



Forskningsprogram

Trombos hos kvinnor

-

ett samspel mellan arv och miljö

Huvudansvarig: Professor Ingemar Persson
Professor vid Inst för Medicinsk Epidemiologi, KI
Biverkningsenheten, Läkemedelsverket
Ingemar.Persson@mpa.se

Projektledare: Med Dr Helle Kieler
Inst för Medicinsk Epidemiologi, KI och Läkemedelsverket
Helle.Kieler@mep.ki.se

I Sverige utvecklar ca 200 kvinnor trombos varje år i samband med intag av p-piller eller hormonpreparat för klimakteriebesvär. Inte bara hormonella, men också genetiska och andra yttre faktorer har betydelse för uppkomsten av trombos¹. Hur och till vilken grad olika riskfaktorer samverkar är dock ofullständigt känt. Ett antal genetiska faktorer som påverkar koagulationssystemet har tidigare redovisats, men det finns skäl att anta att andra än de hittills kända också kan påverka uppkomsten av trombos². Genom att utnyttja modern genteknologi kan vi i denna epidemiologiska studie utforska specifika geners betydelse för trombosjukdomen och deras samverkan med andra riskfaktorer.

Specifika mål

I en fall-kontroll studie avser vi att för kvinnor mellan 18 och 65 år

- kartlägga vilka genetiska faktorer som har relation till venös tromboembolism;
- kartlägga yttre faktorerens betydelse för uppkomsten av venös tromboembolism;

För gruppen av yngre kvinnor som använder p-piller och för medelålders och äldre kvinnor som använder hormonpreparat avser vi

- kartlägga betydelsen av interaktionen mellan genetiska och förvärvade riskfaktorer vid venös tromboembolism

Områdesöversikt

Incidens

Venös trombos drabbar en av 1000 individer per år¹. De vanligaste typerna av venös trombos är djup ventrombos i en extremitet och lungemboli. Av de som får trombos dör 1-2%¹, och minst 20% med trombos i en extremitet utvecklar ett post-trombotisk syndrom³. Risken för trombos ökar med stigande ålder och trombosincidensen bland yngre är 1 per 10.000 individer och år och 1 per 100 för äldre och år. Det finns ett känt samband mellan könshormoner och ökad risk för venös trombos. Mer än hälften av unga svenska kvinnor använder p-piller och ca 20% av kvinnor i klimakteriet använder någon form av hormonpreparat (HRT). Den relativa riskökningen för trombos vid p-piller användning varierar mellan 2 och 4 beroende på hormontyp och dos⁴. Liknande riskökningar för trombos vid behandling med HRT har nämnts⁵.

Riskfaktorer för venös trombos

Riskfaktorerna kan uppdelas i förvärvade (Tabell 1) och genetiska (Tabell 2).

Förvärvade faktorer

Tre viktiga patogena mekanismer för uppkomst av blodpropp är stas av blodet, förändringar i kärlväggen och i blodkoagulationen. Etiologin till dessa exempel illustreras i Tabell 1.

Tabell 1 Förvärvade riskfaktorer för venös trombos

Patogena mekanismer	Etiologi	Exempel på etiologi
Venös stas	Låg fysisk aktivitet Tumörer i lilla bäckenet Graviditet Övervikt	Sjukdom, flygresor, stigande ålder
Förändringar i kärlväggen	Kärlskada Endotelial dysfunktion	Operation, venkateter Rökning? högt blodtryck, höga blodfetter? Stigande ålder
Förändringar i blodkoagulationen	Tumörsjukdomar Leversjukdomar Graviditet Kvinnliga könshormoner Kost Koagulationsfaktorer Läkemedel Årstidsvariationer	P-piller, HRT Hyperhomocysteinemi, folsyrabrist, vitamin B6 brist, vitamin B12 brist Hög koncentration av protrombin, Lupus antikoagulant Antipsykotika, cytostatika

Genetiska riskfaktorer

Genetiska avvikelser som påverkar koagulationssystemet kan vara mutationer eller nedärvda varianter, så kallade polymorfier². Mutationer är ovanliga, med en prevalens på under 1%. De mer vanliga polymorfier har därför en ur folkhälsoperspektiv större betydelse än mutationerna. ”Single nucleotide polymorphism” (SNP) är en polymorfism där det för en enstaka specifik nukleotidposition i en DNA-sekvens förekommer mer än en variant (vanligtvis två) i normalpopulationen. Den ovanligare av de två varianterna har en prevalens på över 1%. Eftersom koden för hur kroppens aminosyror ska sammankedjas för bildandet av proteiner avgörs av typ av nukleotid och deras inbördes ordning i en DNA-sekvens kan resultatet av en SNP bli att en annan aminosyra än normalt infogas. En förändrat aminosyrauppsättning i ett protein kan påverka funktionen av detta. Alternativt kan polymorfier, SNPs, som förekommer i regulatoriska regioner (icke translaterade) ha effekt på hur mycket av ett visst protein som tillverkas i en cell, och exempelvis avspeglas i plasma-

nivåer av det aktuella proteinet. Flera polymorfier med relation till trombos finns beskrivna^{2, 6} (tabell 2).

Tabell 2 Polymorfier med inverkan på koagulationssystemet

Polymorfi	Prevalens %	Tänkbar/ visad effekt
Faktor V (Leiden) 1691 (G-A)	5-10	APC resistens
Faktor II/protrombin 20210 (G-A)	2	↑ Protrombin
MTHFR 677(C-T) [ala222val]	15-35	↑ Homocystein
β-Fibrinogen -455(G-A), -854(G-A)	20	↑ Fibrinogen
Faktor VII, [-401G/T, -122 T/C, -323 P/P10 ins/del, R353Q]	10	↓ Faktor VII
Faktor VII, [-402G/A, intron 7 repeat]	25-30	↑ Faktor VII
Faktor XIII 163(G-T) [val34leu]	30-40	Stabiliserande på fibrin
Gp3a 1565(T-C) [leu33pro].	10-20	Trombocyt-funktionen
Plasminogen activator 1 (PAI-1) -675 4G/5G	40-50	↑ PAI-1
Faktor V Arg306	Låg	APC resistens
Faktor V HR2 haplotyp	8-10	APC resistens
α-Fibrinogen (thr312ala)	40	Faktor XIII
PAI-1 -844(G/A)	40	Högre risk för trombos vid faktor V Leiden mutation
ACE (Angiotensin converting enzyme) Ins/del	40-50	Högre risk för trombos hos gravida kvinnor
GP1a collagen receptor a-2 807 C/T	40?	Trombocyt-funktion
Protease activated thrombin receptor 1 -1426C/T, -506I/D	?	Lägre risk för trombos
TPA	?	Aktivering av fibrinolytiska systemet
EPCR	?	Protein C/APC resistens
Thrombomodulin Ala455Val, ala25Thr	20/1	?

Samverkan mellan förvärvade och genetiska faktorer

Få studier har fokuserat på den samverkande effekten av riskfaktorer, även om det är troligt att två eller flera riskfaktorer måste förekomma samtidigt om en trombos skall utvecklas¹. Att vara heterozygot bärare av Faktor V (Leiden) mutationen innebär relativ riskökning för trombos på 8⁷. Vid samtidig p-piller användning har den relativa risken för trombos rapporterats öka till 30¹. Från

en generellt låg risk på 1 per 10.000 och år för yngre kvinnor att drabbas av trombos ökar risken hos kvinnor med Faktor V (Leiden) mutationen som samtidigt använder p-piller således till 1 per 300.

I denna stora, populationsbaserade studie avser vi att med god statistisk styrka och genom användning av den senaste genteknologin och avancerade biostatistiska metoder, studera hur miljö och genetiska faktorer samverkar vid utveckling av trombos hos kvinnor. Genom att spara det insamlade DNA-materialet ger studien en unik möjlighet att i takt med kartläggningen av det mänskliga genomet upptäcka nya genetiska avvikelser med relation till trombos.

Projektbeskrivning

Studiedesign

Populationsbaserad fall-kontroll studie, inkluderande 1500 fall respektive kontroller under perioden 2003 – 2006. Information om förvärvade riskfaktorer för trombos inhämtas genom telefonintervju av studiedeltagarna och information om genetiska riskfaktorer genom DNA-analyser från blodprov.

Studiepopulation

Kvinnor mellan 18 och 65 år med incident trombos diagnosticerad på 49 stora och mellanstora sjukhus i Sverige avses inkluderas som fall. Som kontroller väljs ett åldersmatchat urval av kvinnor från samma geografiska områden som fallen från befolkningsregistret.

Identifikation och selektion av fall (Fig. 1)

För inklusion krävs objektivt verifierad djup ventrombos i benet, bäckenet eller lungemboli samt att patienten är insatt på antikoagulationsbehandling. Objektiva undersökningsmetoder för djup ventrombos i ben eller bäcken är flebografi och Dopplerultraljud. För lungemboli måste diagnosen vara verifierad med datortomografi av thorax (spiral CT), pulmonalisangiografi eller perfusions- och ventilationsscintigrafi. Endast svensktalande kvinnor inkluderas. Kvinnor som tidigare haft trombos (arteriell eller venös), är gravida eller har en aktuell malign sjukdom inkluderas inte. Kvinnor som tidigare har haft malign sjukdom inkluderas endast om behandlingen av denna är avslutad senast fem år före insjuknandet i trombos. Rekrytering av fall sker vid sjukhus som beräknas ha minst ett inkluderbart fall per månad samt flebografi som föredragen metod vid diagnos av ventrombos i ben eller bäcken. Selektionen sker stegvis, där registreringen av möjliga studiedeltagare utförs av kontaktperson på avdelningen.

Steg 1 På sjukhus med trombosmottagningar som behandlar minst 90% av trombospatienterna i sjukhusets upptagningsområde registreras kvinnor, 18-65 år med incident trombos via medicinklinikens databas eller manuellt på mottagningen. På övriga sjukhus

sker första selektion på röntgenkliniken eller fysiologiska laboratoriet. Kvinnor, 18-65 år som genomgår flebografi eller Dopplerultraljud av ben och bäcken, datortomografi av thorax, pulmonalisangiografi eller lungscintigrafi registreras via databas eller genom kopia av radiologisk remiss på avdelningen. Kopior av radiologiska remisser skickas till koordinerande center i Uppsala.

Steg 2 Potentiella fall inkluderas efter granskning av remissutlåtande av forskningsgruppens läkare. Patienter som inkluderas via trombosmottagningar erhåller vid första besöket på mottagningen skriftlig information om att en trombosstudie pågår. Patienter som inkluderas via röntgenkliniken eller fysiologiska laboratoriet erhåller denna information i samband med undersökningen.

Steg 3 Brev med information och förfrågan om deltagande i studien skickas till patienten. Av informationen framgår att deltagandet är frivilligt, innebär en telefonintervju samt provtagning för genetiska analyser.

Steg 4 Telefonkontakt med patienten. Muntlig förfrågan om deltagande, information om studien och tidbokning av telefonintervju.

Steg 5 Formulär för skriftligt samtycke, katalog på aktuella p-piller och hormonpreparat, livstidskalender samt material för provtagning skickas till patienten. Katalog och livstidskalender används som förberedelse inför och minneshjälp under intervjun.

Steg 6 Telefonintervju av patienten. Intervjun utförs av medicinsk personal från koordinerande center i Uppsala. Skriftligt samtycke returneras till koordinerande center i Uppsala.

Steg 7 Provtagning sker på trombosmottagningen, vårdcentralen eller hos distriktssköterska. Provet skickas till Läkemiddelsverkets laboratorium (biobank 1).

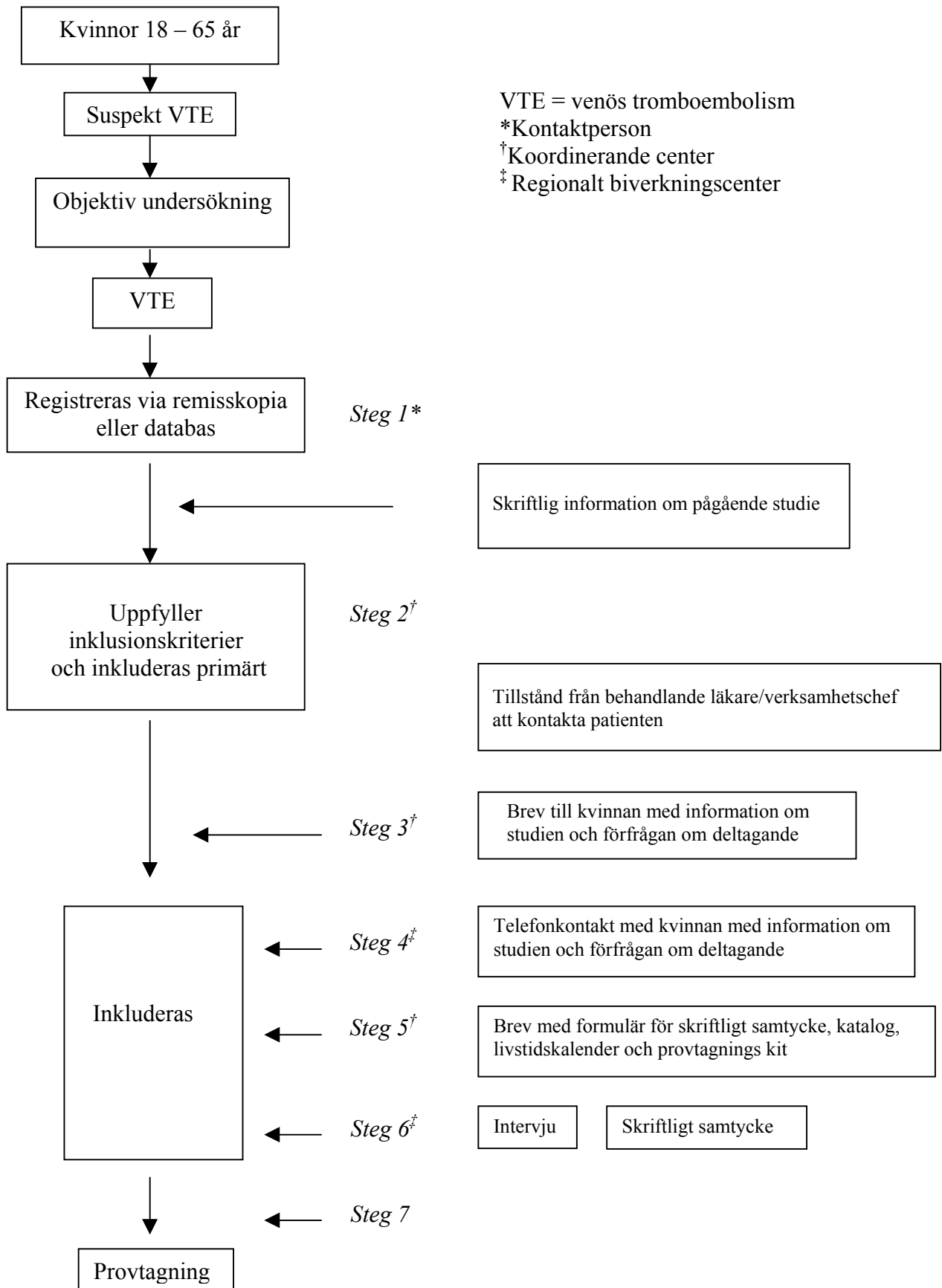
Selektion av kontroller

Kontrollerna utväljs slumpvis från Riksskatteverkets register och genomgår steg 3-7 enligt Fig 1

Tillstånd

Tillstånd att granska utskrift från databas, annan registrering och radiologiska remisser inhämtas från verksamhetscheferna på de berörda kliniker. Tillstånd att kontakta patienter för förfrågan om deltagande i studien inhämtas från verksamhetschefen på respektive klinik om patienten sjukhusvårdas vid trombosinsjuknandet. För polikliniskt vårdade patienter inhämtas tillstånd från patientansvarig läkare (inremitterande eller behandlande läkare).

Fig. 1 Flödesschema för inklusion av fall



Datainsamling

Registrering av potentiella studiedeltagare görs av kontaktperson på sjukhusavdelning genom att skicka remissutlåtande från den radiologiska undersökningen som verifierade blodproppdiagnosen till koordinerande center i Uppsala. Om kvinnan uppfyller inklusionskriterierna inkluderas hon som fall efter att ha godkänt deltagande. I en telefonintervju ingår frågor om tidigare och aktuella sjukdomar, medicinering, livsstil och händelser kring insjuknandet. Särskilt penetreras den gynekologiska och obstetriska bakgrunden. Kvinnorna som ingår som kontroller i studien registreras på samma sätt som fallen. Ett urval av flebografiundersökningarna kommer i efterhand att granskas av radiologisk expertis.

Genetiska analyser

På Läkemiddelsverkets laboratorium (biobank 1) prepareras DNA från 7 ml helblod (enligt standardmetod). Fortsatta analyser utföras på KTH (biobank 2). Target-gener amplifieras med PCR. Provpreparering (generering av enkelsträngsDNA) sker med hjälp av robot. Genotypning görs därefter med Pyrosequencing⁸. Resultaten av de genetiska analyserna införs i dataprogrammet.

Power och statistiska analyser

Vi förutsätter en signifikansnivå på 5% (dubbelsidig), power på 80% och en incidens av trombos av 1/1000. Genom att inkludera 1500 fall respektive kontroller kan för riskfaktorer med en lägste prevalens på 1,6% en relativ riskökning på minst 2 upptäckas.

Den samverkande effekten på trombosutfall av olika kombinationer av två till tre samtidiga riskfaktorer analyseras med multipel logistisk regression där samtliga riskfaktorer ingår som oberoende variabler. För riskfaktorer där interaktionen mellan faktorerna aldrig tidigare har studerats och där multipla faktorer förekommer samtidigt kompletteras regressionsanalyserna med den nya biostatistiska metoden neurala nätverk.

Tidsplan

2001 ansökas om forskningsmedel och tillstånd från Forsknings etiska kommittéer. Tillstånd beträffande datatillgång kommer att inhämtas från chefsläkare och verksamhetschefer. Studien har genom Läkemiddelsverket ett vist forskningsstöd vid planeringen under hösten 2001 och våren 2002. En pilotstudie genomfördes under år 2002. Syftet med pilotstudien var främst att testa intervjuformuläret och modellerna för identifikation av fall. Totalt inkluderades 178 fall från 14 sjukhus och 18 kontroller. Huvudstudien påbörjades januari 2003. Intervjuar och provtagning av fall och kontroller pågår fortlöpande under studieperioden som beräknas fortgå till 2005 12 31. Analyser och manuskript beräknas slutföras under andra halvåret 2007.

Betydelse

En majoritet av yngre kvinnor använder p-piller och en ökande andel medelålders och äldre kvinnor använder hormonpreparat för klimakteriebesvär. Ett preventivmedels skyddande effekt mot oönskade graviditeter och de positiva effekterna av hormonbehandling måste vägas mot risker för komplikationer. Trombos är en allvarlig komplikation till hormonbehandling. Genom vår studie kan vi kartlägga olika riskfaktorers betydelse för trombos. Studien kan göra det möjligt att identifiera kvinnor med ökad risk för trombos. Ändamålet är att kunna ge individuell rådgivning beträffande risk för trombos. Kvinnor med flera riskfaktorer och hög risk för trombos bör föreslå alternativa metoder till hormonpreparat och kvinnor utan riskfaktorer för trombos informeras om den låga risken att drabbas av trombos.

Referenser

1. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353:1167-73.
2. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000; 95:1517-32.
3. Lensing AW, Prandoni P, Prins MH, Buller HR. Deep-vein thrombosis. *Lancet* 1999; 353:479-85.
4. Skegg DCG. Third generation oral contraceptives. *BMJ* 2000; 321:190-191.
5. Grady D, Wenger NK, Herrington D, et al. Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic disease. The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Ann Intern Med* 2000; 132:689-96.
6. Reiner A, Siscovick D, Rosendaal FR. Hemostatic risk factors and arterial thrombotic disease. *Thrombosis Haemostasis* 2001; 85:584-95.
7. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999; 82:610-9.
8. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 1998; 281:363, 365.