

การส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการในผู้ป่วย Thrombophilia

พนัสยา เกียรติธาดากุล พ.บ.*

คำว่า "Thrombophilia" เริ่มใช้ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1965 โดย Egeberg ได้ทำการศึกษาระบบการแข็งตัวของเลือดในครอบครัวชาวสวีเดนคนหนึ่ง ซึ่งมีอุบัติการณ์ของการเกิด venous thromboembolism สูงมาก และพบว่าเกิดจากการขาด antithrombin III (ปัจจุบันเรียก antithrombin)¹ ต่อมามีการใช้คำนี้เรียกภาวะที่มีความผิดปกติในระบบการห้ามเลือด (hemostasis) ที่ทำให้มีแนวโน้มในการเกิดหลอดเลือดอุดตันได้ง่ายทั้งที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (hereditary) หรือเป็นมาภายหลัง (acquired)² ซึ่งภายหลังมีการให้นิยามของ "Thrombophilia" อย่างกว้าง ๆ ว่าเป็น "แนวโน้มที่จะทำให้เกิดหลอดเลือดอุดตัน" โดยมักใช้คำนี้ในผู้ป่วยที่มีลักษณะของการเกิดหลอดเลือดอุดตันดังต่อไปนี้คือ 1) มีอาการเมื่ออายุน้อย 2) เกิดซ้ำ 3) มีประวัติในครอบครัว 4) เกิดขึ้นบริเวณที่พบได้ไม่บ่อยหรือตำแหน่งที่อุดตันมีขอบเขตกว้าง 5) ความรุนแรงไม่ได้สัดส่วนกับปัจจัยที่มากกระตุ้น³ ซึ่งนิยามนี้ครอบคลุมสาเหตุอื่นที่นอกเหนือไปจากความผิดปกติในระบบการห้ามเลือด เช่น ภาวะที่มีสาร homocysteine ในเลือดสูง (hyperhomocysteinemia), antiphospholipid syndrome เป็นต้น

สาเหตุของภาวะ thrombophilia ถือเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดหลอดเลือดอุดตัน ซึ่งการวินิจฉัยความผิดปกติดังกล่าวต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นส่วนสำคัญ ในปัจจุบันปัจจัยเสี่ยงที่สามารถตรวจได้โดยห้องปฏิบัติการมีมากขึ้น แต่ปัญหาคือการทดสอบ

มีราคาแพง และยังมีการขาดความเข้าใจในการส่งตรวจ⁴⁻⁶ นับตั้งแต่การทราบข้อบ่งชี้ในการทดสอบ เพื่อใช้ในการเลือกผู้ป่วยที่สมควรได้รับการส่งตรวจ การเลือกชนิดการทดสอบและเวลาที่เหมาะสมสำหรับการส่ง รวมไปถึงความรู้ในเรื่องปัจจัยที่อาจมีผลกระทบต่อผลการทดสอบ เพื่อที่จะสามารถแปลผลและนำไปใช้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้การนำผลการศึกษาจากต่างประเทศมาใช้ในคนไทยจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลและการพิจารณาอย่างรอบคอบ เพราะมีความแตกต่างในด้านเชื้อชาติของบางปัจจัยเสี่ยง ทั้งนี้เพื่อที่จะสามารถใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพและคุ้มค่ามากที่สุด

เนื้อหาของบทความนี้ประกอบด้วยบทบทวนกลไกการเกิดหลอดเลือดอุดตันที่มีความแตกต่างกันระหว่างหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดง ความผิดปกติที่ทำให้เกิดภาวะ thrombophilia แนวทางในการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ และข้อควรคำนึงในการแปลผล

ความแตกต่างระหว่างการเกิดหลอดเลือดดำอุดตันและหลอดเลือดแดงอุดตัน^{7,8}

สาเหตุที่ทำให้เกิดหลอดเลือดอุดตันอาจแบ่งได้เป็น 3 ประการตามสมมุติฐานของ Virchow (1860) ได้แก่ ความผิดปกติของหลอดเลือด ระบบไหลเวียน และส่วนประกอบของเลือด (hypercoagulability) ทั้งสามนี้อาจมีส่วนส่งเสริมกันหรือมีความสำคัญไม่เท่ากัน

*ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร 10700.

โดยปัจจัยสำคัญในการเกิดหลอดเลือดแดงอุดตันคือ ความผิดปกติของหลอดเลือด เช่น atherosclerosis และ เกร็ดเลือด รวมทั้งการไหลเวียนของเลือดที่เร็วขึ้น ในขณะที่การไหลเวียนที่ช้าลง (stasis) และความผิดปกติของระบบการแข็งตัวของเลือด (coagulation) เป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดหลอดเลือดดำอุดตัน โดยที่ระบบการแข็งตัวของเลือดที่ดำเนินไปตามปกติเป็นความสมดุลของปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (coagulation factor) และปัจจัยต้านการแข็งตัวของเลือด (inhibitor) และระบบสลายลิ่มเลือด (fibrinolysis) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้มีการเกิดลิ่มเลือดมากเกินไป ความผิดปกติที่ทำให้เกิดการเสียสมดุลในระบบเหล่านี้ อันได้แก่ การเพิ่มขึ้นของปัจจัยการแข็งตัวของเลือด การขาดปัจจัยต้านการ

แข็งตัวของเลือดหรือปัจจัยต้านการแข็งตัวของเลือดไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ และความผิดปกติในการสลายลิ่มเลือด มักมีผลทำให้เกิดหลอดเลือดดำอุดตันดังกล่าว

Thrombophilia กับ การเกิดหลอดเลือดดำอุดตัน

ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดดำอุดตันที่สามารถตรวจได้ทางห้องปฏิบัติการอาจแบ่งออกเป็นสาเหตุที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (inherited) ชนิดที่เป็นมาภายหลัง (acquired) และความผิดปกติที่อาจเกิดได้จากทั้งสองประการ (ตารางที่ 1)⁹ ในที่นี้จะอธิบายรายละเอียดของความผิดปกติที่สำคัญดังนี้

ตารางที่ 1. ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดหลอดเลือดดำอุดตันที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม (inherited) ชนิดที่เป็นมาภายหลัง (acquired) และความผิดปกติเกิดได้จากทั้งสองแบบ (mixed)

Inherited	Acquired	Mixed
AT deficiency	Antiphospholipid syndrome	Hyperhomocysteinemia
PC deficiency	Myeloproliferative disorders	Increased factor VIII level
PS deficiency		Increased fibrinogen level
Factor V Leiden		Increased factor XI level
Factor II G20210A		Increased factor IX level

Antithrombin

AT เป็น serine protease inhibitor ที่สร้างจากตับ ทำหน้าที่ยับยั้ง thrombin, factor Xa และยังมีผลต่อ factor VIIa ที่จับกับ tissue factor¹⁰ โครงสร้างของ AT ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 2 ส่วนคือ ส่วนที่จับกับ heparin (heparin-binding domain) และส่วนที่จับกับ thrombin (thrombin-binding domain) สามารถแบ่งชนิดของความผิดปกติของ AT ได้เป็น ความผิดปกติในด้านปริมาณ (quantitative-Type I) ซึ่งจะมีการต่ำลงของ

ระดับ AT ทั้งในด้านปริมาณและการออกฤทธิ์ (activity) โดย AT ที่ตรวจพบมีโครงสร้างที่ปกติ และความผิดปกติในด้านคุณภาพ (qualitative-Type II) โดยที่ความผิดปกติเกิดขึ้นที่ binding site การตรวจหาระดับ activity โดยการทดสอบที่เรียกว่า heparin cofactor activity assay จะพบว่าต่ำลงในความผิดปกติทั้งสองชนิด จึงควรนำมาใช้ในการคัดกรองเบื้องต้น เพราะจะทำให้ไม่พลาดการวินิจฉัย นอกจากนี้อุบัติการณ์ของ Type II ยังพบได้มากกว่า Type I¹¹

Protein C

PC เป็นโปรตีนที่สร้างจากตับโดยอาศัยวิตามิน K เมื่อถูกกระตุ้นโดย thrombin-thrombomodulin complex บนผิวของเซลล์ endothelium จะเปลี่ยนไปเป็น activated protein C (APC) ซึ่งจะออกฤทธิ์ไปย่อยสลาย factor Va และ VIIIa โดยมี PS เป็น cofactor แบ่งชนิดของความผิดปกติของ PC ได้เป็น 2 ชนิดคือ Type I เป็นชนิดที่มีปริมาณการสร้างน้อยลง และ Type II ซึ่งมีการสร้าง PC ที่ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ แบบหลังนี้พบได้น้อย¹² การส่งตรวจจะแนะนำให้หาในรูป activity เพื่อที่จะครอบคลุมความผิดปกติทั้งสองชนิด

Protein S

PS เป็นโปรตีนที่สร้างจากตับโดยอาศัยวิตามิน K ร้อยละ 60 ของปริมาณทั้งหมดอยู่ในพลาสมาโดยจับกับ C4b-binding protein (C4b-BP) อีกร้อยละ 40 อยู่ในรูปอิสระ (free PS) และเป็นส่วนที่ทำหน้าที่เป็น cofactor ของ APC¹² สามารถแบ่งชนิดของความผิดปกติของ PS ได้เป็น 3 ชนิดคือ Type I ซึ่งมีปริมาณ PS ลดลงทั้งในการตรวจหาปริมาณโดยรวม (total PS) และ free PS รวมทั้ง PS activity ก็ลดลง เป็นไปตามสัดส่วนกัน ใน Type II เป็นความผิดปกติในด้านคุณภาพ ตรวจพบเฉพาะ activity ลดลง และ Type III ที่มีความผิดปกติในการจับกันระหว่าง C4b-BP และ PS โดยจะพบว่าระดับ total PS อยู่ในเกณฑ์ปกติค่อนข้างต่ำ ระดับ free PS และ PS activity ต่ำไปด้วยกัน และระดับ C4b-BP ปกติ ชนิดหลังนี้พบได้มากที่สุด ส่วน Type II พบได้น้อยมาก^{12,13} เป็นเหตุผลที่สามารถใช้ free PS ในการตรวจคัดกรองได้ เพราะการหา PS activity ในบางชนิดของการทดสอบอาจให้ผลต่ำกว่าที่เป็นจริงได้ในกรณีที่ผู้ป่วยมี APC resistance^{14,15}

APC resistance และ Factor V Leiden

ในพลาสมาของคนปกติ เมื่อใส่ APC ลงไปจะทำให้เวลาของ Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) นานขึ้น แต่ในการทดสอบกับพลาสมาของผู้ป่วย

หลอดเลือดดำอุดตันรายหนึ่งที่มีประวัติหลอดเลือดดำอุดตันในครอบครัว พบว่าค่า APTT ไม่นานขึ้นอย่างที่ควรจะเป็น เรียกภาวะนี้ว่า APC resistance¹⁶ ซึ่งเป็นความผิดปกติที่พบได้มากที่สุด chez ผู้ป่วยหลอดเลือดดำอุดตัน^{17,18} ต่อมาพบว่าสาเหตุส่วนใหญ่ของ APC resistance เกิดจากความผิดปกติบนยีนของ factor V¹⁹ โดย G เปลี่ยนไปเป็น A ตำแหน่งเบสที่ 1691 ทำให้เกิด missense mutation เป็น glutamine (Q) แทนที่ arginine (R) ของ codon 506 (FV:R506Q) หรือที่เรียกว่า "factor V Leiden" บริเวณ codon ที่ 506 นี้ เป็นหนึ่งในตำแหน่งที่ APC จะมาย่อยสลาย factor Va เมื่อเกิดผิดปกติไปจึงทำให้ APC ไม่สามารถย่อยสลาย factor Va ได้^{20,21}

มีการค้นพบความผิดปกติของยีน factor V บริเวณตำแหน่งอื่นที่ APC มาย่อยสลาย ได้แก่ factor V Hong-Kong (FV:R306G)²² แต่อาจจะไม่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดอุดตัน และ factor V Cambridge (FV:R306T) ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไปว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงหรือไม่²³

สาเหตุที่เป็นมาภายหลัง (acquired) ที่ทำให้เกิด APC resistance ได้แก่ การรับประทานยาคุมกำเนิด²⁴ การตั้งครรภ์¹² เป็นต้น

Prothrombin G20210A

การเกิด mutation โดยที่เบส G มาแทนที่ A ที่ตำแหน่ง 20210 ใน 3'- untranslated region ของยีน prothrombin ทำให้มีปริมาณ prothrombin ในพลาสมามากขึ้นและเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดหลอดเลือดอุดตัน²⁵

Dysfibrinogenaemia

ภาวะที่มีโครงสร้าง fibrinogen ผิดปกติ (dysfibrinogenaemia) ส่วนใหญ่เกิดจากความผิดปกติที่ถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ และส่วนน้อยเกิดจากโรคตับ ซึ่งเป็นสาเหตุที่เกิดมาภายหลัง ประมาณร้อยละ 55 ของผู้ที่มียีนของความผิดปกตินี้ไม่มีอาการ ร้อยละ 25 มีเลือดออกผิดปกติ ที่เหลืออีกร้อยละ 20 มีหลอดเลือดอุดตัน

ซึ่งกลไกของการเกิดหลอดเลือดอุดตัน อาจเกิดจาก fibrinogen ที่ผิดปกติทำให้เกิดลิ่มเลือดที่ทนต่อการย่อยสลายโดย plasmin หรืออีกกลไกหนึ่งโดย fibrinogen นั้นจับกับ thrombin ได้ไม่ดี ทำให้ระดับของ thrombin ในเลือดสูงขึ้น²⁶

ความผิดปกติอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสลายลิ่มเลือดนั้น ไม่แนะนำให้สังเกต เช่น การหาระดับ tissue plasminogen activator (t-PA) และ tissue plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-I) เนื่องจากพบว่าผิดปกติได้แต่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยงโดยตรง^{27,28}

Hyperhomocysteinemia

Homocysteine เป็นกรดอะมิโนที่มี sulfur เป็นส่วนประกอบจำนวนมาก เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของ methionine ซึ่งมีเอนไซม์หลายชนิดและวิตามิน B6, B12, folate เข้ามาเกี่ยวข้องในการรักษาสสมดุลของการเปลี่ยนแปลงระหว่าง methionine กับ homocysteine และการเปลี่ยน homocysteine จนกลายเป็น sulfate ซึ่งจะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ²⁹

ระดับของ homocysteine ที่สูงกว่าปกติ (hyperhomocysteinemia) เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดหลอดเลือดอุดตันทั้งหลอดเลือดแดง²⁹ และหลอดเลือดดำ³⁰ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะนี้อาจเป็นจากความผิดปกติที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม เช่น ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), Cystathione-β-synthase (CBS) ผิดปกติ หรือเป็นจากสาเหตุที่เกิดขึ้นมาภายหลัง เช่น การขาดวิตามิน B6, B12, folate และในภาวะไตวายเรื้อรัง เป็นต้น²⁹ การตรวจหาระดับ homocysteine จึงมีประโยชน์ในการประเมินปัจจัยเสี่ยง และการรักษาที่ทำให้ระดับของ homocysteine ลดลง เช่น การให้ folate อาจมีประโยชน์ต่อผู้ป่วย ซึ่งเป็นเรื่องที่ต้องการศึกษาเพิ่มเติม³¹ ส่วนการตรวจหายีนที่ผิดปกติของเอนไซม์ MTHFR และ CBS นั้น ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดหลอดเลือดอุดตัน^{32,33} ปัจจุบันจึงไม่

แนะนำให้ตรวจ

Antiphospholipid Syndrome (APS)³⁴

การวินิจฉัย APS ตาม International Consensus Statement on Preliminary Criteria for the Classification of the Antiphospholipid Syndrome อาศัยอาการทางคลินิกอย่างน้อยหนึ่งอย่าง และการตรวจพบ antiphospholipid antibody

อาการทางคลินิกประกอบด้วย ภาวะหลอดเลือดอุดตัน ซึ่งเป็นหลอดเลือดแดง หรือหลอดเลือดดำ หรือหลอดเลือดขนาดเล็กก็ได้ และภาวะแทรกซ้อนทางสูติกรรม ได้แก่ การแท้งซ้ำ การคลอดก่อนกำหนด เด็กตายในครรภ์ โดยไม่มีสาเหตุอื่นที่ชัดเจน (รายละเอียดของจำนวนครั้งหรือช่วงเวลาไม่กล่าวในที่นี้)

Antiphospholipid antibody ประกอบด้วย lupus anticoagulant และ anticardiolipin ชนิด IgG หรือ IgM ในระดับปานกลาง (moderate) หรือสูง (high titer) การตรวจพบแอนติบอดีชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งสองชนิดช่วยในการวินิจฉัย ทั้งนี้ต้องให้ผลลบอย่างน้อยสองครั้งในเวลาที่ห่างกันอย่างน้อย 6 สัปดาห์

ระดับของความเสี่ยงและอุบัติการณ์

ความผิดปกติดังที่กล่าวมามีระดับของความเสี่ยงในการเกิดหลอดเลือดอุดตันแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2¹¹ ภาวะการขาด AT มีความเสี่ยงมากที่สุด ความชุก (prevalence) ของความผิดปกติในผู้ป่วยที่มีหลอดเลือดดำอุดตันได้แสดงไว้ในตารางที่ 3^{9,35,36} ทั้งนี้เป็นข้อมูลของชาวตะวันตก

ความชุกในคนไทย สำหรับการขาด AT, PC, PS ไม่มีรายงาน จากข้อมูลของชาวตะวันตกความผิดปกติทั้งสามรวมกันประมาณร้อยละ 5-13 ซึ่งนับว่าพบได้น้อย

ความชุกของ factor V Leiden และ Prothrombin G20210A มีความแตกต่างในด้านเชื้อชาติ โดยส่วนใหญ่พบในชนผิวขาว^{37,38} การศึกษาในผู้ป่วยจีนที่มีภาวะ

ตารางที่ 2. ระดับความเสี่ยง (relative risk) ในการเกิดหลอดเลือดดำอุดตันของความผิดปกติต่าง ๆ

ปัจจัยเสี่ยง	ระดับความเสี่ยง
AT deficiency	25-50
PC deficiency	10-15
PS deficiency	2
Factor V Leiden	3-8(heterozygote) , 80(homozygote)
Factor II G20210A	3
Hyperhomocysteinemia	2.5-4 (ขึ้นกับระดับ homocysteine)

ตารางที่ 3. ความชุก (prevalence) ของความผิดปกติที่เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดหลอดเลือดดำอุดตัน

ปัจจัยเสี่ยง	ประชากรทั่วไป (ร้อยละ)	ผู้ป่วยหลอดเลือดดำอุดตัน (ร้อยละ)
AT deficiency	0.02	1-3
PC deficiency	0.02-0.4	3-5
PS deficiency	0.03-0.13	1-5
Factor V Leiden	1-5	10-50
Factor II G20210A	2-5	6-18
Hyperhomocysteinemia	โดยเฉลี่ย 5	โดยเฉลี่ย 10
Antiphospholipid antibody	2	LA 14, ACL 14*

* LA: lupus anticoagulant, ACL: anticardiolipin antibody

หลอดเลือดในปอดอุดตัน (pulmonary thromboembolism) 90 ราย เทียบกับกลุ่มคนปกติ 143 คน ไม่พบ factor V Leiden หรือ Prothrombin G20210A เลยทั้งสองกลุ่ม³³ ในคนไทยมีการศึกษาประชากร 500 คน และผู้ป่วยที่มีหลอดเลือดดำอุดตัน (deep vein thrombosis) 50 ราย พบว่าในกลุ่มคนปกติมี factor V Leiden 1 ราย (ร้อยละ 0.2) และ Prothrombin G20210A 1 ราย (ร้อยละ 0.2) ส่วนในผู้ป่วยไม่พบเลย³⁹ แต่มีรายงานผู้ป่วยไทยที่มีหลอดเลือดดำอุดตัน 27 ราย โดยทำการทดสอบหา APC resistance ร่วมด้วย พบว่า ในผู้ป่วยที่มี APC resistance 13 ราย ตรวจพบ factor V Leiden 2 ราย และอีก 14 รายที่ไม่มี APC resistance พบ factor V

Leiden 1 ราย ในการศึกษาเดียวกันนี้ไม่พบความผิดปกติของ factor V Leiden เลยในคนปกติ 200 ราย⁴⁰

การศึกษาระดับของ homocysteine ในคนไทย โดยทำการตรวจในพนักงานบริษัทแห่งหนึ่ง ประกอบด้วยเพศชาย 1,133 คน และหญิง 2,212 คน เมื่อใช้ระดับ homocysteine ที่มากกว่า 12 $\mu\text{mol/L}$ เป็นจุดตัด พบว่า ร้อยละ 33.6 ของผู้ชาย และร้อยละ 6.69 ของหญิง มีระดับ homocysteine ที่สูงกว่าปกติ⁴¹ แต่ยังไม่มียางานเรื่องความชุกของภาวะ homocysteine ในเลือดสูงในผู้ป่วยไทยที่มีหลอดเลือดดำอุดตัน ในต่างประเทศมีการศึกษาในผู้ป่วยหลอดเลือดดำอุดตันและคนปกติกลุ่มละ 269 คน พบว่าระดับของ homocysteine ที่เกิน

95th percentile (18.5 $\mu\text{mol/L}$) จะมีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดดำอุดตันคิดเป็น 2.5 เท่า และเมื่อใช้จุดตัดในระดับที่สูงขึ้น (21.1 $\mu\text{mol/L}$) อัตราเสี่ยงก็สูงขึ้นเป็น 4 เท่า³⁰ ดังนั้นในการวิจัยเกี่ยวกับภาวะ homocysteine ในเลือดสูง การเลือกจุดตัดมีส่วนสำคัญต่อความชุกและระดับความเสี่ยง

แนวทางในการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการในผู้ป่วยหลอดเลือดดำอุดตัน

ในการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ เริ่มจากประวัติและการตรวจร่างกายเป็นสำคัญ เพื่อที่จะหาแนวทางในการวินิจฉัยแยกโรคว่าสาเหตุของหลอดเลือดอุดตันนั้นเป็นจากพันธุกรรมหรือเป็นมาภายหลัง ในรายที่พบสาเหตุเช่น มะเร็ง, myeloproliferative disorders, nephrotic syndrome ก็ไม่จำเป็นต้องส่งตรวจหาสาเหตุทางพันธุกรรม^{4,5,42} และเป็นที่ทราบกันว่าผู้ป่วยที่เป็นโรค มะเร็งอาจมาพบแพทย์ด้วยเรื่องของหลอดเลือดดำอุดตันเป็นอาการนำ โดยที่ยังไม่ได้รับการวินิจฉัยโรคมะเร็งนั้น ๆ ชนิดของมะเร็งที่พบได้บ่อยคือ มะเร็งของตับอ่อน รังไข่ และตับ⁴³ จึงควรตระหนักไว้เสมอ ควรตรวจร่างกายให้ละเอียด เช่น ทำการตรวจภายใน (per vagina examination) ในผู้ป่วยหญิง แต่การสืบค้นอย่างละเอียดและมีราคาแพง เช่น computed tomographic scanning ไม่แนะนำให้ทำ เนื่องจากไม่มีหลักฐานว่าการวินิจฉัยที่เร็วขึ้นจะช่วยยืดอายุของผู้ป่วยให้นานขึ้น⁴⁴ ปัจจัยเสี่ยงอื่นที่ควรคำนึงถึงเช่น การใช้ยาคุมกำเนิด การเกิดหลอดเลือดอุดตันก่อนหน้านั้น ประวัติในครอบครัว เป็นต้น ส่วนปัจจัยเสี่ยงในเด็กที่สำคัญได้แก่ การใส่สายในหลอดเลือด (central venous line) หรือโรคอื่นที่เป็นอยู่เช่น การเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphoblastic leukemia และได้รับยา L-asparaginase ซึ่งการตรวจหาปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมในผู้ป่วยเด็กเหล่านี้ไม่น่าจะมีความจำเป็น^{45,46}

ทำไมจึงต้องตรวจหาปัจจัยเสี่ยง

หลักการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปคือผลการตรวจนั้นมีประโยชน์ในการเปลี่ยนแปลงการตัดสินใจในการรักษา หรือดูแลผู้ป่วย ในขณะที่ผู้ป่วยกำลังเกิดหลอดเลือดอุดตัน (acute thrombosis) การตรวจหาปัจจัยเสี่ยงไม่มีความจำเป็น เพราะการรักษาไม่แตกต่างกัน^{4,5,11,38,47} ยกเว้นกรณีการหาระดับ AT หรือ PC เพื่อที่จะใช้ตัดสินใจในการให้ AT concentrate, PC concentrate ทดแทน (replacement therapy)⁴⁸

สำหรับประโยชน์ที่จะใช้ในการพิจารณาระยะเวลาของการให้ยาต้านเลือดแข็งเพื่อป้องกันการเกิดซ้ำ (secondary prevention) ยังไม่มีข้อตกลงที่ชัดเจนว่าในรายที่มีความผิดปกติชนิดที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมจะต้องให้นานกว่าผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบความผิดปกติหรือไม่^{5,11,49} มีคำแนะนำสำหรับผู้ป่วยที่เป็น factor V Leiden และ prothrombin G20210A heterozygote ว่าไม่ได้เป็นตัวกำหนดในการตัดสินใจในเรื่องของระยะเวลาของการให้ยาต้านเลือดแข็ง^{11,49} แต่มีรายงานที่เสนอแนะว่าควรให้ยานานขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นพาหะของ factor V Leiden ที่เกิดอาการโดยไม่มีสาเหตุที่มากระตุ้นและให้ความร่วมมืออย่างดีในการควบคุมยาต้านเลือดแข็ง⁵⁰ สำหรับความผิดปกติของ coagulation inhibitor มีรายงานว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดหลอดเลือดอุดตันซ้ำ (hazard ratio, 1.44 [CI, 1.02-2.01]) และยังพบว่าการมีโรคมะเร็งร่วมด้วยก็เสี่ยงต่อการเกิดซ้ำเช่นกัน (hazard ratio, 1.72 [CI, 1.31-2.25]) ในขณะที่ผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบความผิดปกติและเกิดหลอดเลือดอุดตันครั้งแรกเมื่อมีปัจจัยเสี่ยงที่เป็นชั่วคราว เช่น การผ่าตัด การได้รับบาดเจ็บที่รุนแรง มีโอกาสเกิดซ้ำน้อยลง (hazard ratio, 0.36 [CI, 0.21-0.62]) การตรวจหาความผิดปกติเหล่านี้จึงน่าจะประโยชน์ในการใช้ประกอบการตัดสินใจในการรักษา⁵¹ ในผู้ป่วยทั่วไปที่ไม่พบปัจจัยเสี่ยงมักจะให้ยาต้านเลือดแข็ง เป็นเวลา 3-6 เดือน แต่ในผู้ป่วย AT, PC, PS heterozygote อาจให้นานขึ้นเป็น 1-3 ปี

อย่างไรก็ตามการตัดสินใจในการรักษาขึ้นอยู่กับผู้ป่วยเป็นราย ๆ ไป มีปัจจัยหลายอย่างที่ต้องคำนึงถึง เช่น อายุ ความรุนแรงของการเกิดหลอดเลือดอุดตันครั้งแรก และโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดเลือดออกเมื่อได้รับยาต้านเลือดแข็ง เป็นต้น^{52,53}

ประโยชน์ของการตรวจหาปัจจัยเสี่ยงทางพันธุกรรมในญาติของผู้ป่วยอาจมีประโยชน์ในด้านการป้องกันแบบปฐมภูมิ (primary prevention) เพราะการถ่ายทอดความผิดปกติส่วนใหญ่เป็นแบบ autosomal dominant ญาติของผู้ป่วยที่ตรวจพบความผิดปกติ ควรได้รับคำแนะนำในเรื่องของการหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงอื่น เช่น การรับประทานยาคุมกำเนิด และอาจต้องมีการพิจารณาในเรื่องการได้รับยาต้านเลือดแข็งเมื่อมีโอกาสเสี่ยงเพิ่มขึ้น เช่น การผ่าตัด โดยไม่จำเป็นต้องให้ยาต้านเลือดแข็งในระยะยาว^{54,55} อย่างไรก็ตามการประเมินประโยชน์ในด้านนี้ยังแท้จริงเมื่อเทียบกับโอกาสเกิดปัญหาอื่น ๆ ที่อาจเกิดตามมา เช่น ความเข้าใจข้อมูลที่ผิดพลาด ความวิตกกังวลที่มากเกินไป นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบความผิดปกติก็อาจมีความผิดปกติอื่นแฝงอยู่ที่ยังตรวจไม่ได้ในขณะนี้⁴⁹

ใครควรได้รับการส่งตรวจและควรส่งตรวจอะไร

ผู้ป่วยหลอดเลือดอุดตันควรได้รับการตรวจพื้นฐานได้แก่ complete blood count (CBC) เพื่อวินิจฉัยแยกโรค myeloproliferative disorders^{11,38} และส่งตรวจ screening coagulogram ผล APTT อาจพบว่ นานกว่าปกติในรายที่มี lupus anticoagulant (LA) แต่ถ้าปกติก็ไม่ได้หมายความว่าไม่มี LA ต้องส่งตรวจเพิ่มเติม ค่า prothrombin time (PT) ช่วยในการประเมินผลร่วมกับผลการตรวจ PC, PS ซึ่งสร้างจากตับโดยอาศัยวิตามิน K ถ้า PT นานผิดปกติต้องนำมาคำนึงถึงว่าจะมีสาเหตุที่ทำให้ PC, PS ต่ำจากสาเหตุที่เป็นมาภายหลังหรือไม่ เช่น โรคตับและการขาดวิตามิน K^{4,38} ในห้องปฏิบัติการที่ทำ Thrombin time (TT) อาจพบว่ นานหรือ

เร็วผิดปกติได้ในกรณีของ dysfibrinogenaemia โดยส่วนใหญ่ของผู้ป่วยที่มีความผิดปกตินี้จะมี PT, APTT และ TT นานกว่าปกติ แต่ TT มีความไวมากที่สุด²⁶

การตรวจทางพันธุกรรมที่มีหลักฐาน (evidence-based) ที่แน่ชัดในการเป็นปัจจัยเสี่ยงของหลอดเลือดอุดตันคือ AT, PC, PS, factor V Leiden, Prothrombin G20210A, homocysteine, dysfibrinogenaemia⁴⁸ แต่ไม่จำเป็นต้องตรวจการทดสอบเหล่านี้ทั้งหมดในผู้ป่วยทุกราย คำแนะนำในการเลือกการทดสอบที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยมีดังนี้

ผู้ป่วยที่ไม่ทราบสาเหตุของหลอดเลือดอุดตัน หลังจากทำการสืบค้นเบื้องต้นแล้ว ควรได้รับการส่งตรวจในขั้นตอนแรกคือ^{38,42}

1. Functional assay for APC resistance หรือ DNA analysis for factor V Leiden
2. DNA for prothrombin gene mutation
3. Homocysteine level
4. Antiphospholipid antibody

บางห้องปฏิบัติการ ไม่ทำการตรวจดังกล่าวในผู้ป่วยที่อายุมากกว่า 70 ปี⁴ และมีการศึกษาพบว่า APC resistance ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยงในผู้ที่อายุเกิน 70 ปี⁵⁶ แต่ภาวะ homocysteine ในเลือดสูง พบเป็นปัจจัยเสี่ยงได้บ่อยขึ้นตามอายุ ซึ่งอาจเป็นเพราะการรับประทานผักน้อยลงในคนสูงอายุ⁵⁷

ในผู้ป่วยหลอดเลือดอุดตันที่อายุน้อยกว่า 45 หรือ 50 ปี หรือมีประวัติในครอบครัว หรือเป็นซ้ำ หรือมีหลอดเลือดอุดตันในตำแหน่งที่มักไม่พบการอุดตัน เช่น mesenteric, hepatic, cerebral vein ควรตรวจเพิ่มเติมดังนี้^{38,42,47}

1. Functional assay สำหรับ AT
2. Functional assay สำหรับ PC
3. Functional assay หรือ immunological assay สำหรับ PS

การที่ไม่ควรตรวจหา AT, PC, PS ในผู้ป่วยที่

อายุมากกว่า 50 ปีเนื่องจากอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติเหล่านี้ค่อนข้างน้อย (21 ปี, 24 ปี, 26 ปี ตามลำดับ)⁴ ถึงแม้ว่าอาจจะมีผู้ป่วยบางคนที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยเพราะอายุมากกว่าที่แนะนำ⁵⁸ และมีข้อควรระวังอยู่เสมอว่า ความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดหลอดเลือดอุดตันที่ไม่รุนแรงและเกิดขึ้นเมื่ออายุมากจะไม่ค่อยทำให้มีอาการในญาติของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติแฝงอยู่ จึงมีประโยชน์น้อยในด้านการส่งตรวจเพื่อการป้องกันแบบปฐมภูมิ¹¹

ถ้าการตรวจทั้งสองขั้นตอนให้ผลปกติและยังสงสัยในรายที่มีประวัติในครอบครัวชัดเจนอาจตรวจขั้นตอนต่อไป ได้แก่ thrombin time, reptilase time เพื่อช่วยวินิจฉัย dysfibrinogenaemia การหาระดับ fibrinogen และ factor VIII แต่การตรวจระดับ fibrinogen หรือ factor VIII หรือ coagulation factor อื่น เช่น factor IX, XI ก็ยังไม่มีประโยชน์ในการรักษา³⁸

เนื่องจากคำแนะนำดังกล่าวเป็นของต่างประเทศ การส่งตรวจบางการทดสอบในผู้ป่วยไทย อาจไม่เหมาะสม เช่น การหา factor V Leiden, prothrombin gene mutation

เวลาที่เหมาะสมในการส่งตรวจ

ขณะที่เกิดหลอดเลือดอุดตันเฉียบพลัน ไม่แนะนำให้ส่งตรวจหาระดับ AT, PC, PS เพราะจะมีค่าต่ำได้^{4,5,11,38,47,48} และผู้ที่ได้รับยาคุมกำเนิดชนิดรับประทาน หรือฮอร์โมนควรหยุดยาอย่างน้อย 2 เดือน ผู้ที่ได้รับ heparin ควรหยุดยาก่อนตรวจหาระดับ AT อย่างน้อย 5 วัน³⁸ ส่วนการส่งตรวจ PC, PS ในผู้ที่ได้รับยากันเลือดแข็งชนิดรับประทานควรหยุดยาอย่างน้อย 2 สัปดาห์^{4,5,8} ถึง 4 สัปดาห์^{1,38} เฉพาะการตรวจทางพันธุศาสตร์เท่านั้นที่ได้โดยไม่มีผลกระทบจากปัจจัยที่กล่าวมาและการตรวจอื่นนอกเหนือจากการตรวจทางพันธุศาสตร์ควรตรวจซ้ำ อย่างน้อย 6 สัปดาห์หรือมากกว่าเพื่อลดผลบวกลวง⁵⁹

สิ่งส่งตรวจที่เหมาะสม

ควรทราบว่าการทดสอบนั้นใช้สิ่งส่งตรวจอะไร เช่น AT, PC, PS และ lupus anticoagulant ใช้พลาสมา ส่วน anticardiolipin ใช้ serum ซึ่งอาจเกิดปัญหาได้ถ้าผู้ทำการเจาะเลือดไม่ทราบรายละเอียดสำหรับการตรวจระดับ homocysteine ควรอดอาหารอย่างน้อย 12 ชั่วโมง เจาะเลือดใส่ในหลอดที่มี EDTA เป็นน้ำยากันเลือดแข็ง และใส่น้ำแข็งทันทีเพื่อไม่ให้เกิดการปล่อยของ homocysteine จากเม็ดเลือดแดง โดยปั่นแยกในที่เย็นภายใน 4 ชั่วโมง หรืออาจใช้ acidic citrate แทนเพื่อที่จะสามารถเก็บในอุณหภูมิห้อง⁶⁰

ข้อควรระวังในการแปลผล

การตรวจหา AT, PC, PS และ APC resistance ทางห้องปฏิบัติการควรหาค่าอ้างอิงของตนเอง ปัจจัยที่มีผลต่อระดับของ inhibitor เหล่านี้ ได้แก่ เพศ อายุ และการใช้ฮอร์โมน⁶¹⁻⁶³ แต่ในทางปฏิบัติก็เป็นการยากที่จะหาค่าปกติตามเพศและกลุ่มอายุในแต่ละห้องปฏิบัติการ และผู้ที่ใช้ยาคุมกำเนิดจะมี PS activity ต่ำลง⁶⁴ บางรายงานพบเพียง total PS ที่ต่ำลงขณะที่ free PS ปกติในคนกลุ่มนี้⁶⁵ นอกจากนี้ระดับของไตรกลีเซอไรด์และโคเลสเตอรอล (total cholesterol) ยังมีผลต่อระดับของ PC^{63,66} และ PS⁶⁶ อย่างชัดเจนโดยเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนที่สัมพันธ์กัน โดยที่ทุก 100 mg/dl ของไตรกลีเซอไรด์ที่สูงขึ้นจากค่า mean ระดับ PC activity จะเพิ่มขึ้น 20 IU/dl และทุก 100 mg/dl ของโคเลสเตอรอลที่สูงขึ้นจากค่า mean ระดับ PC จะเพิ่มขึ้น 12 IU/dl⁶³ ระดับไขมันของผู้ที่ได้รับการส่งตรวจจึงเป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึง เพราะผู้ที่เป็น PC deficiency heterozygote แต่มีไขมันดังกล่าวสูงระดับ PC อาจยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ ถ้าใช้ค่าอ้างอิงจากกลุ่มประชากรทั่วไป ระดับของโคเลสเตอรอล (total cholesterol) ยังสัมพันธ์กับระดับ total PS ส่วนไตรกลีเซอไรด์สัมพันธ์กับระดับ free PS⁶⁶

ในการแปลผลตรวจที่ไม่ใช่ทางพันธุศาสตร์ ควรมีความระมัดระวังเพราะมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลกระทบ ซึ่งสาเหตุที่เป็นมาภายหลังที่ทำให้ค่าผิดปกติได้มีดังนี้⁴²

PC, PS และ AT ต่ำลงได้ในเด็กวัยแรกเกิด โรคตับ การติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis), disseminated intravascular coagulation ขณะเกิดหลอดเลือดอุดตัน (acute thrombosis), การได้รับยา L-asparaginase

AT และ PS ต่ำลงในหญิงมีครรภ์ และการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน

PS พบว่าต่ำได้ใน antiphospholipid syndrome⁶⁷ และผู้ป่วยติดเชื้อ HIV โดยมีการศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV มาเป็นระยะเวลานานจำนวน 25 ราย พบว่า 3 รายมีหลอดเลือดอุดตันและมี free PS ต่ำทุกราย และ 16 ใน 22 คน (ร้อยละ 72.7) ที่ไม่มีหลอดเลือดอุดตันก็มี free PS ต่ำ⁶⁸

Thrombophilia กับ การเกิดหลอดเลือดแดงอุดตัน

ไม่แนะนำให้ตรวจ AT, PC, PS และ factor V Leiden รวมทั้ง prothrombin G20210A ในผู้ป่วยที่มีหลอดเลือดแดงอุดตัน^{5,11,42} เนื่องจากอุบัติการณ์ของหลอดเลือดแดงอุดตันในผู้ป่วย AT, PC, PS deficiency ไม่แตกต่างจากประชากรทั่วไป⁵⁸ ถึงแม้มีการศึกษาที่คิดว่า factor V Leiden เป็นปัจจัยเสี่ยงของการมีกล้ามเนื้อหัวใจหรือสมองขาดเลือดจากหลอดเลือดแดงอุดตัน^{69,70} แต่ผลการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มากกว่าไม่พบว่าเป็นเช่นนั้น^{71,72} นอกจากนี้ prothrombin G20210A ยังไม่พบปัจจัยเสี่ยงต่อหลอดเลือดแดงอุดตันในสมอง⁷²

การทดสอบที่แนะนำให้ทำในผู้ป่วยหลอดเลือดแดงอุดตันที่ไม่ทราบสาเหตุได้แก่ การตรวจหา antiphospholipid antibody และระดับ homocysteine^{5,42} อาจจะรวมภาวะ dysfibrinogenaemia ด้วย⁵

สำหรับข้อมูลของคนไทย มีการศึกษาเปรียบเทียบระดับ homocysteine ในคนที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease) 178 ราย กับ คนปกติที่มีอายุและเพศพอ ๆ กัน พบว่าระดับของ homocysteine ในผู้ป่วยสูงกว่าคนปกติ (odds ratio = 1.65, CI 1.09-2.25)⁷³

ในผู้ป่วยหลอดเลือดแดงอุดตันที่มีปัจจัยเสี่ยงชัดเจน เช่น อายุมาก เบาหวาน สูบบุหรี่ ไขมันในเลือดสูง ไม่จำเป็นต้องส่งตรวจการทดสอบดังกล่าว

สรุป

แนวทางในการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ในผู้ป่วยที่มีแนวโน้มในการเกิดหลอดเลือดอุดตันได้ง่าย เริ่มจากการซักประวัติ ตรวจร่างกายและการตรวจทางห้องปฏิบัติการพื้นฐานเพื่อวินิจฉัยแยกสาเหตุที่เป็นมาภายหลัง (acquired) เมื่อยังไม่ทราบปัจจัยเสี่ยงที่ชัดเจน จึงทำการสืบค้นทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม โดยขึ้นกับชนิดว่าเป็นการอุดตันในหลอดเลือดดำหรือหลอดเลือดแดง ทั้งนี้ควรทราบถึงจุดประสงค์ในการส่งตรวจ ความเหมาะสมในการเลือกผู้ป่วยและชนิดของการทดสอบ รวมไปถึงเวลาและสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสม ในการแปลผลการทดสอบที่ไม่ใช่การตรวจทางพันธุศาสตร์ ต้องคำนึงถึงปัจจัยที่สามารถมีผลกระทบและสาเหตุของความผิดปกติเป็นมาภายหลัง ก่อนที่จะสรุปว่าเป็นความผิดปกติทางพันธุกรรม นอกจากนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความคุ้มค่าในการส่งตรวจหาปัจจัยเสี่ยงที่มีความแตกต่างในด้านเชื้อชาติในผู้ป่วยไทยเพื่อประโยชน์สูงสุดแก่ผู้ป่วยและประเทศชาติ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ รศ. พญ. วนิดา วงศ์ศิริพร และ รศ. พญ. นิศาตร์นิ โอภาสเกียรติกุล ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่กรุณาช่วยตรวจสอบแก้ไขต้นฉบับ

REFERENCES

1. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 1965; **13**: 516-30.
2. The British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of thrombophilia. *J Clin Pathol* 1990; **43**: 703-9.
3. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, et al. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996; **76**: 651-62.
4. Adcock DM, Fink L, Marlar RA. A laboratory approach to the evaluation of hereditary hypercoagulability. *Am J Clin Pathol* 1997; **108**: 434-49.
5. Tripodi A, Mannucci PM. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 2001; **47**: 1597-606.
6. Carraro P, Simioni P. Appropriateness of choice and interpretation of tests for thrombophilic defects: a practical experience. *Clinica Chimica Acta*; In Press, Corrected Proof.
7. Rodgers G. Thrombosis and antithrombotic therapy. In: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999: 1781-820.
8. Hirsh J, Colman R, Marder V, George J, Clowes A. Overview of thrombosis and its treatment. In: Colman R, Hirsh J, Marder J, Clowes A, George J, eds. *Haemostasis and Thrombosis. Basic principle & clinical practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1071-84.
9. Franco RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 2001; **109**: 369-84.
10. Rao L, Prapaport S, Hoang A. Binding of factor VIIa to tissue factor permits rapid antithrombin III / heparin inhibition of factor VIIa. *Blood* 1993; **81**: 2600-607.
11. The Haemostasis and Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in Haematology, a subcommittee of the British Society for Haematology. Investigation and management of hereditary thrombophilia. *Br J Haematol* 2001; **114**: 512-28.
12. Kraus M. The anticoagulant potential of the protein C system in hereditary and acquired thrombophilia: pathomechanisms and new tools for assessing its clinical relevance. *Semin Thromb Hemost* 1998; **24**: 337-54.
13. Gouault-Heilmann M, Leroy-Matheron C, Levent M. Inherited protein S deficiency: clinical manifestations and laboratory findings in 63 patients. *Thromb Res* 1994; **76**: 269-79.
14. Faioni EM, Franchi F, Asti D, Sacchi E, Bernardi F, Mannucci PM. Resistance to activated protein C in nine thrombophilic families: interference in a protein S functional assay. *Thromb Haemost* 1993; **70**: 1067-71.
15. Simioni P, Gavasso S, Luni S, Invidiato S, Girolami A. A protein S functional assay yields unsatisfactory results in patients with activated protein C resistance. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; **6**: 286-87.
16. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 1004-8.
17. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993; **82**: 1989-93.
18. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; **342**: 1503-6.
19. 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**: 1396-400.
20. Dahlback B. Resistance to activate protein C, the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene, and venous thrombosis. Functional tests and DNA-based assays, pros and cons. *Thromb Haemost* 1995; **73**: 739-42.
21. Dahlback B. The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb Res* 1995; **77**: 1-43.
22. Chan W, Lee C, Kwong Y, Lam C, Liang R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong-Kong Chinese. *Blood* 1998; **91**: 1135-139.
23. Santacroce R, Bossone A, Brancaccio V, Fortina P, Margaglione M. In the Presence of other inherited or acquired high-risk situations, the FV Cambridge mutation be an additional thrombophilic risk factor, through its effect on APC sensitivity. *Thromb Haemost* 2000; **83**: 963-64.
24. Olivieri O, Friso S, Manzato F, et al. Resistance to activated protein C in healthy women taking oral contraceptives. *Br J Haematol* 1995; **91**: 465-70.
25. Poort S, Rosendaal FR, Reitsma P, Bertina R. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; **88**: 3698-703.
26. Roberts H, Stinchcombe T, Garbie ID. The dysfibrinogenemias. *Br J Haematol* 2001; **114**: 249-57.
27. Malm J, Laurell M, Nilsson I, Dahlback B. Thromboembolic disease- critical evaluation of laboratory investigation. *Thromb Haemost* 1992; **68**: 7-13.

28. Bauer KA. Conventional fibrinolytic assays for the evaluation of patients with venous thrombosis: don't bother. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 377-78.
29. Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001; **81**: 645-72.
30. den Heijer M, Koster T, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996; **334**: 759-62.
31. Boushey C, Beresford S, Omenn G, Motulsky A. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; **274**: 1049-57.
32. Grossmann R, Schwender S, Geisen U, Schambeck C, Merati G, Walter U. CBS 844ins68, MTHFR TT677 and EPCR 4031ins23 genotypes in patients with deep-vein thrombosis. *Thromb Res* 2002; **107**: 13-5.
33. Lu Y, Zhao Y, Liu G, et al. Factor V gene G1691A mutation, prothrombin gene G20210A mutation, and MTHFR gene C677T mutation are not risk factors for pulmonary thromboembolism in Chinese population. *Thromb Res* 2002; **106**: 7-12.
34. Levine J, Branch D, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; **346**: 752-63.
35. Siemens HJ, Gutsche S, Bruckner S, Bucsky P, Katus HA. Antiphospholipid antibodies in children without and in adults with and without thrombophilia. *Thromb Res* 2000; **98**: 241-47.
36. Ginsberg JS, Wells PS, Brill-Edwards P, et al. Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism. *Blood* 1995; **86**: 3685-91.
37. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; **346**: 1133-34.
38. Buchanan GS, Rodgers GM, Ware Branch D. The inherited thrombophilias: genetics, epidemiology, and laboratory evaluation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2003; **17**: 397-411.
39. Angchaisuksiri P, Pingsuthiwong S, Aryuchai K, et al. Prevalence of the G1691A mutation in the factor V gene (factor V Leiden) and the G20210A prothrombin gene mutation in the Thai population. *Am J Hematol* 2000; **65**: 119-22.
40. Prayoonwiwat W, Arnutti P, Hiyoshi M, et al. Detection of factor V Leiden in Thai patients with venous thrombosis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2000; **18**: 105-8.
41. Leowattana W, Bhuripanyo K, Mahanonda N, Pokum S. Prevalence of hyperhomocysteinemia in normal healthy Thai subjects. *J Med Assoc Thai* 2001; **84** (Suppl3): S722-29.
42. Zwicker J, Bauer K. Thrombophilia. In: Kitchens C, Alving B, Kessler C, eds. *Consultative Haemostasis and Thrombosis*. Philadelphia: WB Saunders, 2002: 181-96.
43. Sorensen HT, Mellemkjaer L, Steffensen FH, Olsen JH, Nielsen GL. The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1169-73.
44. Buller H, Cate J. Primary venous thromboembolism and cancer screening. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1221-222.
45. Richardson MW, Allen GA, Monahan PE. Thrombosis in children: current perspective and distinct challenges. *Thromb Haemost* 2002; **88**: 900-11.
46. Massicotte P, Revel-Vilk S. Thromboembolic diseases of childhood. *Blood Reviews* 2003; **17**: 1-6.
47. Federman DG, Kirsner RS. An update on hypercoagulable disorders. *Arch Intern Med* 2001; **161**: 1051-56.
48. Carraro P. Guidelines for the laboratory investigation of inherited thrombophilia. Recommendations for the first level clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2003; **41**: 382-91.
49. Greaves M, Baglin T. Laboratory testing for heritable thrombophilia: impact on clinical management of thrombotic disease annotation. *Br J Haematol* 2000; **109**: 699-703.
50. Marchetti M, Pistorio A, Barosi G. Extended anticoagulant for prevention of recurrent venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 752-57.
51. Prandoni P, Lensing A, Cogo A, Cuppini S, Villalta S, Carta M. The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1996; **125**: 1-7.
52. van den Belt AG, Sanson BJ, Simioni P, et al. Recurrence of venous thromboembolism in patients with familial thrombophilia. *Arch Intern Med* 1997; **157**: 2227-32.
53. van den Belt AG, Hutten BA, Prins MH, Bossuy PM. Duration of oral anticoagulant treatment in patients with venous thromboembolism and a deficiency of antithrombin, protein C or protein S--a decision analysis. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 758-63.
54. Pabinger I, Kyrle P, Heisteringer M, Eichinger S, Wittmann E, Lechner K. The risk of thromboembolism in asymptomatic patients with protein C and protein S deficiency: a prospective cohort study. *Thromb Haemost* 1994; **71**: 441-45.
55. Sanson B, Simioni P, Tormene D, Moia M, Friederich P, Huisman M. The incidence of venous thromboembolism in asymptomatic carriers of a deficiency of antithrombin, protein C, or protein S: A prospective

- Cohort Study. *Blood* 1999; **94**: 3702-706.
56. Oger E, Lacut K, Le Gal G, et al. Is APC resistance a risk factor for venous thromboembolism in patients over 70 years? *Thromb Haemost* 2002; **88**: 587-91.
57. Hainaut P, Jaumotte C, Verhelst D, et al. Hyperhomocysteinemia and venous thromboembolism: a risk factor more prevalent in the elderly and in idiopathic cases. *Thromb Res* 2002; **106**: 121-25.
58. De Stefano V, Leone G, Mastrangelo S, et al. Clinical manifestations and management of inherited thrombophilia: retrospective analysis and follow-up after diagnosis of 238 patients with congenital deficiency of antithrombin III, protein C, protein S. *Thromb Haemost* 1994; **72**: 352-58.
59. Buchanan GS, Rodgers GM, Ware Branch D. The inherited thrombophilias: genetics, epidemiology, and laboratory evaluation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*; In Press, Corrected Proof.
60. Mangoni A, Jackson S. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospective. *Am J Med* 2002; **112**: 556-65.
61. Dolan G, Neal K, Cooper P, Brown P, Preston F. Protein C, antithrombin III and plasminogen: effect of age, sex and blood group. *Br J Haematol* 1994; **86**: 798-803.
62. Henkens CM, Bom VJ, Van der Schaaf W, et al. Plasma levels of protein S, protein C, and factor X: effects of sex, hormonal state and age. *Thromb Haemost* 1995; **74**: 1271-275.
63. Rodeghiero F, Tosetto A. The VITA Project: population-based distributions of protein C, antithrombin III, heparin-cofactor II and plasminogen--relationship with physiological variables and establishment of reference ranges. *Thromb Haemost* 1996; **76**: 226-33.
64. Lowe GD, Rumley A, Woodward M, et al. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the Third Glasgow MONICA Survey. I. Illustrative reference ranges by age; sex and hormone use. *Br J Haematol* 1997; **97**: 775-84.
65. Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, Islam SI, Tait RC. A study of Protein S antigen levels in 3,788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. *Br J Haematol* 2001; **113**: 636-41.
66. MacCallum P, Cooper J, Martin J, Howarth D, Meade T, Miller G. Association of protein C and protein S with lipid concentrations. *Br J Haematol* 1998; **102**: 609-615.
67. Ames PR, Tommasino C, Iannaccone L, Brillante M, Cimino R, Brancaccio V. Coagulation activation and fibrinolytic imbalance in subjects with idiopathic antiphospholipid antibodies--a crucial role for acquired free protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1996; **76**: 190-94.
68. Stahl CP, Wideman CS, Spira TJ, Haff EC, Hixon GJ, Evatt BL. Protein S deficiency in men with long-term human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1993; **81**: 1801-807.
69. Rosendaal FR. High levels of factor VIII and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2000; **83**: 1-2.
70. Eskandari MK, Bontempo FA, Hassett AC, Faruki H, Makaroun MS. Arterial thromboembolic events in patients with the factor V Leiden mutation. *Am J Surg* 1998; **176**: 122-25.
71. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the Gene Coding for Coagulation Factor V and the Risk of Myocardial Infarction, Stroke, and Venous Thrombosis in Apparently Healthy Men. *N Engl J Med* 1995; **332**: 912-17.
72. Voetsch B, Damasceno BP, Camargo EC, et al. Inherited thrombophilia as a risk factor for the development of ischemic stroke in young adults. *Thromb Haemost* 2000; **83**: 229-33.
73. Leowattana W, Mahanonda N, Bhuripunyo K, Pokum S. Association between serum homocysteine, vitamin B12, folate and Thai coronary artery disease patients. *J Med Assoc Thai* 2000; **83**: 536-42.