

EGE ÜNİVERSİTESİ ORGAN NAKLİ MERKEZİNDE KARACİĞER TRANSPLANTASYONU ALICI VE DONÖRLERİNDEKİ FAKTÖR V LEIDEN GEN MUTASYONUNUN PREVALANSI

THE PREVALENCE OF FACTOR V LEIDEN GENE MUTATION ANALYSIS OF DONOR AND RECIPIENT AT THE ORGAN TRANSPLANTATION CENTER OF EGE UNIVERSITY

Zuhal EROĞLU¹ Çığır BİRAY AVCI¹ Murat KILIÇ² Buket KOSOVA² Erdal ÖZEN²
Cumhur GÜNDÜZ¹ Nejat TOPÇUOĞLU¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı-İzmir

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Organ Nakli Merkezi-İzmir

Anahtar sözcükler: Karaciğer transplantasyonu, FV Leiden mutasyonu, Trombozis

Key Words: Liver transplantation, FV Leiden mutation, Thrombosis

ÖZET

Karaciğer transplantasyonu, son evredeki karaciğer hastalıklarında ve akut karaciğer yetmezliğinde rutin bir tedavi haline gelmiştir. Koagülasyon faktörlerinden biri olan Faktör V karaciğer tarafından sentezlenmektedir. Koagülasyon faktör genlerindeki defektler, anormal veya derin ven tromboz gelişimi için risk faktörü oluşturabilecek yetersiz proteinlerin oluşumuna sebep olmaktadır. Aktif protein C' ye karşı kazanılmış olan direnç (APCr) en sık karşılaşılan koagülasyon anomalisidir ve % 90 – 95 oranında faktör V Leiden mutasyonu sonucu gelişmektedir. Bu mutasyon, G1691A genotiplemesi şeklinde karakterize edilmektedir. Trombofilik anomalilerde canlı donörlerin genotiplemesi mutlaka gerekmektedir. Karaciğer transplantasyonu sonrası olguların yaklaşık % 2.7' sinde derin ven trombozu gözlenmektedir. Bu amaçla, organ alıcı ve donörlerinde FV Leiden gen mutasyonu analizi yapılmalıdır.

Çalışmamızda alıcı (191 kişi) ve donör (693 kişi) olarak Anabilim Dalı' mıza yollanan toplam 884 olgunun kan örneklerinden genomik DNA izole edilmiş ve Faktör V Leiden mutasyonları Real-time Online PCR ile saptanmıştır.

Toplam 884 olgunun dahil edildiği çalışmamızda FV Leiden gen mutasyonu için 80 olgu heterozigot, üç olgu homozigot, 801 olgu normal genotipte olduğu belirlenmiştir.

Karaciğer transplantasyonu sonrasında, derin-ven trombozisi geliştiren hastaların, donör karaciğerinde homozigot Faktör V Leiden gen mutasyonu sonucu ortaya çıkan sonradan kazanılmış aktive olmuş Protein C (APC) rezistansı temeline dayandığı belirtilmiştir. FV Leiden gen mutasyonunun rutin taraması pre ve post operatif koagülasyonların kullanımı transplantasyon olgularında tromboembolik komplikasyonların gelişimini önlemede uygun bir stratejidir. Sonuç olarak bu genotipleme, hem alıcıyı hem de donörün trombozdan korunmasını sağlamaktadır.

SUMMARY

Liver transplantation has become a routine procedure for the treatment of end stage of chronic liver disease and acute liver failure. Factor V which is one of the coagulation factors is synthesized by the liver. Defects in coagulation factor genes may lead to the production of abnormal or deficient proteins that constellate risk factors for the development of deep-vein thrombosis. Acquired Active protein C resistance is the most encountered coagulation abnormality and in 90–95 % of cases and it is caused by a point mutation in the factor V gene. The factor V Leiden mutation is genotyped for a single base-pair change (G1691A). Patients who develop venous thrombosis after liver transplantation should be screened for thrombophilic abnormalities. Deep-vein thrombosis occurs approximately 2.7% of patients after liver transplantation. For this reason, FV Leiden mutation has determined in organ donors and recipients.

Yazışma adresi: Çığır BİRAY AVCI, Ege Ünveritesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

Makalenin geliş tarihi : 25.10.2005 ; kabul tarihi : 27.09.2006

In our study; recipient (191 individuals), donors (693 individuals) totally 884 cases appealed to our department. Genomic DNA of the cases isolated and FV Leiden mutation was determined by Real Time Online PCR.

Totally 884 individual, included to our study. The prevalence of the heterozygous mutation was 80 and homozygous mutation was 3. Number of normal genotype was determined 801 individuals. Routine screening for factor V Leiden mutation by polymerase chain reaction, and appropriate pre-operative and post-operative anticoagulation after transplantation might be valuable strategy to prevent thromboembolic complications in transplant recipients.

GİRİŞ

Faktör V, kan koagülasyon sistemindeki en önemli prote- inlerden biridir ve aktive edilmiş protein C (APC)' nin kofaktörü olarak fonksiyon yapmaktadır. APC ile birlikte Faktör VIIIa' yı inaktive etmekte, ayrıca Faktör V' in kendi aktive formu protrombinin proteolitik aktivasyonunda kofaktör olarak rol oynayarak protrombini trombine dönüştürmektedir (1).

Aktive edilmiş protein C rezistansına (APCR) yol açan FV Leiden mutasyonu trombofilinin en sık görülen genetik risk faktörüdür ve venöz tromboz olgularının %90–95' inde görülmektedir (2). Aktive edilmiş protein C, FVa ve FVIIIa' yı inaktive ederek kanın pıhtılaşmasını düzenleyen bir serin proteaz enzimidir. APC, FVa proteinini 679, 506 ve 306' daki arginin bölgelerinden keserek inaktive etmektedir. FV Leiden mutasyonu 1691. nükleotid G' nin A' ya değişmesine neden olan bir nokta mutasyondur. Bu da 506. pozisyonundaki Argininin yerine Glutamin' in geçmesine neden olur (3,4).

Ekstrahepatik venöz trombozis, karaciğer transplantasyonu sonrası sık karşılaşılan bir komplikasyondur. Karaciğer transplantasyonu sonrası olguların yaklaşık % 2.7' sinde derin ven trombozu gözlenmektedir. Bu amaçla transplantasyon öncesi organ alıcı ve donörler de FV Leiden gen mutasyonunun araştırılması oldukça önemlidir (5).

Çalışmamızda, organ nakli merkezinde transplantasyon öncesi incelemeye alınan 191 alıcı ve 693 donör olmak üzere toplam 884 olguda Faktör V Leiden gen mutasyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

Olgu ve Metot

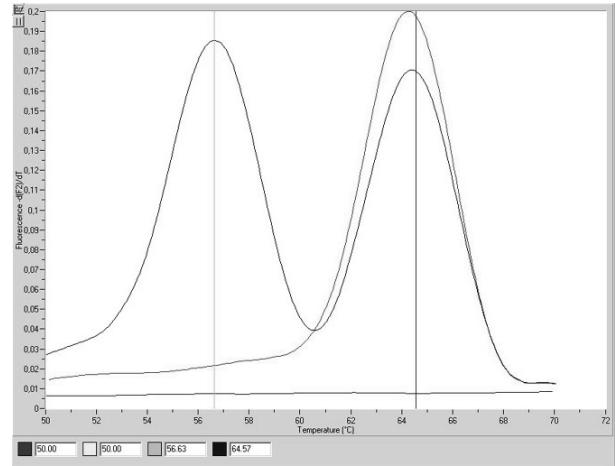
Organ naklinde transplantasyon öncesi incelemeye alınan 191 alıcı (% 31 Kadın, % 69 Erkek) ve 693 donör (% 42 Kadın, % 58 Erkek) olmak üzere toplam 884 olgu çalışılmıştır. Alıcı grubunun yaş ortalaması 33,87 (1- 66 yaş aralığı) ve donör grubunun yaş ortalaması ise; 37, 27 (1- 69 yaş aralığı) dir.

Genomik DNA Eldesi: Olguların EDTA' lı tüplere alınan kan örneklerinden High Pure PCR Template Preparation Kiti (Roche) kullanılarak DNA izolasyonları yapılmıştır.

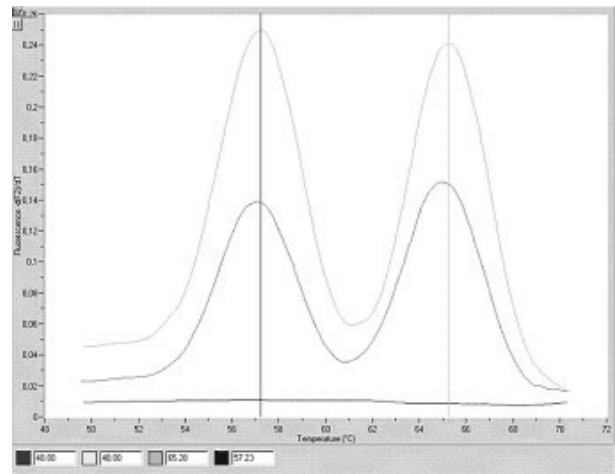
Faktör V Leiden Mutasyonunun Saptanması:

1691. nükleotid G'nin A'ya değişmesine neden olan bu nokta mutasyonu, mutasyon belirleme yöntemlerinden

biri olan Real-time Online PCR yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Olguların genotipleri Lightcycler cihazında Lightcycler-Factor V Leiden Mutation Detection Kiti (Roche) kullanılarak 'Melting Curve' erime noktası eğrisine göre değerlendirilmiştir. Bu analize göre 65°C' de gözlenen tek pik wildtype (Şekil 1), 65°C ve 57°C de gözlenen iki pik heterozigot (Şekil 2) ve 57°C' de gözlenen tek pik ise homozigot mutant (Şekil 3) genotip olarak değerlendirilmiştir. Faktör V geninin 222 baz çiftlik fragmanı, insan genomik DNA'sında spesifik primerler ile amplifiye edilmektedir.

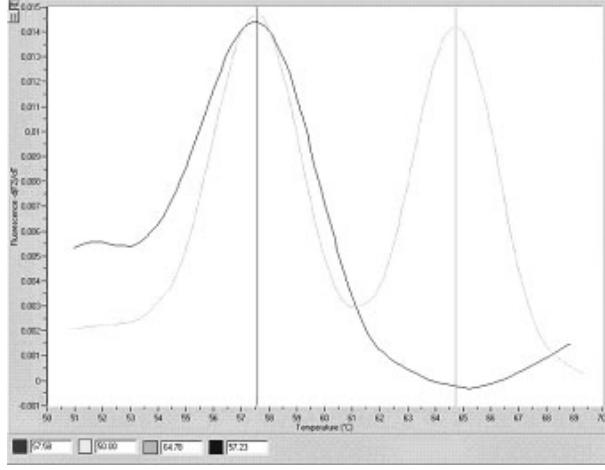


Şekil 1. GG genotipinin erime noktası eğrisi



Şekil 2. GA genotipinin erime noktası eğrisi

Amplikon, floresans ile hibridizasyon problemlerinin spesifik çiftleri kullanılarak tespit edilmektedir. Hibridizasyon problemleri iki farklı oligonükleotitten oluşmaktadır.



Şekil 3. AA genotipinin erime noktası eğrisi

Problardan biri Lightcycler-Red 640 ile 5' ucundan işaretlenmekte ve uzamayı engellemek için fosforilasyon ile 3' ucunda modifiye edilmektedir. Diğer prob ise floresein ile 3' ucundan işaretlenmektedir. Kalıp DNA ya hibridizasyondan hemen sonra iki prob birbirine çok yaklaşır ve iki florofor arasında floresans rezonans enerji transferi (FRET) gerçekleşir ve Lightcycler'in emilmiş floresansı - Red640 lightcycler cihazı ile ölçülür.

İstatistik Analiz:

Genotip ve haplotip sonuçlarının değerlendirilmesi χ^2 testi SPSS for Windows' ta gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık derecesi $p < 0.05$ alınmıştır.

BULGULAR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı Organ Nakli Merkezine müracaat eden 191 alıcı ve 693 donörün Faktör V Leiden (G1691A) gen mutasyon analizleri yapılmıştır. Organ nakli yapılan alıcıların karaciğer hastalık etiyojileri Tablo 1' de verilmiştir. Nakli yapılan karaciğerin % 42'si canlıdan, % 58' i ise kadavradan alınmıştır.

Toplam 884 olgunun dahil olduğu çalışmamızda; Faktör V Leiden mutasyonu için 80 olgu heterozigot, 3 olgu homozigot mutant ve 801 olgunun ise normal genotipte olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Alıcı grupta mutant aleli içeren GA ve AA genotiplerinde belirgin bir artış (odd oranı=3,22) bulunmuş ve gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır ($\chi^2=26,621$, $p < 0.001$).

Haplotip analizi yapıldığında ise mutant A haplotipi alıcı grubunda 3 kata yakın artış gösterirken, alıcı ve verici grup arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır [$X^2=27,210$, $p < 0.001$, (Tablo 3)]. Alel frekanslarının odd oranları Tablo 4' te verilmiştir.

Tablo 1. Organ nakli yapılan olguların etiyojisi

Hastalık	Sıklığı (%)
Hepatit B Virus	40
Hepatit C Virus	9
Hepatit B+D Virus	7
Alkolik Siroz	5
Primer/Sekonder Bilier Atrezi	5
Kriptojenik siroz	5
Wilson Sirozu	5
Otoimmün hastalık	4
Fulminant Hepatit	3
Primer skleroz kolanjit	3
Hepatit B Virus + Hepatoselüler karsinom	3
Hepatit C Virus + Hepatoselüler karsinom	2
Budd Chiari	1
Kronik rejeksiyon	1
Diğer	7

Tablo 2. Alıcı ve verici gruplarında Faktör V Leiden genotip dağılımı ($p < 0.001$)

	GG (%)	GA (%)	AA (%)	Toplam
Alıcı	155 (81,2)	34 (17,8)	2 (1,0)	191
Verici	646 (93,2)	46 (6,6)	1 (0,1)	693
Toplam	801 (90,6)	80 (9,0)	3 (0,3)	884

Tablo 3. Faktör V Leiden Haplotip Frekansları ($p < 0.001$)

	G (%)	A (%)	Toplam
Alıcı	344 (90,1)	38 (9,9)	382
Verici	1338 (96,5)	48 (3,5)	1386
Toplam	1682 (95,1)	86 (4,9)	1768

Tablo 4. Faktör V Leiden Alel frekanslarının Odd Oranları

	OR	CI (%95)
A	2,872	1,906-4,329
G	0,933	0,901 -0,966

TARTIŞMA

Çalışmamızda, karaciğer transplantasyonu yapılan olgularda ve donörlerde Faktör V Leiden mutasyonu araştırılmış ve mutant A alelinin, kontrol grubuna göre karaciğer nakli yapılan olgularda 3,22 kat artmış olduğu saptanmıştır.

APC'nin kalıtsal rezistansı, venöz tromboz için önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (6). Olguların yaklaşık % 90'ında, APC'nin etkisine rezistans, koagülasyon faktörü V genindeki nokta mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu nokta mutasyonu (ekzon 10' daki G1691>A değişimi) R506>Q değişimine neden olmakta ve APC proteininin ilk yarık bölgesini değiştirmektedir. Bunun sonucunda, aktive olmuş faktör V' in degradasyonuna rezistans oluşmaktadır (7). FV Leiden mutasyonu, venöz tromboembolizm için 6 – 8 kat artmış risk oluşturur. Homozigot FVL aleli, derin- ven trombozu için 80 kat artmış risk taşımaktadırlar (6). Bu mutasyonu heterozigot olarak taşıyanların sıklığı beyaz ırk popülasyonunda %2–7 olarak bildirilmiştir (8). Organ transplantasyonu yapılan olgulardaki Faktör V Leiden mutasyonunun heterozigot sıklığı donörlerde % 6,9 ve alıcılarda ise % 8,9 olarak bulunmuştur (9). Çalışmamızda heterozigot genotip donör grubunda %6,6 olarak saptanmış ve birçok çalışmadan farklı olarak donör grubumuzda % 0,1 sıklıkta homozigot mutant birey saptanmıştır. Donör grubundaki heterozigot sıklığı genel popülasyon sıklığı ile uyumlu olarak yorumlanmıştır. Alıcı gruptaki Faktör V Leiden heterozigot sıklığı %17,8 ve homozigot mutant sıklığı ise %1 olarak tespit edilmiş ve donörler ile alıcılar karşılaştırıldığında alıcılarda heterozigot genotip anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0.001). Haplotip analizinde ise A alelinin sıklığının artmış olduğu saptanmıştır (OR= 2,872). Alıcı grupta heterozigot sıklığının genel popülasyon sıklığına göre oldukça yüksek olması, Budd-Chiari sendromunda olduğu gibi (10) hastalığın

patogenezinde önemli bir genetik faktör olabileceğini düşündürmektedir.

Karaciğer transplantasyonundan sonra olguların yaklaşık %2,7' sinde derin ven trombozu oluşmaktadır (5). Buna ek olarak, karaciğer alıcılarının transplantasyon sonrası hiperkoagülasyon geliştirdikleri gözlenmektedir (11). Koagülasyon kaskadında bulunan proteinlerin çoğunluğu, karaciğer tarafından üretilmektedir. Bundan dolayı; bu proteinlerde bulunan defektlerin karaciğer transplantasyonu ile donörden alıcıya geçmesi şaşırtıcı değildir (12). APC rezistansı ile ilişkili tekrarlayan hepatik arter trombozu gibi derin ven trombozlar, gelişen ciddi trombotik komplikasyonlar, karaciğer transplantasyonu ile kazanılmış heterozigot Faktör V Leiden mutasyonu temeli olarak bildirilmiştir (13). İkiyüzondört karaciğer alıcısı ile yapılan bir çalışmada, karaciğer transplantasyonu sonrası tromboz gelişme riskinin, donör karaciğerindeki heterozigot FV Leiden mutasyonu varlığı ile arttığı fakat hepatik trombozun rölatif riskinin düşük olduğu rapor edilmiştir (14). FV Leiden mutasyonuna sahip renal transplant alıcıların, renal transplant ven trombozu, erken graft kaybı ve akut vasküler rejeksiyon için yüksek risk taşıdıkları bilinmektedir (7).

Bu trombofilik risk faktörünün tanısı, derin ven trombozlu karaciğer transplant alıcılarında tromboprofilaksi veya antikoagülant tedavinin doğru prognozunda önem taşımaktadır. Sonuç olarak; rutin taramada FV Leiden gen mutasyon analizinin yapılması pre ve post operatif koagülasyonların kullanımı ve transplantasyon olgularında tromboembolik komplikasyonların gelişimini önlemede uygun bir strateji olarak dikkat çekmektedir. Transplantasyon sonrası; donör-ilişkili mortalite oranının % 0,3 olduğu göz önünde bulundurulduğunda, canlı donörlerin FV Leiden mutasyonu açısından taranmasının, hem alıcı hem de donörde oluşabilecek trombofilik anomalilerden korunma açısından önem taşıdığını vurgulamaktayız.

KAYNAKLAR

1. Wilson DB, Salem HH, Mruk JS, et al. Biosynthesis of coagulation factor V by a human hepatocellular carcinoma cell line. *J Clin Invest*,1984; 73: 654–658.
2. Bertina RM, Koelman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*,1994; 369:64-067.
3. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and factor Va by activated protein C. *J Biol Chem*, 1994;269: 31869-31880.
4. Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD, Mann KG. Characterization of the molecular defect in factor V R506Q. *J Biol Chem*,1995;270:4053-4057.
5. Ishitani M, Angle J, Bickston S, et al. Liver transplantation: Incidence and management of deep venous thrombosis and pulmonary emboli. *Transplant Proc*, 1997; 29: 2861-2863.
6. Bauer KA. The thrombophilias: Well-defined risk factors with uncertain therapeutic implications. *Ann Intern Med*, 2001;135: 367- 373.
7. Wuthrich RP. Factor V Leiden mutation: Potential thrombogenic role in renal vein, dialysis graft and transplant vascular thrombosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10: 409- 414.

8. Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, et al. Factor V Leiden: the Copenhagen City Heart Study and two meta-analyses. *Blood*, 2002; 100 : 3-10.
9. Hirshfield G, Collier JD, Brown K, et al. Donor factor V Leiden mutation and vascular thrombosis following liver transplantation. *Liver Transpl Surg*. 1998;4:58-61
10. Mahmoud AEA, Elias E, Beauchamp N, Wilde JT. Prevalence of the factor V Leiden mutation in hepatic and portal vein thrombosis. *Gut* 1997 40: 798-800.
11. Gane E, Langley P, Williams R. Massive fluid loss and coagulation disturbances after liver transplantation. *Gastroenterology* 1995;109:1631-1638.
12. Schuetze SM, Linenberger M. Acquired protein S deficiency with multiple thrombotic complications after orthotopic liver transplant. *Transplantation* 1999;67:1366-1369.
13. Gillis S, Lebenthal A, Pogrebjisky G, et al. Severe thrombotic complications associated with activated protein C resistance acquired by orthotopic liver transplantation. *Haemostasis* 2000; 30: 316 - 320.
14. Hirshfield G, Collier JD, Brown K, et al. Donor factor V Leiden mutation and vascular thrombosis following liver transplantation. *Liver Transpl. Surg* 1998 ; 4 : 58 - 61.