

## Κληρονομική Θρομβοφιλία Παράγοντες – Επιδημιολογία – Παθοφυσιολογία

Βασιλεία Γαρυπίδου, Σοφία Βακαλοπούλου

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Ο όρος θρομβοφιλία εισήχθη το 1965 από τον Egeberg, ο οποίος δημοσίευσε την πρώτη περίπτωση κληρονομικής ανεπάρκειας της αντιθρομβίνης σε οικογένεια με πολλαπλές φλεβικές θρομβώσεις. Τα τελευταία περίπου 30 χρόνια, έχουν ανακαλυφθεί και μελετηθεί αρκετές ανάλογες διαταραχές, μερικές πολύ συχνότερες στο γενικό πληθυσμό από την ιδιαίτερα σπάνια έλλειψη της αντιθρομβίνης, γεγονός που αύξησε εξαιρετικά το σχετικό ενδιαφέρον. Σήμερα ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αυξημένη τάση για φλεβική κυρίως θρομβοεμβολή, ως συνέπεια εργαστηριακής διαταραχής, τις περισσότερες φορές στο σύστημα της πήξης. Οι θρομβοφιλικές διαταραχές μπορεί να είναι κληρονομικές ή επίκτητες. Οι αιτίες κληρονομικής θρομβοφιλίας περιλαμβάνουν μια ομάδα απολύτως κληρονομούμενων διαταραχών, όπως οι ανεπάρκειες των φυσικών αντιπηκτικών (αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη C, πρωτεΐνη S) από ποικίλες γενετικές βλάβες, ο παράγοντας V Leiden και η μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης και μια δεύτερη με πολυπαραγοντικές και τουλάχιστον μερικώς κληρονομούμενες διαταραχές, όπως τα αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VIII και η ήπια υπερομοκυστεϊναιμία. Η συνολική επίπτωση της αυστηρά κληρονομικής θρομβοφιλίας είναι περίπου 10% στο γενικό πληθυσμό και 24% - 37% σε ασθενείς με φλεβική θρομβοεμβολή. Βασικοί παθογενετικοί μηχανισμοί της κληρονομικής θρομβοφιλικής διάθεσης είναι η ελάττωση των φυσικών αντιπηκτικών αφενός και η αυξημένη δραστηριότητα παραγόντων της πήξης αφετέρου. Η ανεπάρκεια των φυσικών αντιπηκτικών, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην αδρανοποίηση παραγόντων, αναστέλλοντας έτσι την πήξη, οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής θρομβίνης και σημαντική προδιάθεση για θρόμβωση. Η επίπτωση της ανεπάρκειας των φυσικών αντιπηκτικών είναι μικρή, 1% στο γενικό πληθυσμό και 7% σε ασθενείς με φλεβική θρόμβωση. Οι συχνότερες (και ηπιότερες) συγγενείς θρομβοφιλίες, ο παράγοντας V Leiden και η μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης (5-8% και 0,7-4% στους Ευρωπαίους αντίστοιχα) αυξάνουν τη δραστηριότητα παραγόντων της αιμόστασης και ανευρίσκονται περίπου στο 50% των περιπτώσεων θρομβοφιλίας στους Καυκασίους. Ο παράγοντας V Leiden είναι αποτέλεσμα της μετάλλαξης G1691A στο γονίδιο του παράγοντα V, που καθιστά ανθεκτική την ενεργοποιημένη μορφή του παράγοντα στην αδρανοποίηση της από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Η μετάλλαξη G20210A στη θέση 3' της μη μεταφρασμένης περιοχής του γονιδίου της προθρομβίνης προκαλεί την παραγωγή υψηλότερων επιπέδων προθρομβίνης που προδιαθέτουν στην παραγωγή περίσσειας θρομβίνης και θρόμβωση. Τα αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VIII (>150%) είναι μία συχνή διαταραχή (11% στο γενικό πληθυσμό) η οποία προδιαθέτει σε θρόμβωση, επίσης μέσω αυξημένης παραγωγής θρομβίνης και/ή επαγωγής επίκτητης αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Τέλος, η ήπια υπερομοκυστεϊναιμία (5% στο γενικό πληθυσμό), προκαλείται κυρίως από μία μετάλλαξη στο γονίδιο της μεθυλενοτετραϋδροφολικής αναγωγάσης, συχνά σε συνδυασμό με ανεπαρκή πρόσληψη φυλλικού οξέος και προκαλεί αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις με ποικίλους και σύνθετους μηχανισμούς. Παράλληλα με τις εργαστηριακές αυτές διαταραχές έχουν προσδιοριστεί πολλές παροδικές ή μόνιμες, παθολογικές και μη καταστάσεις που οδηγούν επίσης σε «θρομβωτική» διάθεση, όπως είναι η μεγάλη ηλικία, τα χειρουργεία, οι κακοήθειες, η ακινητοποίηση, η παχυσαρκία, η κύηση και η λοχεία, τα οιστρογόνα, κ.ά. Η κλινική θρομβοεμβολή είναι τελικά πολυπαραγοντική και συμβαίνει κατά κανόνα όταν πολλαπλοί παράγοντες κινδύνου, γενετικοί ή επίκτητοι και περιβαλλοντικοί συνυπάρχουν ταυτόχρονα.

Haema 2014; 5(1): 1-13 Copyright EAE

## Εισαγωγή

Στα μέσα του 19ου αιώνα ο Virchow πρότεινε για την ερμηνεία της παθογένεσης των θρομβωτικών διαταραχών την κλασική πλέον τριάδα που περιλαμβάνει: στάση στην κυκλοφορία, βλάβη του αγγείου και υπερπηκτική κατάσταση.<sup>1</sup> Ο ρόλος της στάσης και της αγγειακής βλάβης στην παθογένεια της θρόμβωσης μελετήθηκαν εξονυχιστικά στα επόμενα 100 χρόνια και οδήγησαν στην καθιέρωση αποτελεσματικών θεραπειών για τις καταστάσεις αυτές. Πολύ πιο πρόσφατα, η καλύτερη κατανόηση του καταρράκτη της πήξης, σε συνδυασμό με την πρόοδο της μοριακής διερεύνησης, κατάφερε να αποσαφηνίσει πολλές από τις «υπερπηκτικές καταστάσεις» του Virchow, ιδιαίτερα τις κληρονομούμενες διαταραχές που συνδυάζονται με τη θρόμβωση. Ο όρος θρομβοφιλία, που χρησιμοποιείται σήμερα γι' αυτές τις διαταραχές, εισήχθη το 1965 από τον Egeber, όταν δημοσίευσε τη μελέτη μιας Νορβηγικής οικογένειας με σημαντική επίπτωση φλεβικής θρόμβωσης μεταξύ των μελών της από την έλλειψη ενός φυσικού αντιπηκτικού, της αντιθρομβίνης.<sup>2</sup> Τα τελευταία περίπου 30 χρόνια, έχουν περιγραφεί και μελετηθεί αρκετές ακόμη θρομβοφιλικές διαταραχές, μερικές πολύ συχνότερες στο γενικό πληθυσμό από την ιδιαίτερα σπάνια έλλειψη της αντιθρομβίνης. Το ενδιαφέρον αυξήθηκε εξαιρετικά και οι σχετικές δημοσιεύσεις ανέρχονται ήδη σε μερικές δεκάδες χιλιάδες. Παράλληλα, έχουν προσδιοριστεί πολλές παροδικές ή μόνιμες καταστάσεις που οδηγούν σε «θρομβωτική» διάθεση, όπως είναι η μεγάλη ηλικία, τα χειρουργεία, οι κακοήθειες, η ακινητοποίηση, η παχυσαρκία, η κύηση και η λοχεία, η χρήση σκευασμάτων που περιέχουν οιστρογόνα (αντισυλληπτικά ή σκευάσματα ορμονικής υποκατάστασης), κ.α. Σήμερα ο όρος θρομβοφιλία χρησιμοποιείται γενικά, για να περιγράψει την αυξημένη τάση για φλεβική θρομβοεμβολή ως συνέπεια εργαστηριακής διαταραχής, τις περισσότερες φορές στο σύστημα της πήξης. Οι θρομβοφιλικές διαταραχές μπορεί να είναι κληρονομικές ή επίκτητες και είναι προφανές, από μελέτες σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη φλεβική θρομβοεμβολή, ότι δεν έχουν ακόμη προσδιορισθεί στο σύνολό τους και σε ένα σημαντικό ποσοστό παραμένουν άγνωστες.

Ο ίδιος όρος, θρομβοφιλία, χρησιμοποιείται επίσης

συχνά για ασθενείς που εμφανίζουν ασυνήθεις εκδηλώσεις της φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου (venous thromboembolism, VTE), όπως π.χ. επανειλημμένα αυτόματα επεισόδια, θρόμβωση σε νεαρή ηλικία με βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό ή θρόμβωση σε ασυνήθεις περιοχές. Παρότι όντως πολύ συχνά αναγνωρίζονται εργαστηριακές θρομβοφιλικές διαταραχές σε τέτοιες καταστάσεις, σήμερα γνωρίζουμε καλά ότι οι εργαστηριακές θρομβοφιλικές διαταραχές αυξάνουν τον κίνδυνο οποιουδήποτε επεισοδίου VTE (και σπανιότερα επεισοδίων και αρτηριακής θρόμβωσης). Είναι επίσης γεγονός ότι η βαρύτητα αυτών των διαταραχών ποικίλλει ευρέως και ότι τα περισσότερα άτομα έχουν ήπια θρομβοφιλική διάθεση και δεν θα εμφανίσουν ποτέ θρομβωτικό επεισόδιο. Περίπου το 50% των ασθενών με κληρονομική θρομβοφιλία θα παρουσιάσει την πρώτη εκδήλωση VTE σε σχέση με κάποιον επιπρόσθετο παράγοντα κινδύνου για θρόμβωση και η πλειονότητα θα εμφανίσει το πρώτο επεισόδιο όχι σε ιδιαίτερα νεαρή ηλικία. Προφανώς, οι ασθενείς με συγγενή θρομβοφιλία βρίσκονται σε μια μόνιμη προθρομβωτική κατάσταση, η οποία όμως από μόνη της δεν επαρκεί συνήθως για να προκαλέσει θρόμβωση. Το θρομβωτικό επεισόδιο θα προκληθεί όταν τα άτομα αυτά αναπτύξουν έναν ή και περισσότερους επιπρόσθετους παράγοντες κινδύνου για θρόμβωση, περιλαμβανομένης και της αυξανόμενης ηλικίας.<sup>3</sup> Η κλινική θρομβοεμβολή είναι πολυπαραγοντική και συμβαίνει κατά κανόνα όταν πολλαπλοί παράγοντες κινδύνου, γενετικοί και περιβαλλοντικοί συνυπάρχουν ταυτόχρονα.

## Αίτια κληρονομικής θρομβοφιλίας

Οι αιτίες κληρονομικής θρομβοφιλίας περιλαμβάνουν μία ομάδα αυστηρά κληρονομούμενων διαταραχών από ποικίλες γενετικές βλάβες, όπως οι σταθερές ανεπάρκειες των φυσικών αντιπηκτικών (αντιθρομβίνης, πρωτεΐνης C και πρωτεΐνης S), ο παράγοντας V Leiden, η μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης και μία δεύτερη ομάδα με πολυπαραγοντικές και τουλάχιστον εν μέρει κληρονομούμενες διαταραχές, όπως τα αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VIII (FVIII) και η υπερομοκυστεϊναιμία (Πίνακας 1).<sup>4</sup> Να σημειωθεί ότι παροδικές ελλείψεις τόσο

**Πίνακας 1. Αιτίες Κληρονομικής Θρομβοφιλίας**

Αυστηρά κληρονομούμενες	Πολυπαραγοντικές (και τουλάχιστον μερικώς κληρονομούμενες)
Ανεπάρκεια αντιθρομβίνης	Αυξημένα επίπεδα του FVIII
Ανεπάρκεια πρωτεΐνης C	Ήπια υπερομοκυστεϊναιμία
Ανεπάρκεια πρωτεΐνης S	
Παράγοντας V Leiden	
Μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης	

των φυσικών αντιπηκτικών, όπως και διακυμάνσεις των επιπέδων του FVIII και της ομοκυστεΐνης, ως επίκτητες διαταραχές, έχουμε σε διάφορες καταστάσεις παθολογικές ή μη, που θα περιγραφούν σε ιδιαίτερο κεφάλαιο στη συνέχεια.

Με βάση τους μηχανισμούς της θρομβοφιλικής διάθεσης οι καταστάσεις αυτές μπορούν να διακριθούν σε δύο υποκατηγορίες. Στην πρώτη, η θρομβοφιλία προκύπτει από ελαττωμένα επίπεδα φυσικών ανασταλτών της αιμόστασης και στη δεύτερη από αυξημένη δραστηριότητα παραγόντων της πήξης. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς της πρώτης κατηγορίας, της έλλειψης δηλαδή φυσικών αντιπηκτικών όπως η αντιθρομβίνης, η πρωτεΐνης C και η πρωτεΐνης S, μπορεί να εμφανίσουν το πρώτο επεισόδιο πριν από την ηλικία των 60 και σε αντίθεση με τους αιμορροφιλικούς, που για να αποκτήσουν αιμορραγική διάθεση απαιτείται σημαντική ελάττωση των επιπέδων των παραγόντων της αιμόστασης, μικρές ή μέτριες μειώσεις των αντιπηκτικών αυτών πρωτεϊνών, είναι αρκετές για να οδηγήσουν σε θρομβωτική διάθεση. Στη δεύτερη ομάδα, με την αύξηση των δραστικών πρωτεϊνών της πήξης (παράγοντας V Leiden, μετάλλαξη στη ρυθμιστική αλληλουχία της προθρομβίνης, αυξημένα επίπεδα παραγόντων πήξης), η θρομβωτική διάθεση είναι ηπιότερη και τα περισσότερα άτομα δεν εμφανίζουν θρόμβωση πριν την ηλικία των 60.<sup>5</sup> Γενικά οι διαταραχές της πρώτης ομάδας συνεπάγονται υψηλότερο κίνδυνο θρόμβωσης αλλά είναι πολύ σπανιότερες σε σχέση με τις διαταραχές της δεύτερης ομάδας που είναι συχνές αλλά ηπιότερες θρομβοφιλικές διαταραχές.<sup>6</sup>

## Οι κληρονομικοί θρομβοφιλικό παράγοντες

### 1. Ελάττωση των φυσικών αντιπηκτικών

Η αντιθρομβίνη (AT), η πρωτεΐνη C (PC) και η πρωτεΐνη S (PS) λειτουργούν ως φυσικοί ανασταλτές του καταρράκτη της πήξης, φυσικά αντιπηκτικά, και κληρονομούνται με τον αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα. Ανεπάρκεια αυτών των παραγόντων οδηγεί σε διαταραχή της ισορροπίας στην αιμόσταση υπέρ μιας προθρομβωτικής κατάστασης, όπως επιβεβαιώνεται από μελέτες που δείχνουν αυξημένους δείκτες παραγωγής θρομβίνης σε ασθενείς με αυτές τις διαταραχές.

Φυσιολογικά η AT συνδέει και απενεργοποιεί την θρομβίνη (FIIa) και τους ενεργοποιημένους παράγοντες FXa, FIXa, FXIa, και FXIIa, δράση που ενισχύεται περίπου 1000 φορές από την ηπαρίνη. Η έλλειψή της θεωρείται ιδιαίτερα ισχυρή θρομβοφιλική διαταραχή.<sup>7</sup>

Η πρωτεΐνη C ενεργοποιείται φυσιολογικά από το σύμπλεγμα της ήδη παραγόμενης θρομβίνης με τη θρομ-

βομοντουλίνη και ως ενεργοποιημένη μορφή (activated protein C, APC) αδρανοποιεί τους FVa και FVIIIa, παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη διαδικασία της πήξης. Στην αντίδραση απαιτείται ως συμπάροντας η πρωτεΐνη S. Απουσία ή ελάττωση οποιουδήποτε από τους ανασταλτικούς αυτούς μηχανισμούς ευνοεί την παραγωγή θρομβίνης και ινικής και αυξάνει τη θρομβωτική διάθεση. Αρκετά μετά την ανακάλυψη του Egeberg, η πρώτη περιγραφή της έλλειψης της PC σε σχέση με τη φλεβική θρόμβωση έγινε το 1981<sup>8</sup> και της έλλειψης της PS το 1984.<sup>9</sup> Ποικίλες γενετικές διαταραχές μπορεί να οδηγήσουν σε ποσοτικές ή τύπου I και λειτουργικές ή τύπου II (και τύπου III για την PS) ανεπάρκειες των φυσικών αντιπηκτικών.<sup>10,11</sup>

### 2. Παράγοντας V Leiden

Προκύπτει από σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο του FV της πήξης (G1691A), όπου αντικατάσταση της αργινίνης από γλουταμίνη σε ένα από τα σημεία στο μόριο του FV, στα οποία η ενεργοποιημένη PC (activated protein C, APC) διασπά και αδρανοποιεί τον FVa, καθιστά τον FV ανθεκτικό στη δράση της. Η αντίσταση στην APC (activated protein C resistance, APCR) περιγράφηκε ως βασική διαταραχή για πρώτη φορά από τους Dahlback και Hildebrand το 1994.<sup>12</sup> Διάφορες ομάδες ερευνητών κατέδειξαν στη συνέχεια ότι το 90% περίπου των περιπτώσεων με APCR οφείλεται στην παρουσία ενός αλληλίου του FV που είναι ανθεκτικό στην πρωτεολυτική δράση της PC. Το αλληλίο αυτό ονομάστηκε FV Leiden.

### 3. Μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης

Η επίσης σημειακή μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης περιγράφηκε το 1996 από τους Poort και συνεργάτες.<sup>13</sup> Προκύπτει από αλλαγή γουανίνης σε αδερίνη στο νουκλεοτίδιο 20210 στην περιοχή 3' του γονιδίου της προθρομβίνης και οδηγεί σε ένα λειτουργικό πολυμορφισμό με αυξημένα κατά ~30% τα επίπεδα της φυσιολογικής προθρομβίνης στους ετεροζυγώτες, με αποτέλεσμα προθρομβωτικό φαινότυπο.<sup>13</sup>

### 4. Αυξημένα επίπεδα του πήκτικού παράγοντα VIII (FVIII: C)

Τα αυξημένα επίπεδα του FVIII θεωρούνται σήμερα ως ανεξάρτητος δείκτης κινδύνου για φλεβική αλλά και για αρτηριακή θρόμβωση.<sup>14,15</sup> Ο μηχανισμός είναι εν πολλοίς άγνωστος, αλλά η μονιμότητα της διαταραχής και η επίπτωση σε οικογένειες υποδεικνύει τουλάχιστον εν μέρει γενετική αιτιολογία.<sup>15</sup>

## 5. Υπερομοκυστεϊναιμία

Η ομοκυστεϊνή είναι ένα αμινοξύ που σχηματίζεται κατά τη μετατροπή της μεθειονίνης σε κυστεϊνή. Σε αντίθεση με την εξαιρετικά σπάνια και βαριά ομοκυστινουρία με τα εξαιρετικά υψηλά επίπεδα ομοκυστεϊνης στο πλάσμα, μικρότερες αυξήσεις της ομοκυστεϊνης του πλάσματος είναι πολύ συχνότερες και έχουν επίσης συσχετιστεί τόσο με αθηροσκληρωτική αγγειακή νόσο όσο και με VTE.<sup>16</sup> Η υπερομοκυστεϊναιμία μπορεί να είναι κληρονομική ή επίκτητη. Η κληρονομική οφείλεται σε γενετικές βλάβες ενζύμων του μεταβολισμού της, συνήθως μεταλλάξεις στο γονίδιο MTHFR (μεθυλενοτετραϋδροφολικής αναγωγάσης) και σπανιότερα της CBS (cystathione B-synthase). Η ομοζυγωτική για τη μετάλλαξη C677T του MTHFR κατάσταση προκαλεί αύξηση περίπου κατά 25% στα επίπεδα της ομοκυστεϊνης νηστείας, συνήθως σε συνδυασμό με έλλειψη φυλλικού οξέος και θεωρείται κληρονομικός παράγοντας κινδύνου για θρόμβωση. Στην πραγματικότητα είναι σαφής η συσχέτιση της υπερομοκυστεϊναιμίας με τη θρόμβωση, ενώ η συσχέτιση της θρόμβωσης με αυτή καθεαυτή τη μετάλλαξη του MTHFR είναι αμφισβητούμενη.<sup>17</sup>

Η επίκτητη υπερομοκυστεϊναιμία συνδυάζεται με διατροφικές ελλείψεις βιταμινών που λειτουργούν ως συμπαραγόντες στο μεταβολισμό της, με ορισμένες χρόνιες παθολογικές καταστάσεις και με φάρμακα.

## Επιδημιολογικά στοιχεία

Η συνολική επίπτωση της απόλυτα κληρονομικής θρομβοφιλίας υπολογίζεται περίπου στο 10% στο γενικό πληθυσμό και στο 24-37% σε ασθενείς με φλεβι-

κή θρόμβωση. Οι συχνότερες (και ηπιότερες) συγγενείς θρομβοφιλίες, FV Leiden και μετάλλαξη FIIIG20210A, ανευρίσκονται περίπου στο 50% των περιπτώσεων θρομβοφιλίας στους Καυκάσιους. Ελλείψεις των PC, PS και AT είναι υπεύθυνες για τις περισσότερες από τις υπόλοιπες, ενώ εξαιρετικά σπάνιες είναι οι λειτουργικές διαταραχές του ινωδογόνου, οι δυσινωδογοναιμίες.<sup>18-20</sup> Στον πίνακα 2 φαίνονται η επίπτωση των συγγενών διαταραχών θρομβοφιλίας στο γενικό πληθυσμό και στους ασθενείς με VTE, καθώς και το μέγεθος του θρομβωτικού κινδύνου για κάθε μία.<sup>4,20</sup>

## 1. Ανεπάρκεια φυσικών αντιπηκτικών

Η ανεπάρκεια της αντιθρομβίνης στο γενικό πληθυσμό υπολογίστηκε αρχικά, με τη χρήση ανοσολογικών μεθόδων για τη μέτρηση των επιπέδων της στο πλάσμα, στο 1/2000-1/5000.<sup>34</sup> Με λειτουργικές μεθόδους όμως, που μετρούν τη δραστηριότητα της AT ως συμπαραγόντα της ηπαρίνης, φτάνει ως το 1/500.<sup>23</sup> Υψηλός κίνδυνος για VTE χαρακτηρίζει τον τύπο I της ανεπάρκειας της AT και την τύπου II με διαταραχές στο σημείο σύνδεσης με τη θρομβίνη, πάντα στους ετεροζυγώτες. Ομοζυγωτία για τις μορφές αυτές της έλλειψης AT δεν έχει περιγραφεί και είναι προφανώς ασύμβατη με τη ζωή. Πολύ σπανιότερα είναι τα θρομβωτικά επεισόδια στους συχνότερους ετεροζυγώτες διαταραχών στο σημείο σύνδεσης της ηπαρίνης, ενώ αντίθετα βαριά θρομβωτική νόσο έχουν οι εξαιρετικά σπάνιοι ομοζυγώτες για βλάβη στο σημείο αυτό.<sup>35,36</sup>

Τα θρομβωτικά επεισόδια είναι σπάνια πριν την εφηβεία, εμφανίζονται συνήθως μεταξύ 15-35 ετών και είναι πολλαπλά και επαναλαμβανόμενα στο 60% των ατόμων

**Πίνακας 2. Επίπτωση και κλινική σημασία της κληρονομικής θρομβοφιλίας.**

	% στον Γενικό Πληθυσμό (Βιβλιογραφία)	% σε Ασθενείς με VTE (Βιβλιογραφία)	Υπολογιζόμενος θρομβωτικός κίνδυνος
Ανεπάρκεια AT, PC, PS συνολικά	≤1 (21, 22, 23)	7-13 (21, 24, 29)	
Ανεπάρκεια AT	0,02-0,2 (20, 23, 34)	1-3	10-20X
Ανεπάρκεια PC	0,2-0,4 (20)	3-5	10X
Ανεπάρκεια PS	0,3-0,13 (41)	1-5	10X
Παράγοντας V Leiden	Καυκάσιοι: 4-7 (25, 26) Μη-Καυκάσιοι: 0-1	10-50 (27, 28)	5X
Μετάλλαξη προθρομβίνης G20210A	Καυκάσιοι: 2-3 (29, 30) Μη-Καυκάσιοι: 0-1	6-18 (31, 32)	3X
Αυξημένα επίπεδα FVIII	11 (14)	25 (14)	5X
Ήπια υπερομοκυστεϊναιμία	5 (33)	10 (33)	3X
Δυσινωδογοναιμία	<1 (20)	<1	

με έλλειψη ΑΤ.<sup>37</sup> Περίπου το 55% των ατόμων με έλλειψη ΑΤ και οικογενειακό ιστορικό VTE, εμφανίζει επεισόδιο φλεβικής θρόμβωσης πριν την ηλικία των 50.<sup>38</sup> Στη μελέτη των Thaler και Lechner στο 42% των ατόμων με ανεπάρκεια ΑΤ τα επεισόδια ήταν αυτόματα, ενώ οι υπόλοιποι εμφάνισαν θρόμβωση σε συνδυασμό με επιπρόσθετους παράγοντες κινδύνου, όπως εγκυμοσύνη, αντισυλληπτικά, χειρουργείο, τραυματισμό κ.α.<sup>37</sup>

Γενικά, ο θρομβωτικός κίνδυνος για τις κληρονομικές διαταραχές θρομβοφιλίας μπορεί να εκτιμηθεί είτε σε ασθενείς με VTE είτε σε οικογένειες με θρομβοφιλία. Ανεπάρκεια σε κάποιο από τα φυσικά αντιπηκτικά βρίσκεται σε περίπου 10% των ασθενών με VTE.<sup>21</sup> Σε ισπανική μελέτη σε 2132 ασθενείς με VTE το 12,9% είχε ελάττωση αντιπηκτικής πρωτεΐνης (7,3% της PS, 3,2% της PC και 0,5% της ΑΤ).<sup>29</sup> Ανάλογα σε 277 Ολλανδούς ασθενείς με VTE το 8,3% είχε έλλειψη ΑΤ, PC ή PS έναντι 2,2% των μαρτύρων.<sup>24</sup> Από μελέτη 150 θρομβοφιλικών οικογενειών η πιθανότητα για να εμφανίσει θρόμβωση μέλος με διαταραχή σε σύγκριση με άτομα των ίδιων οικογενειών χωρίς τη διαταραχή βρέθηκε μεγαλύτερη 8,5 φορές για την ελάττωση της πρωτεΐνης S, 8,1 φορές για την ελάττωση της ΑΤ, 7,3 φορές για την ελάττωση της PC και 2,2 φορές για τον FV Leiden.<sup>18</sup>

### Ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C

Η συχνότητά της υπολογίζεται στο 1/200-1/500<sup>21,22</sup> στο γενικό πληθυσμό με μεγάλη φαινοτυπική διαφοροποίηση. Υπολογίζεται, ότι το 2-5% των ασθενών με VTE έχει ελαττωμένη PC.<sup>18,24</sup> Από τη «LEIDEN Thrombophilia Study» η πιθανότητα για πρώτο επεισόδιο VTE σε άτομα με ελαττωμένη PC είναι 7πλάσια σε σύγκριση με άτομα χωρίς θρομβοφιλία.<sup>39</sup>

Μεταξύ των οικογενειών με ελαττωμένη PC παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στη συχνότητα θρομβωτικών επεισοδίων (75% των μελών σε μία μελέτη, πολύ λιγότερα σε άλλες), γεγονός που ενδεχομένως ερμηνεύεται από την παρουσία και δεύτερου γνωστού ή αγνώστου θρομβοφιλικού παράγοντα, συχνότερα του FV Leiden.<sup>40</sup> Όπως προκύπτει από μία ανασκόπηση τεσσάρων μεγάλων σχετικών μελετών, το 75% των μελών θρομβοφιλικών οικογενειών που έχουν δύο θρομβοφιλικές διαταραχές εμφανίζει θρόμβωση, ενώ μόνο το 10-30% με μία μόνο διαταραχή.<sup>40</sup>

### Ανεπάρκεια πρωτεΐνης S

Σε μεγάλη μελέτη υγιών δοτών από τη Σκωτία η επίπτωση ελαττωμένης PS υπολογίστηκε στο 0,03-0,13%.<sup>41</sup> Από μελέτες της PS σε οικογένειες με μεγάλη συχνότητα θρομβωτικών επιπλοκών η πιθανότητα για τα προσβεβλημένα μέλη να μην εμφανίσουν θρόμβωση μέχρι τα 45 έτη, βρέθηκε να είναι 35-50%.<sup>42</sup>

Να σημειωθεί ότι για την PS η μέτρηση της ολικής

πρωτεΐνης υποεκτιμά των κίνδυνο θρόμβωσης και είναι προτιμότερη η μέτρηση της ελεύθερης PS. Επίπεδα ελεύθερης PS <33-41 IU/dl προδικάζουν αυξημένη πιθανότητα για θρόμβωση σε θρομβοφιλικές οικογένειες, σε σχέση με άτομα με υψηλότερες τιμές.<sup>43</sup> Άτομα με χαμηλή PS, που δεν προέρχονται από θρομβοφιλικές οικογένειες, φαίνεται ότι έχουν ελάχιστη ή και καθόλου τάση για VTE, όπως προκύπτει από τη μελέτη «MEGA» (Multiple Environmental & Genetic Assessment of Risk Factors for Venous Thrombosis). Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη μόνο τιμές PS κάτω από τις 33 IU/dl έχουν αυξημένο, αν και όχι στατιστικώς σημαντικό κίνδυνο θρόμβωσης. Ίδια επίπεδα ολικής PS ουδόλως συσχετίζονται με θρομβωτικό κίνδυνο.<sup>44</sup>

Όπως και για την PC, σε οικογένειες με χαμηλή PS και θρομβώσεις, μια δεύτερη θρομβοφιλική διαταραχή και ιδιαίτερα ο FV Leiden συνυπάρχει συχνά.<sup>40</sup>

## 2. Παράγοντας V Leiden

Ο FV Leiden είναι η συχνότερη αιτία συγγενούς θρομβοφιλικής διαταραχής στους Καυκάσιους (40-50% των περιπτώσεων). Είναι επίσης η συχνότερη αιτία κληρονομικής APCR, >95% όταν ελέγχεται με λειτουργικές δοκιμασίες δεύτερης γενεάς. Η ετεροζυγωτία για τον FV Leiden κυμαίνεται στο 1-8,5% στην Καυκασία φυλή (Ευρωπαίοι, Εβραίοι, Ισραηλίτες, Άραβες, Καναδοί και Ινδοί), με τους περισσότερους Ευρωπαίους στο 5-8%.<sup>25,45</sup> Στην «Physicians Health Study» και τη «Women's Health Study» βρέθηκαν οι ακόλουθες συχνότητες ετεροζυγωτίας FV Leiden: Καυκάσιοι 5,3%, Αμερικανοί Ισπανικής καταγωγής 2,2%, Ιθαγενείς Αμερικανοί 1,2%, Αφροαμερικανοί 1,2%, Αμερικανοί Ασιατικής καταγωγής 0,45%.<sup>23</sup> Σε ορισμένες μελέτες από Ελλάδα, Σουηδία και Λίβανο βρέθηκαν ποσοστά έως 15% του FV Leiden στο γενικό πληθυσμό.<sup>26,46</sup> Η μετάλλαξη φαίνεται να είναι μηδενική στους μαύρους της Αφρικής, στους Κινέζους και στους Ιάπωνες. Φορείς της μετάλλαξης FV Leiden είναι περίπου το 10-26% των ασθενών με VTE.<sup>26,27</sup> Στις διάφορες μελέτες η ετεροζυγωτία για τη μετάλλαξη αυξάνει τον κίνδυνο για θρόμβωση έως επτά φορές, ενώ η ομοζυγωτία έως 80 φορές.<sup>47</sup> Ομοζυγωτία για τον FV Leiden παρατηρείται στο 1% των ατόμων με τη μετάλλαξη, αλλά εκπροσωπείται πολύ συχνότερα κλινικά, λόγω του ιδιαίτερα αυξημένου θρομβωτικού κινδύνου.

Ο κλινικός φαινότυπος ποικίλει επηρεαζόμενος από διάφορους τροποποιητές, όπως π.χ. συνύπαρξη ετεροζυγωτίας για ελαττωμένη παραγωγή του φυσιολογικού αλληλίου του FV ή ο πολυμορφισμός του HR2 απλοτύπου στο γονίδιο του FV, αυξημένα επίπεδα του FVIII όπως συμβαίνει στην ομάδα O, μεταβολές στο γονίδιο της PZ και ασφαλώς από τη συνύπαρξη και άλλων γνωστών ή αγνώστων, κληρονομικών ή επίκτητων θρομβοφιλικών

καταστάσεων.<sup>48-50</sup> Έτσι μόνο το 5% των ασθενών με ετεροζυγωτία FV Leiden θα εμφανίσει θρόμβωση στη διάρκεια της ζωής τους. Σε ανάλυση 8 case-control μελετών ο θρομβωτικός κίνδυνος για VTE, εκφραζόμενος σε odds ratio (OR) βρέθηκε 4,9 για ετεροζυγώτες FV Leiden, 3,8 για ετεροζυγώτες FIIIG20210A και 20 για διπλούς ετεροζυγώτες (FV Leiden και μετάλλαξη FII).<sup>51</sup>

### 3. Μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης

Η επίπτωση στο γενικό πληθυσμό εμφανίζεται ευρεία διακύμανση από 0,7-6,5%. Στην Ευρώπη κυμαίνεται από 0,7-4%, με διπλάσια ποσοστά στη νότια σε σχέση με τη βόρεια Ευρώπη (3 έναντι 1,7%) και με τα μεγαλύτερα ποσοστά σε μελέτες από την Ισπανία.<sup>30</sup> Όπως και ο παράγον FV Leiden παρατηρείται εξαιρετικά σπάνια σε μαύρους και Ασιάτες. Φαίνεται, ότι η μετάλλαξη επήλθε μετά την απομάκρυνση των φυλών από την Αφρική και την απόσχιση των Καυκασίων από τους μογγολικής προέλευσης πληθυσμούς.

Ο κίνδυνος θρόμβωσης βρέθηκε αυξημένος στους ετεροζυγώτες κατά 2,8 φορές και είναι σαφώς υψηλότερος, αν και άγνωστος επακριβώς, για τους ομοζυγώτες. Σύμφωνα με την «LEIDEN Thrombophilia Study» η διαταραχή βρέθηκε στο 6,2% των ασθενών με VTE έναντι 2,3 των υγιών.<sup>39</sup> Στους συμπτωματικούς ασθενείς η συνύπαρξη με άλλο θρομβοφιλικό κληρονομικό παράγοντα και ιδιαίτερα τον FV Leiden, φαίνεται να είναι υψηλή (όπως άλλωστε συμβαίνει και για τις ανεπάρκειες PC και PS).<sup>52</sup> Διπλοί ετεροζυγώτες, FV Leiden και FIIIG20210A, φαίνεται να έχουν κατά 3-5 φορές αυξημένο κίνδυνο VTE σε σχέση με τα άτομα με μία διαταραχή.<sup>51</sup>

### 4. Αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VIII

Τα ποσοστά στο γενικό πληθυσμό είναι υψηλά, υπολογίστηκαν στο 11-17% στη Leiden Thrombophilia Study και υπάρχουν αρκετά πλέον δεδομένα που υποστηρίζουν σημαντική, ανεξάρτητη και δόσοεξαρτώμενη θρομβοφιλική διάθεση.<sup>14,53</sup> Από πληθυσμιακή ολλανδική μελέτη βρέθηκε, ότι ασθενείς με επίπεδα παράγοντα FVIII:C >150% του φυσιολογικού είχαν OR 4,8 για πρώτο επεισόδιο φλεβικής θρόμβωσης συγκρινόμενοι με άτομα των οποίων τα επίπεδα του FVIII:C είναι <100%.<sup>14</sup> Τόσο στη μελέτη αυτή όσο και σε μία αγγλική σειρά ασθενών με ιδιοπαθή θρόμβωση η επίπτωση των αυξημένων επιπέδων του FVIII:C ήταν περίπου 25%.<sup>54</sup> Τα αυξημένα επίπεδα του FVIII είναι παράγοντας κινδύνου για θρόμβωση και στη μαύρη φυλή. Σε μελέτη ασθενών με VTE και καταγωγή από Αφρική ή Καραϊβική, μόνο 9% είχαν έλλειψη φυσικού αντιπηκτικού, ενώ το 34% είχε επίπεδα του FVIII:C πάνω από την εννεηκοστή εκατοστιαία θέση των φυσιολογικών μαύρων μαρτύρων (OR 4,6).<sup>55</sup> Ασυμπτωματικά

άτομα με υψηλά επίπεδα FVIII:C και θετικό οικογενειακό ιστορικό VTE ή αρτηριακής θρόμβωσης πριν από την ηλικία των 50, βρέθηκε ότι έχουν υψηλή ετήσια συχνότητα VTE ή αρτηριακής θρόμβωσης.<sup>56</sup>

### 5. Υπερομοκυστεϊναιμία

Ήπιες ή μέτριες αυξήσεις της ομοκυστεϊνης του πλάσματος (16-100 μmol/L) βρίσκονται στο 5-7% του γενικού πληθυσμού.<sup>57</sup> Πέρα από τις συσχετίσεις με καρδιαγγειακή νόσο και εγκεφαλικά επεισόδια, μετα-αναλύσεις από case-control μελέτες βρήκαν ένα OR 2,5-2,95 για VTE σε ασθενείς με επίπεδα ομοκυστεϊνης που ξεπερνούν κατά δύο σταθερές αποκλίσεις τη μέση τιμή της ομάδας των μαρτύρων.<sup>16,58</sup>

Η ήπια υπερομοκυστεϊναιμία αποτελεί ενδεχομένως παράγοντα κινδύνου και για την υποτροπή της φλεβικής θρόμβωσης,<sup>59</sup> ενώ ο συνδυασμός της με άλλη κληρονομική θρομβοφιλία βρέθηκε να αυξάνει τον κίνδυνο θρόμβωσης στο 10-50πλάσιο σε κάποιες μελέτες, γεγονός που δεν επαληθεύεται όμως σε άλλες.<sup>60-62</sup>

### Παθολογική φυσιολογία

#### 1. Ανεπάρκεια αντιθρομβίνης

Η AT είναι πρωτεΐνη 58kDa και ανήκει στην οικογένεια των σερπινών. Στο μόριο της AT διακρίνονται δύο λειτουργικές θέσεις: η θέση σύνδεσης της ηπαρίνης (Heparin Binding Site -HBS-) στο αμινοτελικό άκρο και την αγκύλη του αντιδραστικού κέντρου (Reactive Center Loop -RCL-) στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου της. Είναι κύριος αναστολέας της θρομβίνης αλλά και των παραγόντων Xa, IXa, XIa, XIIa, καλρικρεΐνη και πλασμίνη. Ανταγωνίζεται επίσης τον FVIIa στη σύνδεσή του με τον ιστικό παράγοντα (TF). Στη θέση RCL εντοπίζεται μια αλληλουχία αμινοξέων (Gly392 - Arg393 - Ser394) συμπληρωματική των αμινοξέων των θέσεων σύνδεσης των ενεργοποιημένων παραγόντων - στόχων της AT. Η δραστηριότητα της AT αυξάνει σημαντικά παρουσία της ηπαρίνης. Η πεντεσακχαριδική αλληλουχία αμινοξέων της ηπαρίνης συνδέεται με τη HBS στο μόριο της AT και προκαλεί δομικές μεταβολές του μορίου της AT, αυξάνοντας έτσι τη συγγένεια μεταξύ της AT και της θρομβίνης ή των άλλων πρωτεασών - στόχων.

Οι ασθενείς με ανεπάρκεια AT παρουσιάζουν παρατεταμένη παραμονή στην κυκλοφορία της θρομβίνης και άλλων ενεργοποιημένων παραγόντων πήξης, οι οποίοι αυξάνουν τον κίνδυνο θρόμβωσης.

Υπάρχουν δύο τύποι ανεπάρκειας της AT. Στον τύπο I, οι μεταλλάξεις στο ένα αλληλίο συνεπάγονται την πλήρη απώλεια του μεταλλαγμένου μορίου AT και οδηγεί σε μείωση στο 50% των αντιγονικών και λειτουργι-



κών επιπέδων της φυσιολογικής ΑΤ.

Μείωση των επιπέδων ΑΤ στο 50% θεωρείται αρκετή να προκαλέσει θρόμβωση και οι ετεροζυγώτες εμφανίζουν διαφόρου βαθμού θρομβοφιλική διάθεση ενώ οι ομοζυγώτες της τύπου Ι ανεπάρκειας της ΑΤ αποθνήσκουν ενδομητρίως.

Στον τύπο ΙΙ τα αντιγονικά επίπεδα της παραγόμενης ΑΤ είναι φυσιολογικά ή σχεδόν φυσιολογικά αλλά το μόριο είναι δυσλειτουργικό. Ο τύπος ΙΙ υποδιαιρείται στους τύπους: ΠΙRS (λειτουργικές διαταραχές οι οποίες αφορούν το RCL και τη σύνδεση της ΑΤ με τις πρωτεάσες - στόχους), ΠΗBS (λειτουργικές διαταραχές οι οποίες αφορούν το ΗBS και τη δραστηριότητα της ΑΤ μόνο παρουσία ηπαρίνης) και ΠΠΕ (διαταραχές οι οποίες προκαλούν πλειοτροπική επίδραση δηλαδή λειτουργικές διαταραχές οι οποίες αφορούν το RCL ή το ΗBS και συνοδεύονται από χαμηλά επίπεδα ΑΤ λόγω μειωμένης σύνθεσης, έκκρισης ή αυξημένου καταβολισμού του μορίου της ΑΤ). Ο τύπος ΠΗBS συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο θρόμβωσης.<sup>63,64</sup>

Το γονίδιο της ΑΤ βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 (1q23-25). Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί περισσότερες από 130 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου της ΑΤ. Η ανεπάρκεια τύπου Ι προκαλείται κυρίως από μικρές (1 – 30bp) ελλείψεις ή προσθήκες (1bp) στο γονίδιο της ΑΤ ή σημειακές μεταλλάξεις και σπανιότερα μεγάλες γονιδιακές ελλείψεις, οι οποίες οδηγούν σε μετατόπιση αναγνωστικού πλαισίου (frameshift) ή πρόωρο τερματισμό του γονιδίου της ΑΤ ή κωδικόνιο τερματισμού (stopcodon), ή μεταβολές στη μετάφραση του mRNA, με αποτέλεσμα την παραγωγή ασταθούς μορίου ΑΤ, το οποίο είτε δεν εκκρίνεται είτε έχει μικρή διάρκεια ζωής. Οι ελλείψεις εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στα κωδικόνια 244/245, 81 και 106/107. Η ανεπάρκεια τύπου ΠΙRS προκαλείται συνήθως από σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες αφορούν τα αμινοξικά κατάλοιπα Ala382 και Ala384 καθώς και τα κατάλοιπα 392, 393 και 394 γύρω από RCL. Η ανεπάρκεια τύπου ΠΗBS προκαλείται από σημειακές μεταλλάξεις που αφορούν τα αμινοξικά κατάλοιπα 41, 47, 99 και 129 ενώ η τύπου ΠΠΕ προκαλείται από μεταλλάξεις που αφορούν τα αμινοξικά κατάλοιπα 402, 404 – 407 και 429, οι οποίες επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του RCL αλλά και τα επίπεδα της ΑΤ, δεδομένου ότι η περιοχή την οποία αφορούν οι μεταλλάξεις είναι απαραίτητη για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα του μορίου της ΑΤ.<sup>65,66</sup>

## 2. Ανεπάρκεια πρωτεΐνης C

Η PC είναι μια βιταμίνη-Κ εξαρτώμενη πρωτεΐνη, MB 62kDa, η οποία αποτελείται από δύο αλυσίδες συνδεδεμένες με δισουλφιδικές γέφυρες. Η ενεργοποίηση και η μετατροπή της σε πρωτεάση σερίνης (ενεργοποιημένη PC - APC -) καταλύεται από τη θρομβίνη όταν η PC συνδέεται με την ενδοθηλιακή πρωτεογλυκάνη θρομβομοντου-

λίνη. Η APC αδρανοποιεί, με πρωτεολυτική διάσπαση, τους ενεργοποιημένους παράγοντες V και VIII, παράγοντες απαραίτητοι για την ενεργοποίηση του FX και τη δημιουργία θρομβίνης. Η καταλυτική της δράση αυξάνει σημαντικά από τον συμπαράγοντα της πρωτεΐνης S. Η ανεπάρκεια APC προκαλεί διαταραχή μεταξύ των πηκτικών και αντιπηκτικών πρωτεϊνών, ειδικά σε συνθήκες βραδείας αιματικής κυκλοφορίας, οπότε η παρατεταμένη επαφή των FVa και FVIIIa και των αιμοπεταλιακών φωσφολιπιδίων με το αγγειακό τοίχωμα προδιαθέτει στη δημιουργία θρόμβων, ειδικά στη φλεβική κυκλοφορία.<sup>67</sup>

Η ανεπάρκεια της PC προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της PC (PROC), στο χρωμόσωμα 2 (2q13-14) το οποίο αποτελείται από 9 εξόνια (I - IX). Περίπου 195 μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στο PROC, οι περισσότερες από τις οποίες είναι δένο σημειακές και προκαλούν την αντικατάσταση ενός αμινοξέος στο μόριο της PC.<sup>68</sup> Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούν δύο φαινότυπους ανεπάρκειας της PC. Ο τύπος Ι χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη μείωση των αντιγονικών επιπέδων και της δραστηριότητας της PC (ποσοτική διαταραχή). Οι ετεροζυγώτες της διαταραχής έχουν περίπου 50% των φυσιολογικών αντιγονικών και λειτουργικών επιπέδων ενώ ομοζυγώτες ή σύνθετοι ετεροζυγώτες έχουν επίπεδα PC <1% - 25%.<sup>69</sup> Οι μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν τον τύπο Ι εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή και ματίσματος (splicesites) καθώς και στην κωδική αλληλουχία του γονιδίου. Στον τύπο ΙΙ, ο οποίος αποτελεί το 10% των περιπτώσεων, η δραστηριότητα της PC είναι μειωμένη αλλά τα αντιγονικά επίπεδα της πρωτεΐνης φυσιολογικά. Στον τύπο αυτό μεταλλάξεις στο εξόνιο ΙΙΙ, οι οποίες προκαλούν αντικαταστάσεις αμινοξέων στο προπεπτιδίο ή στην περιοχή του γ-καρβοξυγλουταμικού οξέος (GLA) συνεπάγονται χαμηλή αντιπηκτική δραστηριότητα της PC, ενώ μεταλλάξεις στο εξόνιο ΙΧ, το οποίο κωδικοποιεί την τυπική καταλυτική περιοχή της πρωτεάσης σερίνης συνδέονται επίσης με χαμηλή δραστηριότητα της PC (μη λειτουργική PC).<sup>70</sup>

## 3. Ανεπάρκεια πρωτεΐνης S

Η PS είναι μια βιταμίνη-Κ εξαρτώμενη γλυκοπρωτεΐνη, MB 75 kDa. Στην κυκλοφορία βρίσκεται με δυο μορφές: την ελεύθερη (40%) και τη συνδεδεμένη με τη C4b δεσμευτική πρωτεΐνη (C4b – bindingprotein - C4BP -). Η PS λειτουργεί ως συμπαράγοντας της PC. Συγκεκριμένα, μετά την ενεργοποίηση της PC, η PS συνδέεται με την APC στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και συμμετέχει στη δεύτερη φάση αδρανοποίησης του FVa αυξάνοντας κατά 20 φορές την υδρόλυση του παράγοντα από την APC στη θέση Arg306. Επιπλέον αυξάνει, συνεργικά με το FV, την αδρανοποίηση του FVIIIa από την APC. Μόνο η ελεύθερη PS δρα ως συμπαράγοντας της PC.<sup>67</sup> Η

PS ασκεί αντιπηκτική δράση στο σύστημα της προθρομβινάσης και πιθανόν στον FXa, ανεξάρτητα της APC.<sup>71</sup>

Υπάρχουν τρεις τύποι ανεπάρκειας της PS. Ο τύπος I (ποσοτική διαταραχή) χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα τόσο της ελεύθερης όσο και της συνδεδεμένης με την C4BPPS, ο τύπος II (ποιοτική διαταραχή) από φυσιολογικά επίπεδα PS αλλά το μόριο της PS είναι δυσλειτουργικό και ο τύπος III (ποσοτική διαταραχή) χαρακτηρίζεται από φυσιολογικά επίπεδα ολικής αλλά χαμηλά επίπεδα ελεύθερης PS. Το γονίδιο της PS (*PROSI*) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 (3p11). Περίπου 200 διαφορετικές μεταλλάξεις, οι περισσότερες σημειακές ή μικρές ελλείψεις ή προσθήκες και μάλιστα σε όλο το μήκος του γονιδίου, συνδέονται αιτιολογικά με την ανεπάρκεια της PS ενώ μεγάλες ελλείψεις ή προσθήκες αφορούν μόνο το 4% των περιπτώσεων. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις αυτές αφορούν του τύπους I και III και προκαλούν μείωση των επιπέδων της PS. Μεταλλάξεις του *PROSI*, οι οποίες συνδέονται με τον τύπο II είναι σπάνιες, συνήθως σημειακές και αφορούν κυρίως τις περιοχές στο αμινοτελικό άκρο του μορίου της PS, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία της PS ως συμπαραγόντας της APC.<sup>72,73</sup>

#### 4. Παράγοντας VLeiden

Το 1993 οι Dahlbäck και συνεργάτες έδειξαν ότι ο χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (APTT) του φυσιολογικού πλάσματος παρατείνεται με την προσθήκη ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (APC). Η APC αδρανοποιεί τους ενεργοποιημένους παράγοντες V (FVa) και VIII (FVIIIa), προλαμβάνοντας με τον τρόπο αυτό τον περαιτέρω σχηματισμό θρομβίνης. Παρόλα αυτά υπήρχαν ασθενείς, με ατομικό ιστορικό θρομβώσεων, στο πλάσμα των οποίων η προσθήκη APC προκαλούσε πολύ μικρότερη παράταση του APTT, η οποία όμως δι-ορθωνόταν με την προσθήκη φυσιολογικού πλάσματος. Οι ασθενείς αυτοί χαρακτηρίστηκαν ως «ανθεκτικοί στην επίδραση της APC». Η μελέτη μελών των οικογενειών των ασθενών αυτών αποκάλυψε και άλλα μέλη με αντίσταση στην πρωτεΐνη C (APC Resistance - APCR -), γεγονός το οποίο κατεδείκνυε ότι η διαταραχή κληρονομείται με αυτοσωματικό κυρίαρχο χαρακτήρα.<sup>12</sup>

Η διόρθωση της αντίστασης στην APC με την προσθήκη του φυσιολογικού πλάσματος σχετίζεται με τον παράγοντα V (FV). Ο FV είναι γλυκοπρωτεΐνη 330 kDa η οποία αποτελείται από 6 περιοχές (domains) (A1, A2, B, A3, C1 και C2) και το γονίδιο του εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (1q23). Η θρομβίνη και ο FXa ενεργοποιούν τον FV με διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών στις θέσεις 709, 1.018 και 1.545, απελευθερώνουν την περιοχή B, η οποία συνδέει τη βαριά άλυσσο (περιοχές A1, A2) με την ελαφρά άλυσσο (περιοχές A3, C1, C2). Ο FVa σχηματίζεται από τη βαριά και την ελαφρά άλυσσο συνδεδεμένες με

ιόντα  $Ca^{2+}$  και είναι απαραίτητος συμπαραγόντας του FXa στο σύμπλεγμα προθρομβινάσης αυξάνοντας το ρυθμό ενεργοποίησης της προθρομβίνης κατά  $10^3 - 10^5$  φορές.

Η αδρανοποίηση του FVa, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με την επιφάνεια των αιμοπεταλίων, επιτυγχάνεται με τη δράση της APC η οποία διασπά τον FVa στις θέσεις Arg306, Arg506 και Arg679. Η διάσπαση στη θέση Arg506 μειώνει μερικώς (περίπου 60%) τη δραστηριότητα του FVa αλλά είναι απαραίτητη για την έκθεση των θέσεων διάσπασης Arg506 και Arg679. Η διάσπαση του FVa στη θέση Arg306 είναι απαραίτητη για την πλήρη αδρανοποίηση του παράγοντα ενώ στη θέση Arg679 είναι ήσσονος σημασίας. Έτσι διαταραχές σε οποιαδήποτε από τις τρεις θέσεις διάσπασης του FVa έχει ως αποτέλεσμα διαταραχή της αδρανοποίησης του παράγοντα από τη APC ενώ διατηρείται η αιμοστατική του δράση. Ο FVa, μετά τη διάσπασή του στη θέση 506 δρα και ως συμπαραγόντας της APC (μαζί με την PS) στην αδρανοποίηση του FVIIIa, οπότε έχει ταυτόχρονα με την αιμοστατική και αντιπηκτική δράση.<sup>74</sup>

Το 1994, οι Bertina και συνεργάτες, περιέγραψαν τη μοριακή βάση της αντίστασης στην APC, η οποία είναι αποτέλεσμα μιας μετάλλαξης, της αντικατάστασης μιας βάσης (G από A), στη θέση 1.691 του γονιδίου του FV, η οποία συνεπάγεται την αντικατάσταση μιας αργινίνης από γλουταμίνη στη θέση 506 του FV (Arg506Gln). Η μετάλλαξη αυτή είναι γνωστή ως FV Leiden. Ο FV Leiden αδρανοποιείται από την APC περίπου 10 φορές βραδύτερα συγκριτικά με τον φυσιολογικό FVa και επιπλέον χάνει την ιδιότητά του να δρα ως συμπαραγόντας της APC στην αδρανοποίηση του FVIIIa, γεγονός που συμβάλλει στη δημιουργία θρομβίνης και στην ανάπτυξη του θρόμβου.<sup>27</sup>

Από μεταλλάξεις στη θέση διάσπασης Arg306, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση, στη θέση 306 του FV, της αργινίνης από γλυκίνη (Arg306Gly) ή της αργινίνης από θρεονίνη (Arg306Thr) προκύπτουν οι παράγοντες FV Hong Kong και FV Cambridge αντίστοιχα.<sup>75,76</sup> Οι FV Hong Kong και FV Cambridge, παρότι προκαλούν ARCR δεν συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο θρομβώσεων.<sup>77</sup>

#### 5. Μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης

Η προθρομβίνη (FII), γλυκοπρωτεΐνη 72kDa, ενεργοποιείται από τον FXa, παρουσία του FVa, φωσφολιπιδίων και  $Ca^{2+}$ , με τη διάσπαση του μορίου της στις θέσεις Arg271 – Thr 272 και Arg320 – Ile321 και μετατρέπεται σε θρομβίνη. Η θρομβίνη είναι ένζυμο «κλειδί» στο μηχανισμό αιμόστασης δεδομένου ότι διαθέτει αιμοστατικές ιδιότητες (ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια και τους FVIII, FV, FXIII, FXI, μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινική), αντιπηκτικές (ενεργοποιεί την PC) και ινωδολυτικές ιδιότητες



(ενεργοποιεί τον ενεργοποιούμενο από τη θρομβίνη αναστολέα της ινωδόλυσης - TAFI). Όταν ο FII παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες προκαλείται υπερπηκτικότητα, δεδομένου ότι αύξηση των επιπέδων FII κατά 15% των φυσιολογικών διπλασιάζει τον κίνδυνο θρομβοεμβολής.

Το γονίδιο του FII βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 (11p11-q12) και αποτελείται από 14 εξόνια και 13 ιντρόνια και τις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές, οι οποίες παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση του γονιδίου.<sup>78</sup> Το 1996 οι Rooit και συνεργάτες, βρήκαν ότι μία σημειακή μετάλλαξη (αντικατάσταση γουανίνης από αδενίνη) στη θέση 20210 (G20210A) στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου του FII, η οποία δεν μεταβάλλει τη δομή και τη λειτουργία του μορίου του FII αλλά συνεπάγεται επιβράδυνση της αποδόμησης και συνεπώς αύξηση του mRNA και της σύνθεσης της προθρομβίνης.

Οι ετεροζυγώτες φορείς της μετάλλαξης G20210A του FII έχουν επίπεδα FII κατά 30% υψηλότερα των φυσιολογικών, ενώ οι ομοζυγώτες κατά 70%, και συνεπώς αυξημένη παραγωγή θρομβίνης, η οποία αυξάνει 2 - 4 τον κίνδυνο θρόμβωσης στους ετεροζυγώτες και στους ομοζυγώτες σαφώς περισσότερο.<sup>13</sup>

Επιπλέον τα υψηλά επίπεδα FII προκαλούν και αύξηση των επιπέδων του TAFI και διαταραχή της ινωδολυσης<sup>79</sup> και πιθανόν αναστολή της αδρανοποίησης του FVa από την APC.<sup>80</sup>

## 6. Αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VIII

Ο παράγοντας VIII (FVIII) παίζει βασικό ρόλο στην αιμόσταση. Ενεργοποιείται από τη θρομβίνη και δρα ως συμπαράγοντας του FIXa στο σύμπλεγμα της τενάσης. Αδρανοποιείται από την APC με πρωτεολυτική διάσπαση του μορίου της στις θέσεις Arg336 και Arg562. Τα υψηλά επίπεδα του FVIII, εκτός αντίδρασης οξείας φάσης, αυξάνουν τον κίνδυνο φλεβικής και αρτηριακής θρόμβωσης αλλά και υποτροπής της θρόμβωσης, μέσω αύξησης της παραγόμενης θρομβίνης ή/και μέσω επαγωγής επίκτητης αντίστασης στην APC. Η αιτιολογική σχέση των αυξημένων επιπέδων του FVIII με τις αρτηριακές θρομβώσεις βασίζεται στην αυξημένη παραγωγή θρομβίνης και στην αυξημένη προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων, μέσω του παράγοντα vonWillebrand (vWF), στα σημεία της αρτηριακής βλάβης.<sup>53,81</sup> Η μοριακή βάση των αυξημένων επιπέδων του FVIII είναι άγνωστη. Οι ομάδες αίματος ABO φαίνεται ότι ευθύνονται για το 30% των διακυμάνσεων των επιπέδων του FVIII. Η αύξηση των επιπέδων του παράγοντα φαίνεται ότι συμβαδίζει με την αύξηση των επιπέδων του vWF, είτε λόγω αυξημένης σύνθεσης είτε λόγω μειωμένης κάθαρσης των συμπλεγμάτων FVIII/vWF. Πιθανόν η τροποποιημένη ευαισθησία του vWF στη διάσπασή του από την ADAMTS13 είναι ένας από τους κύριους μηχανισμούς με τον οποίο οι ομάδες αίματος επηρεάζουν τα επίπεδα του FVIII.<sup>82</sup>

## 7. Υπερομοκυστεϊναιμία

Υπερομοκυστεϊναιμία είναι η παθολογική κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα (>15 μmol/L) ομοκυστεϊνης στο πλάσμα. Η ομοκυστεϊνη είναι ενδιάμεσο προϊόν του μεταβολικού κύκλου του αμινοξέος μεθειονίνη. Η μεθειονίνη μετατρέπεται σε ομοκυστεϊνη, η οποία στη συνέχεια είτε μετατρέπεται σε κυσταθειονίνη και κυστεϊνη με τη δράση του ενζύμου β-συνθεάση της κυσταθειονίνης (CBS) και συμπαράγοντα τη βιταμίνη B6, είτε επαναμεθυλιώνεται σε μεθειονίνη. Στη δεύτερη περίπτωση απαιτείται η δράση των ενζύμων συνθεάση της μεθειονίνης (MS), 5,10-μεθυλενοτετραδροφολική αναγωγή (MTHFR) και μεθυλτρανσφεράση βεταΐνης-ομοκυστεϊνης (BHMT), καθώς επίσης και η βιταμίνη B12, η οποία δρα ως συμπαράγοντας. Επίσης χρειάζονται και τα παράγωγα του φυλλικού οξέος (5-μεθυλτετραδροφολικό) και η βεταΐνη, που δρουν ως δότες μεθυλικών ομάδων.<sup>83</sup> Μεταλλάξεις στα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της ομοκυστεϊνης (CBS, MS, MTHFR, BHMT) οδηγούν σε υπερομοκυστεϊναιμία. Ομοζυγώτες γενετικών διαταραχών των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν τη CBS ή τη MTHFR παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων της ομοκυστεϊνης >100μmol/L και ομοκυστινουρία, παθολογική κατάσταση η οποία συνοδεύεται από πρόωρη αθηροσκλήρωση, φλεβικές θρομβώσεις, νοητική υστέρηση, σκελετικές ανωμαλίες και έκτοπους φακούς. Ήπια (16 - 24μmol/L) ή μέτρια (25 - 100μmol/L) υπερομοκυστεϊναιμία παρατηρείται σε ετεροζυγώτες σπάνιων διαταραχών οι οποίες προκαλούν ανεπάρκεια της CBS. Συχνότεροι όμως είναι δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί τη MTHFR, στο χρωμόσωμα 1 (1p36). Συγκεκριμένα, η αντικατάσταση μιας βάσης κυτοσίνης από θυμίνη στη θέση 677 (677C>T), συνεπάγεται την αντικατάσταση ενός αμινοξέος (Ala σε Val) στη θέση 222 του μορίου και προκαλεί θερμοευαισθησία της MTHFR και μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου στο 30% στους ομοζυγώτες και 65% στους ετεροζυγώτες.<sup>84</sup> Η αντικατάσταση μιας βάσης αδενίνης από κυτοσίνη στη θέση 1298 (1298A>C), συνεπάγεται την αντικατάσταση ενός αμινοξέος (Glu σε Ala) στη θέση 429, αλλά ο πολυμορφισμός αυτός δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα ομοκυστεϊνης.<sup>85</sup>

Ανεπαρκής πρόσληψη φυλλικού οξέος, βιταμίνης B12 ή B6 μπορεί να προκαλέσουν υπερομοκυστεϊναιμία, η οποία μάλιστα υποστρέφεται με τη λήψη των βιταμινών αυτών.<sup>86</sup>

Η υπερομοκυστεϊναιμία προκαλεί θρομβώσεις μέσω διαφόρων μηχανισμών. Συγκεκριμένα προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών, αναστολή της έκκρισης προστακυκλίνης και NO και αγγειακή φλεγμονή και αθηροσκλήρωση. Επιπλέον

προκαλεί αύξηση της έκφρασης του ιστικού παράγοντα (TF), αναστολή της έκφρασης της θειικής ηπαράνης, αναστολή του ιστικού τύπου ε νεργοποιητή του πλασμινογόνου (t-PA) και αναστολή της ενεργοποίησης της PC από τη θρομβομοντουλίνη.<sup>87</sup>

### Ευχαριστίες

Ευχαριστίες στον κ. Ονουφριάδη Ηλία, ειδικευόμενο Αιματολογίας στη Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική Α.Π.Θ., για τη συμβολή του.

## Inherited Thrombophilia Classification – Epidemiology – Pathophysiology

by Vasileia Garypidou, Sofia Vakalopoulou

2nd Department of Propaedeutic Internal Medicine, Aristoteleio University of Thessaloniki,  
Hippokration Hospital, Thessaloniki, Greece

**ABSTRACT:** The term thrombophilia was first introduced by Egeberg in 1965, when he reported a family with remarkable tendency to venous thrombosis because of a deficiency in the natural anticoagulant antithrombin. At present the term is generally used to describe a laboratory abnormality (most often in the coagulation system) that increases the tendency mainly to venous thromboembolism. Thrombophilic abnormalities can be inherited or acquired. Following Egeberg's discovery several much more frequent inherited defects have been identified and studied. The causes of inherited thrombophilia include a group of definitely inherited disorders arising from a variety of genetic defects, as the deficiencies of natural anticoagulants (antithrombin, protein C and protein S), factor V Leiden, G20210A prothrombin mutation and a second group with multifactorial and at least partly inherited disorders, as the elevated levels of factor VIII and mild hyperhomocysteinemia. Overall incidence of inherited thrombophilia estimated as about 10% in the general population and 24-37% in patients with venous thrombosis. Inherited deficiency of natural anticoagulants, which play an important role in the downregulation of coagulation, result in an increased generation of thrombin and predisposition to thrombosis. The prevalence of the deficiency of natural anticoagulants in the general population is only 1% (and 7% in patients with venous thrombosis). The most common types of inherited thrombophilia, factor V Leiden and the prothrombin mutation G20210A, cause an overactivity of coagulation factors. Factor V Leiden is the result of a mutation in the factor V gene at position 1691 which causes a change in factor V protein, making it resistant to inactivation by activated protein C. The mutation G20210A in the 3' untranslated region of the prothrombin gene results in high levels of prothrombin that predispose in excess thrombin generation and thrombosis. The prevalence of factor V Leiden and prothrombin mutation in the European populations is 5-8% and 0,7-4% respectively, accounting for 50% of cases of inherited thrombophilia in Caucasians. Elevated factor VIII levels (>150%) is a very frequent disorder (11% in the general population) that predispose to venous thrombosis via enhanced thrombin formation and/or through the induction of acquired activated protein C resistance. Mild hyperhomocysteinemia (5% in the general population) is caused mainly by a mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene that results in a thermolabile variant of the enzyme, usually with inadequate intake of folic acid. Hyperhomocysteinemia can cause both arterial and vein thrombosis by numerous different mechanisms. Furthermore, there are many acquired or transient conditions that result to a prothrombotic state, including cancer, surgery, strict immobilization, pregnancy, estrogen containing medications e.t.c. The concept is that patients with thrombophilia have an intrinsic prothrombotic state that is in itself insufficient to cause thrombosis, but may lead to an event when superimposed on (clinical) risk factors.

### Βιβλιογραφία

1. Virchow R. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medtzin. Frankfurt, Germany: Medinger Sohn; 1856:219-732.
2. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965; 13:516-530.
3. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet.* 1999; 353:1167-1173.
4. Coppens M, Kaandorp SP, Middeldorp S. Inherited thrombophilias. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2006; 33:357-374.

5. Crowther MA, Kelton JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med.* 2003; 138:128-134
6. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood.* 1998; 92:2353-2358.
7. Rosenberg RD, Edelberg J, Zhang L. The heparin/antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. *Thrombosis and Hemostasis: Basic Principles and Clinical Practice.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:711-731.
8. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, et al. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest.* 1981; 68:1370-1373.
9. Comp PC, Esmon CT. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med.* 1984; 311:1525-1528.
10. Fitches AC, Appleby R, Lane DA, et al. Impaired cotranslational processing as a mechanism for type I antithrombin deficiency. *Blood.* 1998; 92:4671-4676.
11. Borgel D, Gandrille S, Aiach M. Protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 1997; 78:351-356.
12. Dahlback B, Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:1396-1400.
13. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996; 88:3698-3703.
14. Koster T, Blann AD, Briet E, et al. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet.* 1995; 345:152-155.
15. Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S, et al. Elevated levels of FVIII:C within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:79-84.
16. Der Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 1998; 80:874-877.
17. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, et al. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation.* 1998; 98:2520-2526.
18. Mateo J, Oliver A, Borrell M, et al. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost.* 1997; 77:444-451.
19. Margaglione M, Brancaccio V, Giuliani N, et al. Increased risk for venous thrombosis in carriers of the prothrombin G-->A20210 gene variant. *Ann Intern Med.* 1998; 129:89-93.
20. Buchanan GS, Rodgers GM, Branch DW. The inherited thrombophilias: genetics, epidemiology, and laboratory evaluation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003; 17:397-411.
21. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost.* 1995; 73:87-93.
22. Miletich J, Sherman L, Broze G Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med.* 1987; 317:991-996.
23. Tait RC, Walker ID, Perry DJ, et al. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. *Br J Haematol.* 1994; 87:106-112.
24. Heijboer H, Brandjes DP, Buller HR, et al. Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-venous thrombosis. *N Engl J Med.* 1990; 323:1512-1516.
25. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet.* 1995; 346:1133-1134.
26. Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, et al. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. *JAMA.* 1997; 277:1305-1307.
27. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994; 369:64-67.
28. Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet.* 2001; 109:369-384.
29. Dilley A, Austin H, Hooper WC, et al. Prevalence of the prothrombin 20210 G-to-A variant in blacks: infants, patients with venous thrombosis, patients with myocardial infarction, and control subjects. *J Lab Clin Med.* 1998; 132:452-455.
30. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998; 79:706-708.
31. Cumming AM, Keeney S, Salden A, et al. The prothrombin gene G20210A variant: prevalence in a UK anticoagulant clinic population. *Br J Haematol.* 1997; 98:353-355.
32. Haverkate F, Samama M. Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia. Report on a study of the SSC Subcommittee on Fibrinogen. *Thromb Haemost.* 1995; 73:151-161.
33. Der Heijer M, Koster T, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med.* 1996; 334:759-762.
34. Odegård OR, Abildgaard U. Antithrombin III: critical review of assay methods. Significance of variations in health and disease. *Haemostasis.* 1978; 7:127-134.
35. Picard V, Dautzenberg MD, Villoutreix BO, et al. Antithrombin Phe229Leu: a new homozygous variant leading to spontaneous antithrombin polymerization in vivo associated with severe childhood thrombosis. *Blood.* 2003; 102:919-925.
36. Finazzi G, Caccia R, Barbui T. Different prevalence of thromboembolism in the subtypes of congenital antithrombin III deficiency: review of 404 cases. *Thromb Haemost.* 1987; 58:1094.
37. Thaler E, Lechner K. Antithrombin III deficiency and

- thromboembolism. *Clin Haematol.* 1981; 10:369-390.
38. Demers C, Ginsberg JS, Hirsh J, et al. Thrombosis in antithrombin-III-deficient persons. Report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med.* 1992; 116:754-761.
  39. Koster T, Rosendaal FR, Briët E, et al. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood.* 1995; 85:2756-2761.
  40. Mustafa S, Mannhalter C, Rintelen C, et al. Clinical features of thrombophilia in families with gene defects in protein C or protein S combined with factor V Leiden. *Blood Coagul Fibrinol.* 1998; 9:85-89.
  41. Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, et al. A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol.* 2001; 113:636-641.
  42. Zöller B, Berntsdotter A, García de Frutos P, et al. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood.* 1995; 85:3518-3523.
  43. Lijfering WM, Mulder R, ten Kate MK, et al. Clinical relevance of decreased free protein S levels: results from a retrospective family cohort study involving 1143 relatives. *Blood.* 2009; 113:1225-1230.
  44. Pintao MC, Ribeiro DD, Bezemer ID, et al. Protein S levels and the risk of venous thrombosis: results from the MEGA case-control study. *Blood.* 2013; 122:3210-3219.
  45. Lee DH, Henderson PA, Blajchman MA. Prevalence of factor V Leiden in a Canadian blood donor population. *CMAJ.* 1996; 155:285-289.
  46. Taher A, Khalil I, Shamseddine A, et al. High prevalence of Factor V Leiden mutation among healthy individuals and patients with deep venous thrombosis in Lebanon: is the eastern Mediterranean region the area of origin of this mutation? *Thromb Haemost.* 2001; 86:723-724.
  47. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, et al. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* 1995; 85:1504-1508.
  48. Morelli VM, De Visser MC, Vos HL, et al. ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:183-185.
  49. Lensen R, Bertina RM, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. High factor VIII levels contribute to the thrombotic risk in families with factor V Leiden. *Br J Haematol.* 2001; 114:380-386.
  50. Castoldi E, Rosing J. APC resistance: biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost.* 2010; 8:445-453.
  51. Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2001; 86:809-816.
  52. Ehrenforth S, Ludwig G, Klinke S, et al. The prothrombin 20210 A allele is frequently coinherited in young carriers of the factor V Arg 506 to Gln mutation with venous thrombophilia. *Blood.* 1998; 91:2209-2210.
  53. Jenkins PV, Rawley O, Smith OP, O'Donnel JS. Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis. *Br J Haematol.* 2012; 157:653-663.
  54. O'Donnel J, Tuddenham EG, Manning R, et al. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. *Thromb Haemost.* 1997; 77:825-828.
  55. Patel RK, Ford E, Thumpston J, Arya R. Risk factors for venous thrombosis in the black population. *Thromb Haemost.* 2003; 90:835-838.
  56. Bank I, van de Poel MH, Coppens M, et al. Absolute annual incidences of first events of venous thromboembolism and arterial vascular events in individuals with elevated FVIII:c. A prospective family cohort study. *Thromb Haemost.* 2007; 98:1040-1044.
  57. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med.* 1996; 2:386-389.
  58. Ray JG. Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Intern Med.* 1998; 158:2101-2106.
  59. Eichinger S, Stümpflen A, Hirschl M, et al. Hyperhomocysteinemia is a risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 1998; 80:566-569.
  60. Margaglione M, D'Andrea G, d'Addetta M, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase TT677 genotype is associated with venous thrombosis independently of the coexistence of the FV Leiden and the prothrombin A20210 mutation. *Thromb Haemost.* 1998; 79:907-911.
  61. Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, et al. Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation.* 1997; 95:1777-1782.
  62. De Stefano V, Casorelli I, Rossi E, et al. Interaction between hyperhomocysteinemia and inherited thrombophilic factors in venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26:305-311.
  63. Lane DA, Caso R. Antithrombin: structure, genomic organization, function and inherited deficiency. *Baillieres Clin Haematol.* 1989; 2:961-998.
  64. Lane DA, Olds RJ, Thein SL. Antithrombin III: summary of first database update. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:173556-173559.
  65. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia.* 2008; 14:1229-1239.
  66. Lane DA, Bayston T, Olds RJ, et al. Antithrombin mutation database: 2<sup>nd</sup> (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.* 1997; 77:197-211.
  67. Esmon CT. The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscl Thromb.* 1992; 12:135-145.
  68. D'Ursi P, Marino F, Caprera A, et al. ProCMD: a database and 3D web resource for protein C mutants. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8(Suppl 1):S11.
  69. Aiach M, Gandrille S, Emmerich J. A review of mutations

- causing deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thromb Haemost.* 1995; 74:88-89.
70. Ahlenc-Gelas M, Gandrille S, Aubry ML, et al. French INSERM Network on molecular abnormalities responsible for protein C and protein S. Thirty-three novel mutation in the protein C gene. *Thromb Haemost.* 2000; 83:86-92.
71. Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM. Protein S binds to and inhibit factor Xa. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91:2728-2732.
72. Ten Kate MK, Van Der Meerh J. Protein S deficiency: a clinical perspective. *Haemophilia.* 2008; 14:1222-1228.
73. García de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, et al. Molecular basis of protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 2007; 98:543-556.
74. Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlback B. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated prothrombin C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood.* 1999; 93:2552-2558.
75. Chan WP, Lee CK, Kwong YL, et al. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood.* 1998; 91:1135-1139.
76. Williamson D, Brown K, Luddington R, et al. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306-Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood.* 1998; 91:1140-1144.
77. Norstrom E, Thorelli E, Dahlback B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood.* 2002; 100:524-530.
78. Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for the human prothrombin. *Biochemistry.* 1987; 26:6165-6177.
79. Miljčić P, Heylen E, Willemse J, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): a molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Srp Arh Celok Lek.* 2010; 138:74-78.
80. Smirnov MD, Safa O, Esmon NL, et al. Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin. *Blood.* 1999; 94:3839-3846.
81. Kamphuisen PW, Eikenboom JCJ, Bertina RM. Elevated Factor VIII Levels and the Risk of Thrombosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:731-738.
82. Jenkins PV, O'Donnell JS. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? *Transfusion.* 2006; 46:1836-1844.
83. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annual Review of Nutrition.* 1999; 19:217-246.
84. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost.* 1997; 78:523-526.
85. Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Gen Metab.* 1998; 64:169-172.
86. Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, et al. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA.* 1993; 270:2693-2698.
87. Perla-Kaja J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids.* 2007; 32:561-572.