

Генетични изследвания при съдови тромбози – индикации и клинични ползи

Д-Р А. НОСИКОВ

Т. КАДИЙСКА, д.б.

ЕПИДЕМИОЛОГИЯ И СОЦИАЛНА ЗНАЧИМОСТ

- Съдовите тромбози са основна причина за смърт в Европа и в частност в България
- Според локализацията се делят на артериални и венозни
- ДВТ/БТЕ е третата по честота причина за сърдечно-съдова смърт в Европа след МИ и ИМИ

Тромбози с артериална локализация

- Най-често срещани в практиката - миокарден инфаркт и ТИА/ИМИ
- Резултатите от генетичните изследвания най-често **не променят диагнозата и лечението на тези болни**
- При липса на контраиндикации или специфични клинични ситуации (напр. емболичен ИМИ), пациентите с МИ и/или ТИА/ИМИ подлежат на доживотна антиагрегация, като в определени клинични ситуации се използва DAPT (напр. след МИ и/или стентирание)
- Като изключение от горното правило може да се посочат фармакогенетичните вариации при лечение с clopidogrel, които не са част от презентацията

Тромбози с венозна локализация

- Най-често срещани в практиката – дълбоки венозни тромбози (ДВТ), засягащи долните крайници
- Белодробен тромбемболизъм (БТЕ)
- Провокирани vs непровокирани (спонтанни, идиопатични)
- Лечението се провежда с антикоагуланти
- Продължителността на лечение варира от <3 месеца до доживот (indefinite)
- Анатомия – проксимални (високорискови) vs дистални (нискорискови)

Провокирани ДВТ/БТЕ

- Предхождащ провокиращ момент - до 3 месеца преди или наличен по време на инцидента
- Травма/имобилизация/счупване на долен крайник, ортопедични операции – тазобедренно и колянно протезиране, престой в реанимация и/или залежаване, катетър-индуцирани (ЦВП, диализен катетър ...)
- Орални контрацептиви
- Онкологични заболявания
- Бременност/пуерпериум
- Рискът от рецидив на ДВТ/БТЕ при горните групи болни (онкоболните са по-специфична група) спада рязко след премахване на провокиращия момент и се приближава плътно до популационния, след период от около 3 месеца, което обуславя по-кратката продължителност на антикоагулантно лечение, наложила се в практиката. Изследването за тромбофилия в повечето случаи не носи значими клинични ползи при тази група болни – при голяма част от тях антикоагулацията може да бъде прекратена до 3тия месец от инцидента*

Непровокирани ДВТ/БТЕ

- Пациенти без ясен провокиращ момент
- Винаги трябва да се обмисля възможността за недиагностицирано онкологично заболяване (*>3 пъти по-висок риск) или вродена тромбофилия (особено при болни на възраст <45г.)
- Рискът от рецидив е по-висок отколкото при провокираните ДВТ/БТЕ, с пациентите трябва да се обсъди, по-продължителна антикоагулация (>3мес)**
- При пациентите с рекурентни непровокирани ДВТ/БТЕ, както и при тези с установена тежка тромбофилия може да се обсъдят ползите от по-дългосрочна, а дори и доживотна антикоагулация***

*Br J Gen Pract. Sep 1, 2006; 56(530): 693–696.

** NICE: Venous thromboembolic diseases: the management of venous thromboembolic diseases and the role of thrombophilia testing

Вродени тромбофилии

- Значително по-важни при ДВТ/БТЕ отколкото при МИ/ТИА/ИМИ, където атеросклерозата и руптурата на съдовата плака са по-важни за етиопатогенезата
- Често първият инцидент е на 20-30г. възраст

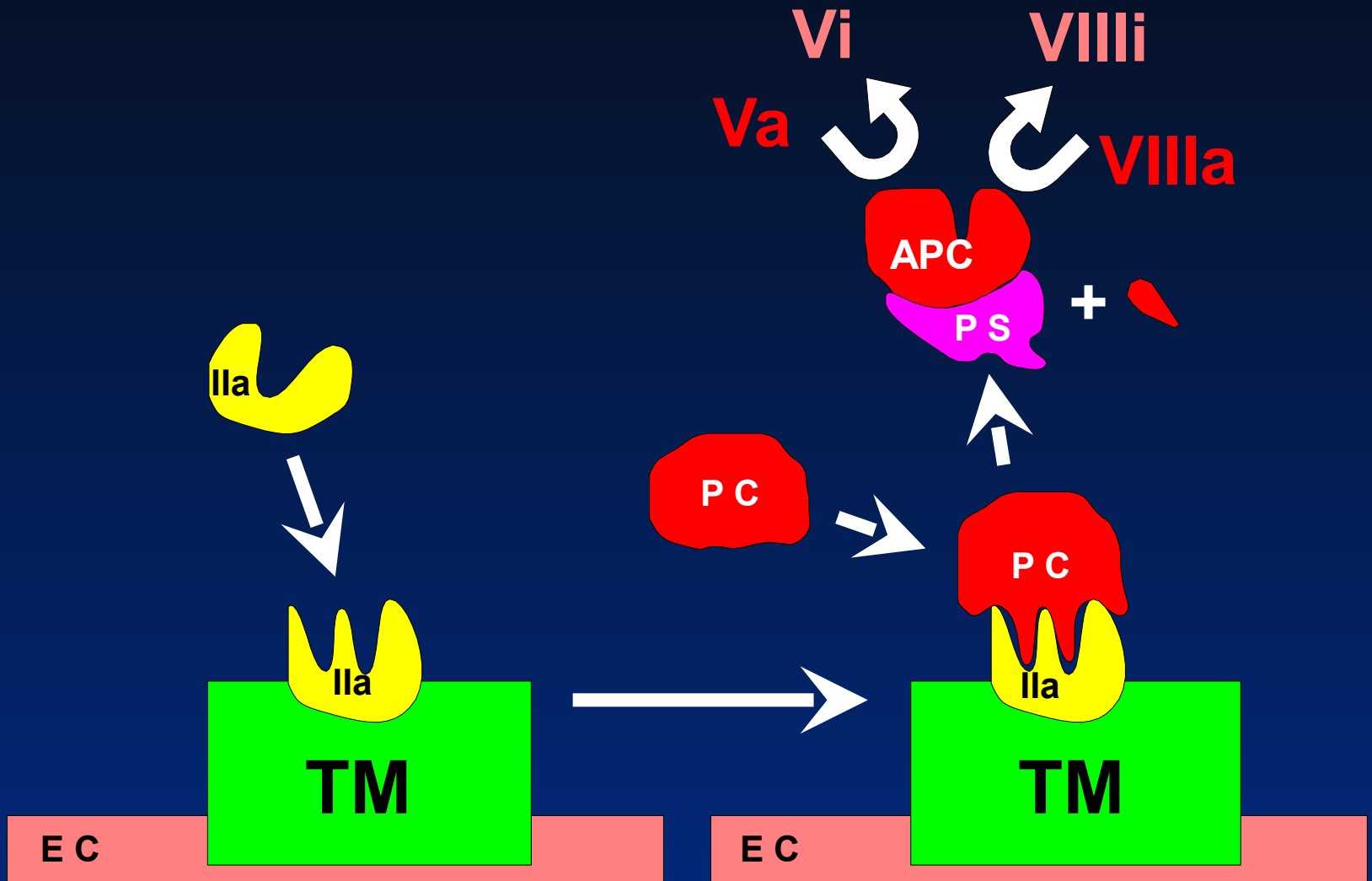
Дефекти в антикоагулацията:

1. **Дефицит на антитромбин**
2. **Дефицит на протеин С**
3. **Дефицит на протеин S**
4. **Фактор V Leiden**

Увеличена продукция на прокоагулант:

5. **Протромбин G20210A мутация**

THE PROTEIN C SYSTEM



ДЕФИЦИТ НА АНТИТРОМБИН

- 0.2-0.4% популационна честота; 2-5% от вродените тромбофилии
- По правило доминантно унаследяване
- Мутации в *SERPINC1*
- Изследва се в клиничните лаборатории - ДНК анализ не е финансово оправдан поради големия размер на гена
- Пациентите с дефицит на антитромбин, често проявяват резистентност към хепарин (вкл. и LMWH)

ДЕФИЦИТ НА ПРОТЕИН С

- Доминантна форма: 30-60% от нормалната активност на протеина
 - При около 5% от пациентите с вродена тромбофилии
- Рецесивна форма: при хомозиготи - $< 10\%$ от нормалната активност, тромботичните инциденти могат да започнат още през детството, хетерозиготите често са асимптомни
- Изследва се в клиничните лаборатории – ДНК анализ не е финансово оправдан поради големия размер на гена

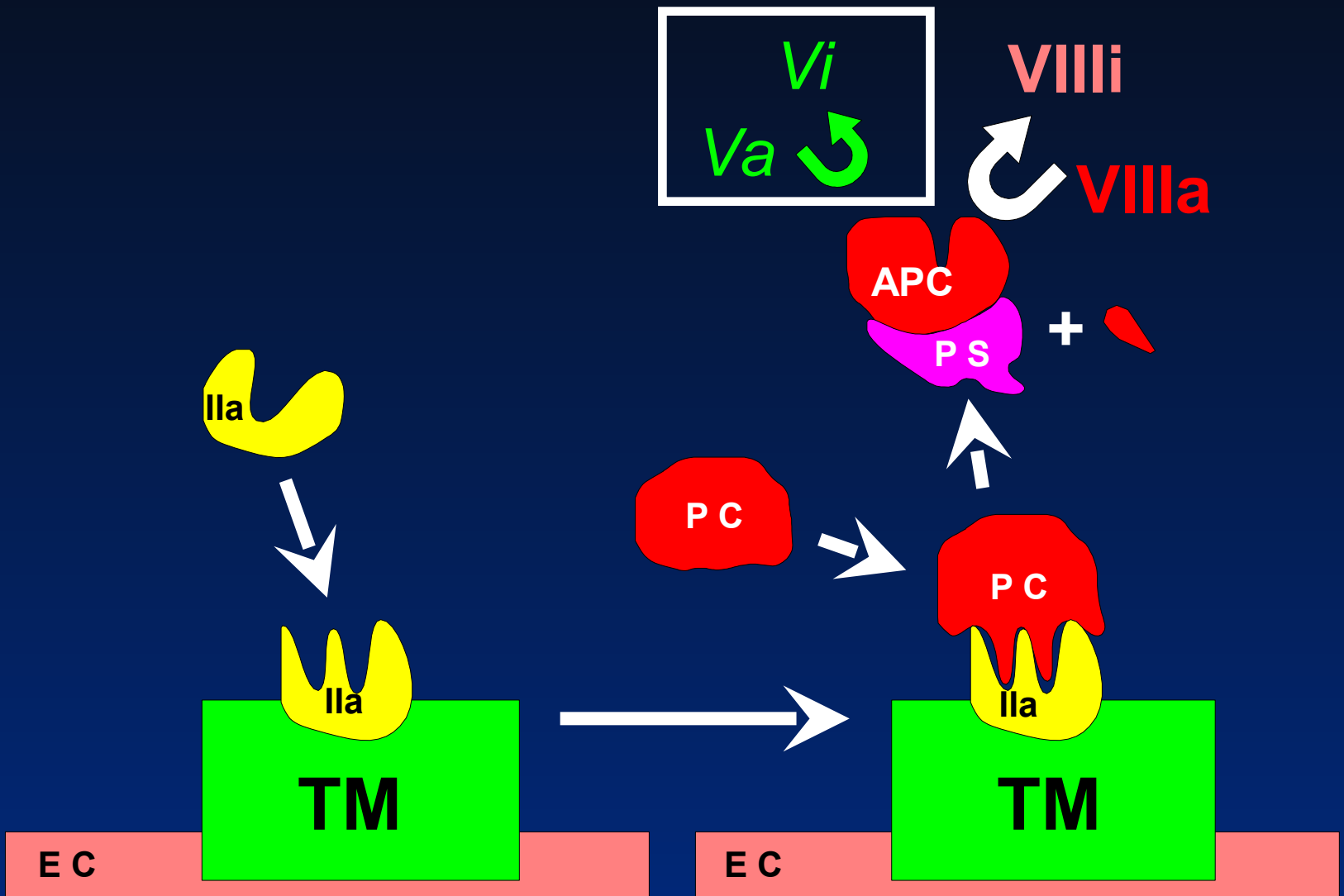
Дефицит на протеин S

- Доминантно унаследяване
При около 5% от вродените тромбофилии

Изследва се в клиничните лаборатории - ДНК анализ не е финансово оправдан поради големия размер на гена

Фактор V Leiden

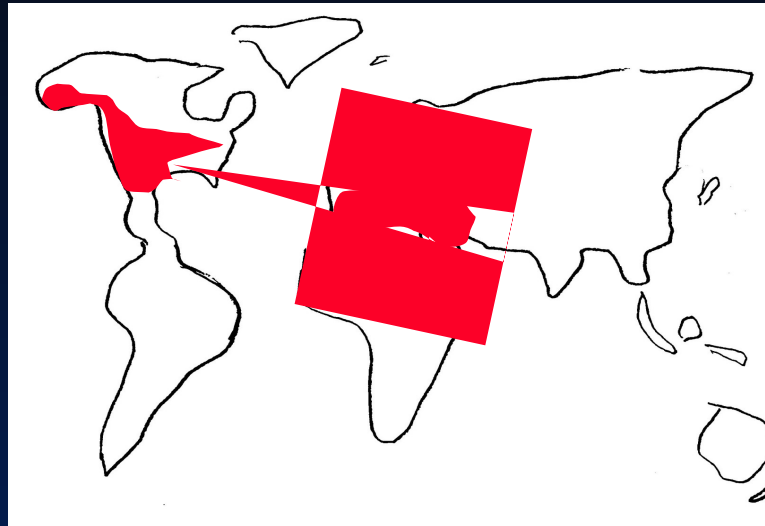
- Мутация, която променя аминокиселина 506 на гена, кодиращ Фактор V от аргинин на глутамин
- Почти всички случаи на резистентност към APC са обусловени от нея
- Около 5% от европейското население са хетерозиготни носители
- Най-честата причина за вродена тромбофилия – до 50% от случаите
- Изследва се чрез генетичен анализ
- При болни с хетерозиготно носителство на Фактор V Leiden може да се изследва и полиморфизма Фактор V R2 A4070G



Протромбин G20210A мутация

- Мутация в 3' некодиращата част от протромбиновия ген
- Хетерозиготите имат 5-10% по-високи плазмени нива на протромбин
- Хетерозиготите имат 2-3 пъти по-висок риск от венозен тромбемболизъм
- Около 1-2% хетерозиготи в популацията; до 5-7% от младите болни с ДВТ/БТЕ
- Изследва се чрез ДНК анализ

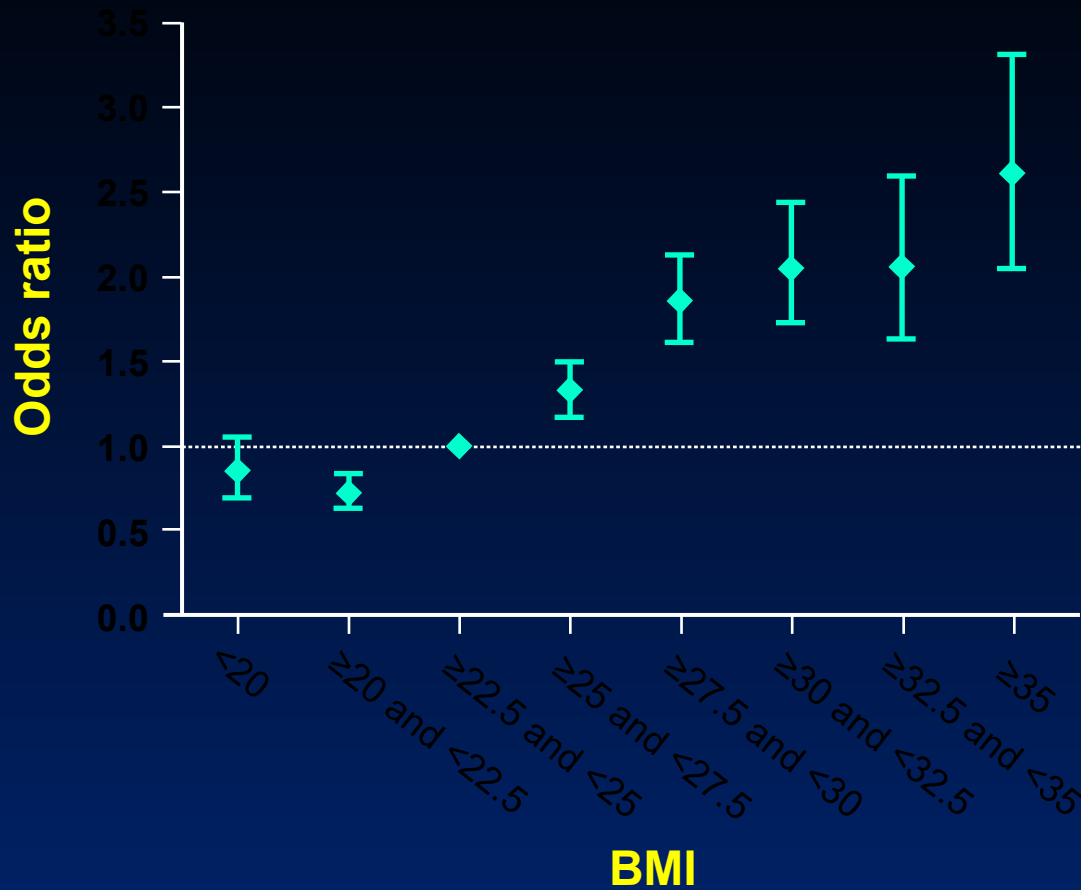
Factor V Leiden/Prothrombin 20210 20210



	Discovered	Prevalence	
		Caucasians	African Americans
Factor V Leiden ¹	1994	5%	1.2%
Prothrombin 20210 mutation ²	1996	2%	0.5%

1. Ridker PM, et al. *JAMA*. 1997;277:1305-1307.
2. Varga EA, Moll S. *Circulation*. 2004;110:e15-e18.

Аддитивен ефект на наднорменото телесно тегло



np	160	416	817	925	704	402	190	220
nc	256	865	1236	1102	626	311	154	133

Reprinted with permission from Pomp ER, et al. *Br J Haematol.* 2007;139:289-296.

Затлъстяване и орална контрацепция

Combined effect of BMI ≥ 30 kg/m² and genetic risk factors for VTE

BMI	Risk Factor	OR for Venous Thrombosis	95% CI
	OC use		
< 25	No	1	
≥ 30	No	3.04	1.66-5.57
≥ 30	Yes	23.78	13.35-42.34

Затлъстяване, тромбофилия и орална контрацепция

Combined effect of BMI ≥ 30 kg/m² and genetic risk factors for VTE

BMI	Risk Factor	OR for Venous Thrombosis	95% CI
	OC use		
< 25	No	1	
≥ 30	No	3.04	1.66-5.57
≥ 30	FVL Yes	23.78	13.35-42.34
< 25	No	1	
≥ 30	No	2.48	2.13-2.88
≥ 30	Yes	7.86	4.70-13.15

Затлъстяване и тромбофилия

Combined effect of BMI ≥ 30 kg/m² and genetic risk factors for VTE

BMI	Risk Factor	OR for Venous Thrombosis	95% CI
	OC use		
< 25	No	1	
≥ 30	No	3.04	1.66-5.57
≥ 30	FVL Yes	23.78	13.35-42.34
< 25	No	1	
≥ 30	No	2.48	2.13-2.88
≥ 30	Yes	7.86	4.70-13.15
	Prothrombin 20210		
< 25	No	1	
≥ 30	No	2.45	2.12-2.82
≥ 30	Yes	6.58	2.31-18.69

Pomp EF et al. *Br J Haematol.* 2007;139:289-296.

Тютюнопушене

Адитивен ефект на тютюнопушенето

Smoking	Risk Factor	OR for Venous Thrombosis	95% CI
	Factor V Leiden		
No	No	1	
Current	No	1.43	1.26-1.63
	Prothrombin 20210		
Never	No	1	
Current	No	1.41	1.25-1.60
Current	Yes	5.05	3.46-7.38

Porter ER, et al. *Am J Hematol*. 2008;83:97-102.

Орална контрацепция^{1,2}

	Risk = compared to women who do not take OCP	Absolute risk/year
All women of reproductive age	1	1 : 12,500
OCP	2-6x = 'd	1 : 3,000
Hetero FVL	4x = 'd	1 : 3,000
Hetero FVL + OCP	20-30x = 'd	1 : 500
BMI >30 + OCP	24x = 'd	1 : 500
Homozygous FVL + OCP	50-100x = 'd	1 : 150
BMI >30 + smoking + OCP	???	???
Homozygous FVL + BMI >30 + smoking + OCP	???	???

OCP=oral contraceptive; BMI=body mass index.

1. Varga E. *J Genet Couns.* 2007;16:261-277.
2. Pomp ER, et al. *Br J Haematol.* 2007;139:289-296.

Възраст

- 1:1000 годишна заболеваемост в общата популация
- >1:100 годишна заболеваемост при пациенти на възраст над 80г.
- Т.е. възрастово обусловения риск варира над 10 пъти
- При болни на възраст над 75г., рискът от кървене при антикоагулантната терапия е значително по-висок

Клинична оценка на риска от рецидив при ДВТ/БТЕ

Имобилизация

Онкологично заболяване

ХОББ

Мъжки пол

Затлъстяване

Нисък HDL

Симптоматична БТЕ

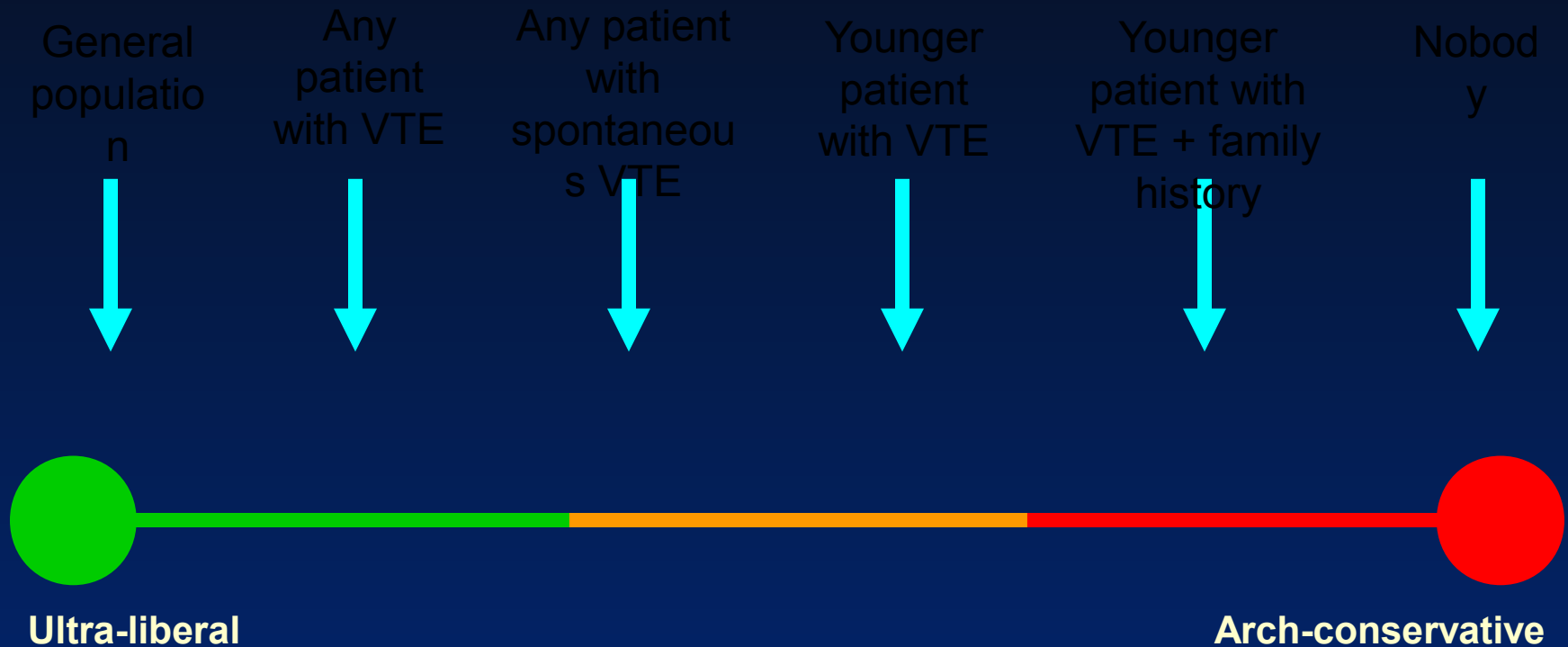
Повишени нива на D-dimer, 1 месец след прекратяване на антикоагулацията

Липса на реканализация на засегнатия сегмент след провеждане на достатъчна по продължителност/ефективност антикоагулация

Circulation.2011; 123: 664-667

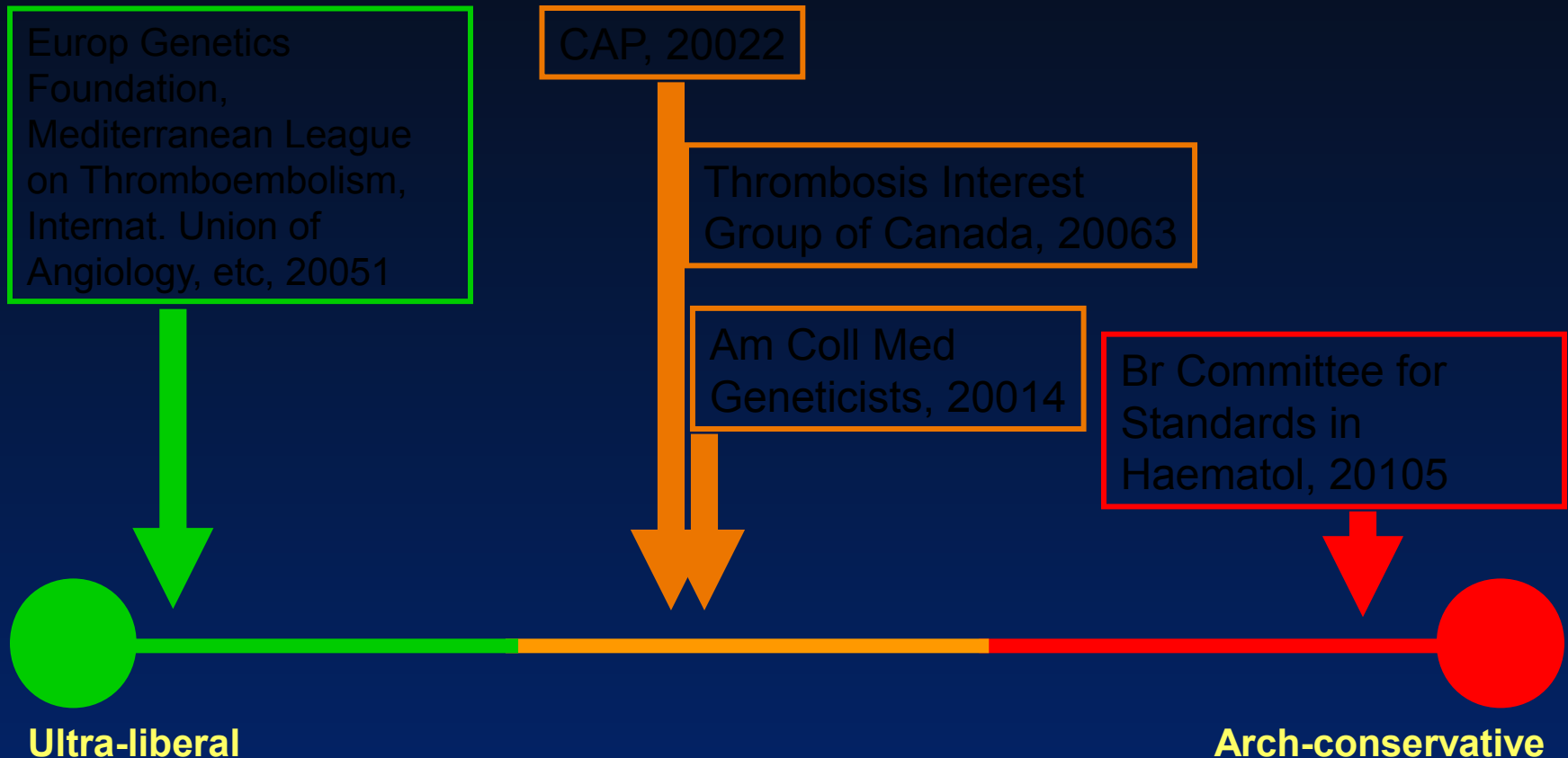
Панел за тромбофилия – при кои болни има най-голяма клинична полза?

Панел за тромбофилия – при кои болни има най-голяма клинична полза от провеждането на анализите?



1. Grody WW, et al. *Genet Med*. 2001;3:139-148.
2. Walker ID, et al. *Br J Haematol*. 2001;114:512-528.
3. Nicolaides AN, et al. *Int Angiol*. 2005;24:1-26.
4. Van Cott EM, et al. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126:1281-1295.
5. Baglin T, et al. *Br J Haematol*. 2010;149:209-220.

Which Patient to Test for Thrombophilia?



1. Nicolaides AN, et al. *Int Angiol.* 2005;24:1-26.
2. Van Cott EM, et al. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126:1281-1295.
3. The Thrombosis Interest Group of Canada. Available at: <http://www.tigc.org/eguidelines/hypercoagstates.htm>.
4. Grody WW, et al. *Genet Med.* 2001;3:139-148.
5. Baglin T, et al. *Br J Haematol.* 2010;149:209-220.

Клинични ползи

1. При пациентите с непровокирана ДВТ/БТЕ, особено когато се касае за първи инцидент и относително млади болни, установяването на дефицит на антитромбин, протеин С, протеин S, лупусен антикоагулант, хомозиготност по 20210G/A или Factor V може да промени продължителността на антикоагулантното лечение, като съвременните ръководства препоръчват (при липса на контраиндикации) да се обсъди доживотна антикоагулация
2. NICE са изключително прагматични и препоръчват изследванията за тромбофилия да се извършват само при болни с непровокирана ДВТ/БТЕ, при които предстои прекратяване на антикоагулантната терапия

2014 ESC Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism

NICE guidance 2012: Venous thromboembolic diseases: the management of venous thromboembolic diseases and the role of thrombophilia testing

Недостатъци при изследване на неселектирани/неиндицирани групи болни

1. **Цена**
2. **Стрес за асимптомните индивиди, които разбират, че са носители на определен дефект**
3. **Излишно лечение – напр. асимптомна бременна, при която се открива хетерозиготност по Factor V Leiden, назначава се профилактика с фракциониран хепарин, усложнена с хеморагичен инсулт**
4. **Пациенти с висок риск от рецидив, например 3ти инцидент на ДВТ и положителна фамилна анамнеза за ДВТ/БТЕ, подлежат на дългосрочна терапия с антикоагулант по клинични индикации, независимо от лабораторните и генетичните резултати**

Селектирана vs неселектирана извадка, правилна преценка на индикациите

1. Теорема на Bayes – post-test probability е в пряка зависимост от pre-test probability
2. При изследване на болни с неуточнени индикации се получават резултати близки до популационните
3. При селектирана група болни – например млади болни с непровокирана ДВТ/БТЕ се установява Factor V Leiden или 20210G/A при >30% от болните

Prevalence of Factor V Leiden mutation in different populations in European countries

Population (ref. No.)	No. (%) of subjects			
	patients with venous thromboembolic disease		general population	
	total	factor V Leiden mutation (%)	total	factor V Leiden mutation (%)
Greece (23)	172	55 (31.9)	104	5 (4.8)
Italy (27)	111	15 (15.3)	121	5 (4.1)
France (28)	165	24 (14.5)	200	7 (3.5)
UK (29)	471	96 (20.4)	511	15 (2.9)
The Netherlands (8)	471	92 (19.5)	474	14 (3.0)
Croatia (24)	160	33 (21.0)	155	6 (4.0)
Serbia (25)	175	52 (29.3)	120	7 (5.8)
Bulgaria (26)	128	32 (25.0)	100	9 (9.0)
Macedonia (this study)	190	40 (21.1)	200	11 (5.5)

20210G/A при 48 български пациента с БТЕ

Табл. 1 Изследвани лица - разпределение по пол и възраст в различните групи.

Изследвани лица	Брой	Възраст (год.)			Пол	
		Мин.	Макс.	средна \pm SD	мъже	жени
БТЕ	28	24	64	42.71 \pm 11,20	9	19
ДВТ/БТЕ	20	23	68	41.05 \pm 13,27	10	10
контроли	51	20	72	37.45 \pm 13,63	25	26

SD – стандартно отклонение

БТЕ – белодробен тромбоемболизъм, ДВТ/БТЕ – дълбока венозна тромбоза / белодробен тромбоемболизъм

Табл. 2 Носителство на мутация G20210A при пациенти и здрави лица.

пациенти	общ брой	брой носители на G20210A (%)	χ^2	p
БТЕ	28	9 (32.1)	7.76	0.009
ДВТ/БТЕ	20	3 (15)	0.83	0.394
контроли	51	4 (7.8)	-	-

Викентиева Е., Д. Петрова, О. Георгиев, Д. Османлиев, А. Савов, А. Носиков,

М. Балева. Мутация G20210A в гена за протромбин при пациенти с

Регистър ГМДЛ Геника Фактор V Leiden

4050 пациента

**Честота на носителство на Factor
V Leiden при неселектирана
извадка – 4.4%, преобладаващо
пациентки насочени от АГ**

**При селектирана извадка от 55
болни с ДВТ/БТЕ – 20%**

Регистър за 2012 на Национална Генетична Лаборатория

- 921 пациента
- 6.78% честота на носителство Factor V Leiden при пациентки насочени от АГ
- 21.21% честота на носителство при 66 болни с ДВТ/БТЕ
- 3.98% честота на носителство на 20210G/A при пациентки, насочени от АГ
- 15.15% честота на носителство при 66 болни с ДВТ/БТЕ

Данните са любезно предоставени от доц. А. Савов, ръководител на Националната Генетична Лаборатория

Кога бихме могли да изследваме асимптоматичен член на семейството – ВЪЗМОЖНИ ИНДИКАЦИИ

1. **Жени**
2. **Очаквана терапия с орални контрацептиви или естрогенен препарат**
3. **Силна фамилна анамнеза за дълбоки венозни тромбози на млада възраст**

NICE не препоръчва да се изследват асимптомни индивиди, дори и да са първородственици на пациенти с ДВТ/БТЕ и известно носителство

Фамилна анамнеза за ДВТ/БТЕ

- При фамилна анамнеза за ДВТ/БТЕ (първородственик с ДВТ/БТЕ) рискът е увеличен 2.5-4.2 пъти
- Увеличеният риск не зависи от това дали се установява тромбофилия от лабораторните и генетичните изследвания

1. Noboa S, et al. *Thromb Res.* 2008;122:624-629.
2. Bezemer ID, et al. *Arch Intern Med.* 2009;169:610-615.

Заклучение

1. Годишната заболеваемост от ДВТ/БТЕ е около 1:1000
2. За държава с населението на България това означава около 7000 човека с първи инцидент на ДВТ/БТЕ годишно
3. От тях 25 до 50% се очаква да са с първи непровокиран инцидент на ДВТ/БТЕ
4. По-младите болни (особено <45г.) от тази група са с най-голяма клинична полза от изследване за вродена тромбофилия, включително генетични изследвания, т.к. последващите инциденти на ДВТ/БТЕ могат да бъдат от една страна фатални, а от друга предотвратени - чрез дългосрочна или доживотна антикоагулация при пациентите с доказана тромбофилия

Документи


Направление от насочващия лекар

Информирано съгласие за ДНК анализ, подписано от пациента

ЛЕКАР

ПАЦИЕНТ

ЛЕКУВАЩ ЛЕКАР Данни:	Генетични маркери <small>предпочитаните имена</small>
ДАНИИ ЗА ПАЦИЕНТА Име:	<input type="checkbox"/> Фактор V Leiden (R506Q) 40 лв. <small>повишен тромбозен риск</small>
Дата на раждане: Телефон:	<input type="checkbox"/> Протромбин (20210G>A) 40 лв. <small>повишен тромбозен риск</small>
Адрес:	<input type="checkbox"/> PAI (4G/5G) 40 лв. <small>повишен тромбозен риск</small>
ПОВОД ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	<input type="checkbox"/> ACE (I/D) 40 лв. <small>повишен тромбозен риск</small>
МАТЕРИАЛ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	<input type="checkbox"/> Фактор XIII (Val34Leu) 40 лв. <small>повишен тромбозен риск</small>
Панели	<input type="checkbox"/> MTHFR (677C>T) 40 лв. <small>дефект на метаболита триптофан на фолиева киселина</small>
<input type="checkbox"/> Основен Панел - Фактор V Leiden (R506Q), Протромбин (20210G>A), PAI (4G/5G), MTHFR (677C>T) 160 лв.	<input type="checkbox"/> MTRR (66A>G) 40 лв. <small>дефект на метаболита триптофан на витамин B12</small>
<input type="checkbox"/> Разширен Панел 1 - Основен + ACE (I/D) и Фактор XIII (Val34Leu) 240 лв.	<input type="checkbox"/> MTHFR (1298A>C) 40 лв. <small>индивидуален отговор при абортна спонтанна спонтанна</small>
<input type="checkbox"/> Разширен Панел 2 - Основен + MTHFR (1298A>C) + MTRR (66A>G) 240 лв.	<input type="checkbox"/> VEGFA (936C>T) 40 лв. <small>егеметрично, тежка прекомпаненция, преждевременно раждане</small>
<input type="checkbox"/> Пълнен Панел - Основен + ACE (I/D) и Фактор XIII (Val34Leu) + MTHFR (1298A>C) + MTRR (66A>G) 320 лв.	<input type="checkbox"/> VEGFA (-1154G>A) 70 лв. <small>повишен риск за спонтанни аборти</small>
<input type="checkbox"/> Препоръчителен Панел при повтарящи се спонтанни аборти, преeklampсия и ендометриоза - VEGFA (936C>T), VEGFA (-1154G>A), TAFI (+505A>G) и ANXA5 (M1/M2 халотип) 250 лв.	<input type="checkbox"/> TAFI (+505A>G) 70 лв. <small>повишени се със спонтанни аборти и дълбоки венозни тромбози</small>
	<input type="checkbox"/> ANXA5 (M1/M2 халотип) 70 лв. <small>повишени се със спонтанни аборти и дълбоки венозни тромбози</small>





ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА ИЗВЪРШВАНЕ НА ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ

Име:

Дата на раждане:

Дата на посещението: Телефон/ GSM:

Получих генетична консултация с подробни разяснения относно всички възможните въпроси и давам биологичен материал:

за използване на ДНК извършване на молекулярно-генетичен анализ по повод:

Процедурата го вземаме на материал на изследване, който е информирани за резултата от анализа. Даден съгласие да се вземат всички необходими проби от моите информирани деца за ДНК анализ на горното семейство заболяване.

Име: дата на раждане: пол:

1.

2.

Този анализ ще бъде извършен в две етапа. Ще бъде информирани за резултата от анализа. Беше извършен анализ на материал за изследване ДНК ще бъде извършен за изследване на резултата от анализа. Анализът ще бъде извършен в две етапа. Първо ще бъдат взети всички проби от материал, който е информирани за резултата от анализа да бъде извършен в две етапа. Второ ще бъдат взети всички проби от материал, който е информирани за резултата от анализа да бъде извършен в две етапа.

Наказно съгласие, че:

- В някои случаи резултатът, който ще получи може да е с определен процент на вероятност.
- Наличните ДНК методи могат да се окажат информативни в много семейства.
- Ако роднинските връзки, които съм заявил/а не са верни, могат да се повлияят грешки в интерпретацията на резултата.
- Предишно поставена клинична диагноза ще доведе до недостоверна ДНК диагноза, за която лабораторията не носи отговорност.
- В някои случаи взетият материал за анализ може да се окаже недостигателен или некачествен и тогава се налага повторно вземане на материал.

Общи условия, че:

При извършване на поредна диагностика, акушерските подходи за вземане на материал за генетично изследване на фетуса са:

Хорионна биопсия – извършва се между 10 и 13 г.с., риска за аборт < 3%

Амниоцентеза – извършва се между 16 и 19 г.с., риск от аборт < 0.5%

ДНК анализът на материалите, които ще бъдат взети за изследване ДНК анализът ще бъде извършен в две етапа. Първо ще бъдат взети всички проби от материал, който е информирани за резултата от анализа. Второ ще бъдат взети всички проби от материал, който е информирани за резултата от анализа. Анализът ще бъде извършен в две етапа. Първо ще бъдат взети всички проби от материал, който е информирани за резултата от анализа. Второ ще бъдат взети всички проби от материал, който е информирани за резултата от анализа.

Даден съгласие от Лаборатория „Геника“ да оперира с личните ми данни във връзка с диагностичното изследване.

Подпис на пациента:

Ул. „Цар Асен“ 90, София, тел. 02 953 0715, 0897 912488