test ücretlerini belirgin bir şekilde azaltacak belki de bir noktaya kadar faktör V mutasyon testi, fonksiyonel APC rezistansı tarama testinden daha ucuz olabilecektir. Örneğin en az üç firma bugün trombofilik nokta mutasyonlarını saptamak için DNA'ya dayalı testleri geliştiriyorlar: Bio-Rad'ın (Hercules, Calif.) mDx çalışması bir yarı otomatik ELISA mikro plağında bir PCR ürününün allel spesifik hibridizasyonunu kullanmaktadır; Roche Diagnostic Corporation'ın (Indianapolis, Ind) LightCycler çalışması allel-spesifik hibridizasyon problemleriyle eş zamanlı hibridizasyon ürünlerinin floresan saptanmasını kullanmaktadır; ve Third Wave (Madison, Wis.) Invader'ın yeni enzimatik çalışması PCR dışı üründe bir hibridizasyon ürününün tanınması esasına dayanmaktadır.

Ayrıca, trombofilik için çeşitli DNA testlerinin klinik endikasyonları benzer olduğu için bu üç protrombotik mutasyonu beraber inceleyecek yeni metotlar klinik ve ekonomik olarak avantajlı olabilecektir. Geliştirilmekte olan metotlar arasında tek bir tüpte yapılan semi otomatik multi primer veya katlı PCR formatları ve de minyatür DNA çiplerinin yüzeyinde hedef ve allel spesifik hibridizasyonlar

bulunmaktadır. Katlı PCR reaksiyonlarında veya DNA çipleri üzerinde böyle 'trombofili panellerini' toplamak için geliştirilen teknoloji Human Genom Projesinin tamamlanmasından sonra ortaya çıkabilecek diğer yeni protrombotik genlerin ilavesini de kolaylaştıracaktır. Trombofilinin gelecekte olması muhtemel klinik incelemeleri arasında onlarca ve hatta yüzlerce ilgili protrombotik hedef genlerin ardışık yapılarına dayalı bireysel, anlaşılır bir risk değerlendirmesi bulunmaktadır.

Trombofilinin Laboratuvar Değerlendirmesi: Bugün ve Gelecekte

Akkiz ve kalıtsal trombotik risklerin varlığını belirlemek için ilk önemli basamak ayrıntılı bir kişisel ve aile hikayesinin alınmasıdır. Erken yaşlarda başlayan, familial, tekrarlayıcı veya provokasyonsuz gelişen VTE'li hastalarda, trombofilinin heterojen nedenlerini ayırt etmek ve uygulanacak antikoagülan tedavinin süre ve miktarını belirlemek için spesifik laboratuvar testlerinin yapılması gerekmektedir. Trombofilinin laboratuvar değerlendirmesi arasında akkiz hiperkoagüle defektler (CBC, aPTT, antitrombin III, antitrombin III, disfibrinojenemi) ve kalıtsal defektleri inceleyen testler bulunmalıdır.

Bu testlerin uygun kullanımı VTE'li hastaların % 25'inde ve tekrarlayıcı, familial veya östrojenle ilişkili VTE'lilerin yaklaşık % 60'ında bu proteinlerin ve/veya genlerin bir veya birkaçında belirlenebilir defektleri ortaya çıkartacaktır. Cost-efektif olması için, birçok laboratuvar bu trombofilik testleri sıklık sırasına göre birinci basamak testler (APC rezistansı/faktör V, protrombin, fosfolipid antikorları, protein C ve S) ve daha az sıklıkta görülen ikinci basamak testler (homosistein/tl-MTHFR, antitrombin III, disfibrinojenemi) olarak ikiye ayırmıştır. Ayrıca bazı uzmanlar bu sendromların çoğunun genç popülasyonda oldukça sık görüldüğünü ve çoklu kalıtsal ve/veya akkiz trombotik eğilimlerin birlikte görülme ihtimalinin göz ardı edilmemesi gerektiğini bildiriyorlar.

Akkiz veya kalıtsal risk faktörlerinden sadece birinin varlığı gerçekte klinik olarak belirlenen VTE'nin nedenini açıklamakta yetersiz kalabilecektir. Örneğin, ABD'deki 12 milyon faktör V Leiden heterozigotunun sadece % 20'sinde yaşamlarının herhangi bir döneminde semptomatik VTE ge-

lişmektedir (2). Pıhtı gelişenlerin yaklaşık yarısında ilave olarak akkiz veya kalıtsal bir protrombotik risk faktörü bulunmaktadır.

Sonuç olarak, son yıllarda yapılan genetik çalışmalar trombofilinin, bir veya birkaç gendeki defekt sonucu kendini gösterebilen kompleks bir hastalık sendromunun klasik bir örneği olduğunu göstermiştir. Bununla beraber, trombofilinin klinik belirtisi heterojen fakat sinerjistik predispozan risk faktörlerinin toplamının birleşik sonucu olarak düşünülmemelidir. Gelecek yıllarda, bu sık görülen predispozan risklerin laboratuvarında doğru olarak ortaya konması sadece semptomatik hastalarda uygun tedavinin belirlenmesinde değil aynı zamanda artmış tromboz riski taşıyanlarda gelişebilecek atakların önlenmesinde de önemli olacaktır.

REFERANSLAR

1. Bertina RM. 1997. Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin Chem*, 43:1678-83.
2. Milewich JP. 1998. Thrombophilia as a multigenic disorder. *Semin Thromb Hemost*, 24 Suppl 1:13-20.
3. Adcock DM, Fink L, Marlar RA. 1997. A laboratory approach to the evaluation of hereditary hypercoagulability. *Am J Clin Pathol*, 108:434-49.
4. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. 1993. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proceed Nat Acad Sci*, 90:1004-8.
5. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T. 1994. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369:64-7.
6. Liu X-Y, Nelson D, Grant C. 1995. Molecular detection of a common mutation in coagulation factor V causing thrombosis via hereditary resistance to activated protein C. *Diagn Mol Pathol*, 4:191-7.
7. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH. 1996. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*, 88:3698-703.
8. De Stefano V, Zappacosta B, Persichilli S. 1999. Prevalence of mild hyperhomocysteinemia and association with thrombophilic genotypes (factor V Leiden and prothrombin G20210A) in Italian patients with venous thromboembolic disease. *Br J Haematol*, 106:564-8.



9. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, 1999. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both Factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med*, 341: 801-6.
10. DeLoughery TG, Evans A, Sadeghi A, 1996. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase: correlation with homocysteine metabolism and late onset vascular disease. *Circulation*, 94:3074-8.
11. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, 1999. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med*. 340:9-13.
12. Ocal IT, Sadeghi A, Press RD. 1998. Risk of venous thrombosis in carriers of a common mutation in the homo- cysteine regulatory enzyme methylenetetrahydrofolate reductase. *Mol Diagn*, 2:61-.