

Venöz Trombozlu Olgularda Faktör V Leiden Mutasyonu Taşıyan Risk Grubunun Saptanması

Determination of the Risk Group in Patients with Venous Thrombosis

Dr. Pınar ATA EREN,^{a,b}
Dr. Nazım DENİZLİ,^a
Dr. H. Mehmet SÖKMEN,^a
Dr. Solmaz ERDEM,^c
Dr. Mustafa SOLAK^d

^aTıbbi Genetik Bölümü,
Haydarpaşa Numune Eğitim ve
Araştırma Hastanesi,

^bGenetik Hastalıklar Tanı Merkezi,
İstanbul

^cTıbbi Biyoloji AD,
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Kırıkkale

^dYükseköğretim Kurulu, Ankara

Geliş Tarihi/Received: 29.08.2009
Kabul Tarihi/Accepted: 23.11.2009

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Pınar ATA EREN
Haydarpaşa Numune Eğitim ve
Araştırma Hastanesi,
Tıbbi Genetik Bölümü, İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
pinaren@gmail.com

ÖZET Amaç: Bu çalışmada, merkezimize venöz tromboemboli nedeni ile başvuran olgularda Faktör V Leiden mutasyonunun sıklığı incelenerek, mutasyon taşıyan tromboemboli riski yüksek bireylerin önceden belirlenmesi ve ailelerine genetik danışma verilmesi hedeflenmiştir. **Gereç ve Yöntemler:** Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezine Ocak-Ağustos 2008 tarihleri arasında venöz tromboz şikâyeti nedeni ile başvuran toplam 72 olgu Faktör V Leiden mutasyonu açısından incelemeye alınmıştır. Olgular bilgilendirilmiş ve onamları alınmıştır. Tüm olguların aile ağaçları değerlendirilerek ailelerinde etkilenen bireyler araştırılmıştır. Olguların periferik kan örneklerinden genomik DNA proteinaz K sindirimi yöntemi kullanılarak izole edilmiştir. Faktör V 1691. nükleotid bölgesini içeren ampikonlar uygun primerler ile çoğaltılmış, RFLP yöntemi kullanılarak enzim kesimi sonrası oluşan ürünler değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Olgularımızın %22 (n= 16)'sinin kronik renal yetmezlik ve fistül problemleri ile %17 (n= 12)'sinin derin ven trombozu ile %32 (n= 23)'sinin ise serebrovasküler olay ile başvuran ve geri kalan %29 (n= 21)'unun da sık gebelik kaybı olan olgulardan oluştuğu tespit edilmiştir. Tanı merkezimizde yapılan moleküler genetik analizler sonucunda Faktör V Leiden mutasyonu açısından 59 birey normal bulunmuştur. Mutasyon saptanan 13 olgudan 4'ünün homozigot, 9'unun ise heterozigot düzeyde olduğu belirlenmiştir. Tüm olgularımız içinde mutasyonu taşıma oranı %18 olarak değerlendirilmiştir. Mutasyon taşıyanların ailelerinde en az bir tromboz geçirmiş birey bulunma riski %23 olarak saptanmıştır. **Sonuç:** Yapılan bu çalışma, merkezimize başvuran olgularda moleküler genetik analiz ve genetik danışma verilmesinin önemini ortaya çıkarmıştır. Daha büyük gruplarda trombofilinin incelenmesi ile risk taşıyan hedef kitlenin saptanması mümkün olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Venöz tromboz, trombofili, Faktör V Leiden

ABSTRACT Objective: We aimed to investigate the frequency of Factor V Leiden mutation among venous thromboembolism patients admitted to our center and we intended to detect the risk of thromboembolism in mutation carrying family members by genetic counseling. **Material and Methods:** In this study a total of 72 patients with venous thrombosis admitted to Haydarpaşa Numune Research and Training Hospital, Genetic Diseases Diagnosis Center between January and August in 2008 were investigated for Factor V Leiden mutation. Patients were informed and their consents were obtained. All of the patients had pedigree analysis and affected family members were investigated. Genomic DNA was isolated from peripheral blood using proteinase K digestion method. Factor V gene, covering 1691. nucleotide region was amplified with appropriate oligonucleotide primers and products were analyzed with RFLP method. **Results:** Twenty two percent (n= 16) of the our patients had chronic renal disease with fistula problems, 17% (n= 12) had deep venous thrombosis, 32% (n= 23) had cerebrovascular accidents and the remaining 29% (n= 21) had recurrent abortus. In our center, the molecular genetic analysis for Factor V Leiden mutation 59 revealed that had a normal allele. Among the remaining 13 patients, 4 of them were detected as homozygote and 9 of them as heterozygote for the mutation. Mutation carrier status was found 18% among all patients. The risk of having at least one family member with thrombosis was 23% in mutation carrying patients' family. **Conclusion:** As a result of this study, the importance of molecular genetic analysis and genetic counseling for the patients admitted to our center has been demonstrated. It could be possible to detect the target risk population through investigation of thrombophilia in a larger study group.

Key Words: Venous thrombosis, thrombophilia, Factor V Leiden

Hemostaz, damar hasarı sonrasında kapalı, yüksek basınçlı dolaşım sistemi içinde bütünlüğü sağlayan bir süreçtir. Damar duvarı hasarlanıp kanın damar dışına sızması sonrası, hızla hasar bölgesine yerleşen kan bileşenlerindeki hemostaz faktörleri onarım amacıyla karşılıklı etkileşime başlarlar. Trombüsün başlıca yapı taşı olan dolaşımdaki trombositler hasar bölgesine yerleşirler ve doku faktörünün açığa çıkmasıyla başlayan pıhtılaşma süreci trombin ve fibrinin oluşmasıyla sona erer.¹

Önemli bir koagülasyon faktörü olan Faktör V'in prokoagülan etkinliği aktive protein C (APC) tarafından baskılanır. Protein C kesim bölgesini değişime uğratan Faktör V Leiden mutasyonu (G1691A), genin 1691. nükleotidinin guaninden adenine değişimi sonucunda tek baz değişimi ile gerçekleşir ve kodladığı proteinin enzim kesim bölgesini değiştirerek Faktör V proteininin pıhtı oluşumundaki işlevinin sonlandırılmamasına yol açar. Bu şekilde pıhtı oluşumunu tetikleyen nedenler ortadan kalksa da, tromboza yatkınlık oluşur. Sonuçta Faktör V'in protein C tarafından yetersiz yıkımı, pıhtılaşma riskinin homozigot bireyler ile heterozigot bireylerde ömür boyu artmasına neden olur.¹

Mutasyonun normal beyaz ırkta bulunma sıklığı %5 iken, venöz tromboz geçiren bireylerde aynı sıklık %11-21'dir. Birçok çalışmada derin ven trombozu (DVT) geçiren olgularda, mutasyon taşıyanlarda, taşımayanlara oranla tekrarlama riskinin 2.4-4.1 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.

Mutant genlerin bulunmasının tromboza yatkınlığa neden olduğu yönündeki görüşler klinik bulgularla desteklenmiştir.^{1,2} Ayrıca tromboz, kanser olgularında ikinci en sık ölüm nedenidir. Virchow tarafından 19. yüzyılda ortaya atılan, damar duvarı hasarı, staz ve kan kompozisyonundaki değişiklikler ile özetlenen üç mekanizmadan son ikisi venöz trombozda etkindir. Artmış koagülasyon yatkınlığı edinsel ve ailesel nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Ailevi artmış koagülasyon yatkınlığı düşünülüğünde olgularda yaşam boyu tekrarlayan ve hayati tehlike içeren venöz tromboemboli riski bulunur. Venöz trombozlu aile bireyi öyküsü varlı-

ğında, 45 yaşından genç olgularda, sık tekrarlayan düşükler, erken doğum veya her ikisini yaşayan olgularda ve edinsel risk faktörlerini taşımayanlarda ailesel trombofili düşünülmelidir.²

Tromboemboliye yol açan genetik nedenler olan antitrombin III eksikliği, protein C ve S eksikliği, Faktör V Leiden, Protrombin 20210, MTHFR genleri mutasyonları ile pıhtı oluşumuna zemin hazırlayan edinsel nedenler [immobilizasyon, majör cerrahi, malignite, östrojenler, antifosfolipid antikor sendrom, miyeloproliferatif hastalıklar, heparine bağlı trombositopeni (HIT), uzun hava yolculuğu, diyabet, hipertiroidizm] sıklıkla birlikte bulduklarından, olgunun ailesel trombofili yönünden hangi testlerle ve hangi zamanda değerlendirilmesi gerektiği, antikoagülan tedavinin süresinin değişip değişmeyeceği ve aile bireylerinin incelemeye alınıp alınmayacağı konusunda karar verilmesini güçleştirirler.³

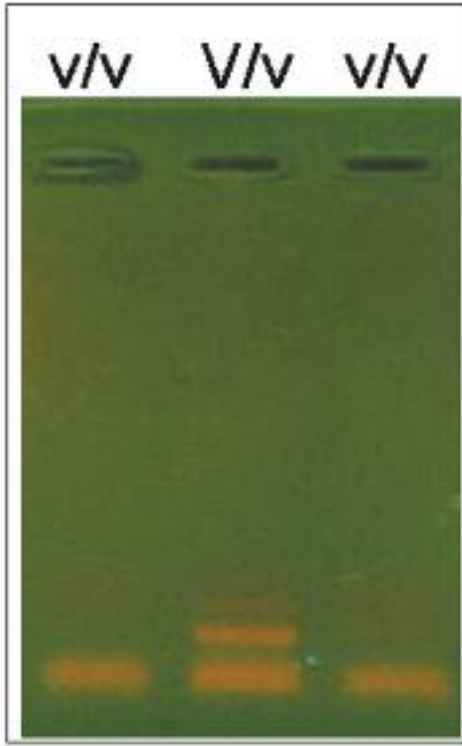
Bu çalışmanın amacı, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezimize başvuran, tromboemboli yaşayan olguların genetik risk faktörlerinden Faktör V Leiden mutasyonunun saptanarak ailelere verilen genetik danışma ile fayda sağlanabilecek risk grubunun tanımlanmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu kesitsel çalışmada, Ocak-Ağustos 2008 tarihleri arasında merkezimize gebelik kaybı, kronik renal yetmezlik, fistül problemleri, serebrovasküler olay ve DVT nedeni ile rutin olarak başvuran 72 tromboemboli olgusundan (46 kadın, 26 erkek) bilgilendirilmiş onam alınarak, Faktör V Leiden mutasyon analizi yapılmış ve ailelerine genetik danışmanlık verilmiştir. Çalışma için olgular bilgilendirilmiş ve onamları alınarak etik kurulu kararına başvurulmuştur.

Kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak standart yöntemler ile DNA ekstraksiyonu yapılmıştır (SDS ile parçalama, proteinaz K sindirimi, fenol/kloroform ekstraksiyonu ve etanol çöktürme).

Faktör V 1691 bölgesi, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile 20 mL sonuç hacimde 95°C'de 15 dakika denatürasyonu takiben, 5 döngü 94°C'de 1 dakika, 63°C'de 1 dakika,



RESİM 1: Agaroz jel görüntüsü (homozigot normal v/v, heterozigot mutant V/v).

72°C'de 1 dakika ve 30 döngü, 94°C'de 30 saniye, 63°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 72°C'de 5 dakika uzama işlemleri ile çoğaltılmıştır. PCR ürünleri %2.5'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirilmiştir (Attomol, Almanya) (Resim 1). Mutasyon taşıyan bireylerde 146 baz çiftlik bir bant bölgesi ve yabani tip Faktör V bulunduranlarda ise 173 baz çiftlik bir bölge saptanmıştır.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Mutasyonu taşıyan ve taşımayan bireylerin yaşları, serum değerleri ve ailedeki risk taşıyan birey sayıları değerlendirilmiştir. SPSS 13.0 programı yardımıyla mutasyonu taşıyan ve taşımayan bireylerin C-reaktif protein (CRP) değerleri normallik analizi ile değerlendirilip varyansların homojenliği Liliefors testi ile belirlenerek gruplar karşılaştırılmıştır. Heterozigot ve homozigot olan bireylerde mutasyonu olmayanlara göre CRP ve sedimentasyon değerleri ortalamaları arasındaki farkın anlamlılığı Student t-testi kullanılarak analiz edilmiştir. Mutasyonu taşıyan ve taşımayanların yaşları, ailelerinde buldukları etkilenen birey sayıları ve cinsiyet dağılımı arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanılmıştır. p değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Olgularımızın 16 (%22)'sinin kronik renal yetmezlik ve fistül problemleri ile 12 (%17)'sinin DVT ile 23 (%32)'ünün ise serebrovasküler olay ile başvuran ve geri kalan 21 (%29)'ünün sık gebelik kaybı olanlardan oluştuğu tespit edilmiştir. DVT geçiren 12 olgunun 6'sında ekstremitelerde, 1'inde pulmoner ven bölgesinde, ve 2'sinde ise karaciğerde ven trombozu saptanmıştır. Tanı merkezimizde yapılan moleküler genetik analizler sonucunda Faktör V Leiden mutasyonu açısından 59 birey normal bulunmuştur. Geriye kalan 13 olguda mutasyon saptanmış

TABLO 1: Mutasyonu homozigot, heterozigot olarak taşıyan ve mutasyon taşımayan olguların özellikleri.

	Faktör V Leiden (mutant hasta) (V/V) homozigot n= 4 (V/v) heterozigot n= 9 n=13	Faktör V Leiden (sağlıklı normal) (v/v) homozigot n= 59	Toplam n= 72
Yaş (yıl)	30 ± 5*	38 ± 2	35.4 ± 3
Cinsiyet (K/E)	8/5	38/21	46/26
Başvuru şikâyeti I, II, III, IV**	5/4/1/3	11/8/22/18	16/12/23/21
Eşlik eden hastalık	1 olguda DM, 2 olguda HT	2 olguda HT	5/72***
Trombozun etkilendiği bölge	Santral 2/periferik 11	Santral 22/periferik 37	Santral 24/periferik 48
C-reaktif protein	1.52 ± 0.6	0.7 ± 0.4	0.85 ± 0.5

* Ortalama yanında verilen değerler standart sapmadır. ** I: Kronik renal yetmezlik ve fistül problemleri, II: Derin ven trombozu, III: Serebrovasküler olay, IV: Sık gebelik kaybı;

*** DM: Diabetes mellitus, HT: Hipertiroidizm; bu hastalıkları bulunduranların toplam sayısı verilmiştir.

olup bunların 4'ünün homozigot, 9'unun ise heterozigot düzeyde olduğu belirlenmiştir. Mutasyon taşıyan, homozigot-heterozigot ve mutasyon saptanmayan olguların biyokimyasal ve demografik özellikleri Tablo 1'de görülmektedir. Faktör V Leiden mutasyonu taşıyan bireylerin 3'ünün ailesinde en az bir tromboz olayı olan birey öyküsü not edilmiştir. Heterozigot ve homozigot olan bireylerde mutasyonu olmayanlara göre CRP ve sedimentasyon değerlerinin daha yüksek olduğu ($p < 0.05$) bulunmuştur. Faktör V Leiden için homozigot olan 4 kişiden 1'inin DVT, 3'ünün tekrarlayan düşük öyküsü olduğu anlaşılmıştır. Faktör V Leiden heterozigot olan bireylerin ise 5'inin kronik renal yetersizlik hastası olup fistül trombozu ile 3'ünün DVT ile ve 1'inin ise serebrovasküler olay ile başvurduğu belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Trombofilinin genetik nedenlerinin tespitinin amacı, şüphesiz çevre faktörlerinin etkisiyle artan riskin önceden belirlenmesini, dolayısıyla mortalite ve morbiditesi yüksek olan tromboembolik olayların önlenmesini sağlamaktır. APC direnci testi, Faktör V Leiden mutasyonu için oldukça hassas ve spesifik bir test olmasına rağmen DNA bazlı Faktör V Leiden analizi; düşük değerdeki APC direncinin Faktör V Leiden dışındaki nedenlerinin yanı sıra kuvvetli lupus inhibitörleri ve belirgin olarak uzamış aPTT'nin araştırılması, çok düşük APC direnci test değerlerinin bulunması nedeni ile heterozigotların tanımlanması ve sınırda APC test değeri olanların incelenmesinin gerektiği olgularda yapılmaktadır.^{2,3}

Beyaz ırkta Faktör V Leiden mutasyon sıklığının %5 civarında ve homozigotluk oranının da 1/5.000 olduğu bildirilmiştir. Farklı popülasyonlarda farklı prevalans değerleri bulunmuştur. Nitekim prevalans, analiz edilen olguların popülasyonuna göre değişmektedir. İlk kez DVT geçiren olguların yaklaşık %15-20'sinde ve tekrarlayan venöz tromboembolisi veya östrojen ile ilişkili trombozu olan olguların %50'sinde Faktör V Leiden mutasyonu na rastlanmıştır.⁴⁻⁷

Bizim çalışma grubumuzda mutasyon taşıma oranı DVT'li olgularda %33, serebrovasküler olay

geçirenlerde %4, kronik renal yetersizlikli tromboz geçirenlerde %31 ve sık tekrarlayan düşüğü olan kadınlarda %14 olarak bulunmuştur.

Aile bireylerinin test ile değerlendirilmesinin gerekliliği tartışmalı olsa da, Noboa ve ark. Faktör V Leiden'li olguların yakınlarının %7-12'sinde, mutasyon taşımayan venöz trombozlu olguların ise %2-3'ünde venöz trombozun bulunduğunu saptamışlardır.⁵ Bizim çalışmamızda ise Faktör V Leiden mutasyonu taşıyan olgularımızın %23'ünün aile bireylerinin en az birinde tromboembolizm geliştiği dikkati çekmiştir. Bu sonuç, Martinelli ve ark.'nın bu mutasyonları taşıyan olguların aile bireylerinden olan 1.076 kişi üzerinde yaptıkları çalışmada elde ettikleri %17.1 oranından yüksektir.^{5,6} Akriba evliliği sıklığının yüksek, olgu sayımızın ise az olmasının bu sonuçta etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

Heterozigot taşıyıcıların hayatları boyunca tromboemboli geçirme risklerinin %10 olduğu tespit edilmiştir.⁷ Trombotik olayların %50'si özellikle gebelik gibi diğer risk faktörleri ile ilişkili bulunmuştur. Çalışma grubunda serebrovasküler olay geçiren 7 kişinin diyabet hastası olması, bu grupta genetik faktörlerden çok, tromboemboli için edinsel faktörlerin etkin olduğunu ortaya koymuştur. Üç değişik çalışmada Faktör V Leiden mutasyonu taşıyanların aile bireylerinde de tromboz öyküsü bulunduğu anlaşılmıştır. Bu kişilerin venöz tromboz insidansının birinci dereceden yakınlarında yıllık %1.7 olması, aile öyküsünün tromboz için risk faktörü olduğunu göstermiştir.⁸⁻¹⁰ Bu nedenle aile bireylerinin test ile değerlendirilmesinin ayrı ayrı, kişiye özgü olarak yapılması gerekmektedir. Faktör V Leiden mutasyonu taşıyan olgularımızın %23'ünün aile bireylerinin en az birinde tromboembolik olay olduğu belirlenmiştir. İndeks olgulardan yola çıkılarak ailede tromboz riskinin belirlenmesi ile mutasyon taşıyan bireylerin patolojile karşılaşmadan kontrol altına alınabilmesi mümkün olabilmektedir.^{11,12}

SONUÇ

Faktör V Leiden mutasyonu taraması ile bu defekt tanımlandığında, yüksek riskli olgularda, antikoagülasyon profilaksisinin ve acil tıbbi bakımın ge-

rektiği durumların önceden saptanabilmesi için bu olgu grubuna genetik danışma verilmesi yararlı olacaktır. Ancak ailelerin, Faktör V Leiden allel varlığının bir risk faktörü olmakla birlikte

tromboz oluşumunun kesin göstergesi olmadığını ve venöz trombozun klinik olarak aynı ailede farklı tablolarla gelişebileceğini bilmesinde yarar vardır.

KAYNAKLAR

1. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008;359(9):938-49.
2. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001; 344(16):1222-31.
3. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995;346(8983): 1133-4.
4. Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, Korf BR, Heit JA; ACMG Factor V. Leiden Working Group. American College of Medical Genetics consensus statement on factor V Leiden mutation testing. *Genet Med* 2001;3(2):139-48.
5. Nobao S, Le Gal G, Lacut K, Mercier B, Leroyer C, Nowak E, Mottier D, Oger E; EDITH Collaborative Study Group. Family history as a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Res* 2008;122(5):624-9.
6. Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM. The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol* 2000;111(4):1223-9.
7. Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA* 1997; 277(16):1305-7.
8. Middeldorp S, van Hylckama Vlieg A. Does thrombophilia testing help in the clinical management of patients? *Br J Haematol* 2008; 143(3):321-35.
9. Wu O, Robertson L, Twaddle S, Lowe GD, Clark P, Greaves M, et al. Screening for thrombophilia in high-risk situations: systematic review and cost-effectiveness analysis. The Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) study. *Health Technol Assess* 2006;10(11):1-110.
10. Robertson L, Wu O, Greer I. Thrombophilia and adverse pregnancy outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16(6):453-8.
11. Lindhoff-Last E, Luxembourg B. Evidence-based indications for thrombophilia screening. *Vasa* 2008;37(1):19-30.
12. Baykal Y, Özet G, Kocabalkan F. [The risk factors related to venous thrombosis]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1999;19(4):236-41.