

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

142345

DENİZLİ İLİNDE SAĞLIKLI KİŞİLERDE  
AKTİVE PROTEİN C DİRENCİ VE  
FAKTÖR V LEİDEN SIKLIĞI

UZMANLIK TEZİ

142345

Dr. SİBEL KABUKÇU HACIOĞLU

DENİZLİ – 2004

İş bu çalışma jürimiz İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI'NDA  
TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**BAŞKAN Prof.Dr.Ali KESKİN**

**ÜYE Prof.Dr. Mustafa KILIÇ**

**ÜYE Prof.Dr.Nadir YÖNETÇİ**

**ÜYE Yrd.Doç.Dr. Mustafa YILMAZ**

**ÜYE Yrd.Doç.Dr. Veli ÇOBANKARA**

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

20.9/2004  
  
DEKAN

## TEŞEKKÜR

Araştırma görevlisi olarak Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda onur ve kıvançla sürdürmekte olduğum görevimi tamamlamak üzereyim. Bizlere bu uzmanlık eğitimi imkanını sağlayan Pamukkale Üniversitesi Rektörü Sayın Hasan Kazdağlı'ya ve Tıp Fakültesi Dekanı sayın Hüseyin Bağcı'ya en derin saygılarımı arz ederim.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda çalıştığım süre içinde en iyi şekilde yetişmemiz için azami derecede gayret ve sabır gösteren Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Ali Keskin'e; diğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Yurdaer Sermez'e, Prof. Dr. Nadir Yönetçi'ye, Doç. Dr. Murat Çolakoğlu'na, Yrd. Doç. Dr. Veli Çobankara'ya, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Yılmaz'a ve Yrd. Doç. Dr. Tufan Türk'e; araştırma yapılırken gösterdikleri yardım ve katkıdan dolayı Pamukkale Üniversitesi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma-Uygulama Merkezi'ndeki öğretim üyesi hocalarım Sayın Doç. Dr. Erol Atalay ile Yrd. Doç. Dr. Ayfer Atalay ve araştırma görevlileri Anzel Bahadır ve Sanem Yıldız'a, Denizli İl Sağlık Müdürlüğü Talasemi Laboratuvarı çalışanlarına, Pamukkale Üniversitesi Hematoloji Laboratuvarı ve Kan Bankası çalışanlarına; çalışmamın akışı içinde bana çeşitli şekillerde yardımcı olan tüm iç hastalıkları uzman ve araştırma görevlisi doktor arkadaşlarıma; ayrıca Halk Sağlığı AD öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali İhsan Bozkurt'a; manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime ve yoğun çalışma tempom içinde her zaman yanımda olarak bana destek olan biricik eşime teşekkür ederim.

Tezimin değerlendirilmesinde emeği geçecek jüri üyesi hocalarıma saygılar sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. HEMOSTAZ.....	3
2.1.1. PIHTILAŞMA FİZYOLOJİSİ.....	3
2.2. PIHTILAŞMANIN KONTROLÜ.....	5
2.2.1. DOĞAL ANTİKOAGÜLANLAR.....	5
2.2.1.1. HEPARAN SÜLFAT-ANTİTROMBİN MEKANİZMASI.....	6
2.2.1.2. PROTEİN C-TROMBOMODULİN-PROTEİN S MEKANİZMASI.....	7
2.2.1.2.1. PROTEİN C (PC).....	7
2.2.1.2.2. TROMBOMODULİN (TM).....	10
2.2.1.2.3. ENDOTELYAL PROTEİN C RESEPTÖRÜ (EPCR).....	11
2.2.1.2.4. PROTEİN S (PS).....	12
2.2.1.3. DOKU FAKTÖRÜ YOLU İNHİBİTÖRÜ (TISSUE FACTOR PATHWAY İNHİBİTOR: TFPI).....	12
2.2.2. FİBRİNOLİTİK SİSTEM.....	13
2.3. TROMBOZ.....	13
2.4. TROMBOZA EĞİLİM (TROMBOFİLİ).....	14
2.4.1. ANTİTROMBİN III EKSİKLİĞİ.....	18
2.4.2. PROTEİN C EKSİKLİĞİ.....	18
2.4.3. PROTEİN S EKSİKLİĞİ.....	19
2.4.4. PROTROMBİN GEN MUTASYONU (PT G20210A).....	20
2.4.5. HİPERHOMOSİSTEİNEMİ.....	21
2.4.6. FAKTÖR VIII DÜZEYİNDE ARTIŞ.....	23
2.4.7. KALITSAL FİBRİNOLİTİK SİSTEM BOZUKLUKLARI.....	23
2.4.8. AKTİVE PROTEİN C DİRENCİ (APC DİRENCİ).....	23
2.4.8.1. FAKTÖR V (FV).....	23
2.4.8.2. APC DİRENCİ PATOGENEZİ.....	27
2.4.8.3. EPİDEMİYOLOJİ.....	31
2.4.8.4. APC DİRENCİ VE VENÖZ TROMBOZ.....	31
2.4.8.5. APC DİRENCİ VE DİĞER HASTALIKLAR.....	34

2.4.8.6. APC DİRENCİ VE GEBELİK.....	35
2.4.8.7. APC DİRENCİ VE ARTERYEL TROMBOZ.....	37
2.4.8.8. APC DİRENCİNDE TROMBOZ İÇİN PREDİSPOZAN FAKTÖRLER.....	38
2.5. KALITIMSAL TROMBOFİLİDE TANI YÖNTEMLERİ.....	40
2.5.1. APC DİRENCİ VE FV LEİDEN MUTASYON ANALİZİ.....	43
2.5.1.1. APC DİRENCİ ÖLÇÜMÜ.....	43
2.5.1.2. MOLEKÜLSEL TANI YÖNTEMLERİ.....	47
2.6. KALITIMSAL TROMBOFİLİDE TEDAVİ YAKLAŞIMLARI.....	52
2.6.1. GEBELİK VE TROMBOFİLİ.....	54
2.6.2. HRT VE OKS KULLANIMI VE TROMBOFİLİ.....	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	55
3.1. ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI YERİN ÖZELLİKLERİ.....	55
3.2. ARAŞTIRMANIN TİPİ.....	55
3.3. ÖRNEKLEM HACMİNİN BELİRLENMESİ VE BİREYLERİN SEÇİMİ.....	56
3.4. KAN ÖRNEKLERİNİN ELDESİ.....	56
3.5. AKTİVE PROTEİN C DİRENCİ TAYİNİ.....	57
3.5.1. KİT'İN İÇERİĞİ.....	57
3.5.2. KİT İÇİNDE BULUNMAYIP KULLANILAN MALZEMELER.....	57
3.5.3. TEST PRENSİBİ.....	57
3.5.4. REAKTİF HAZIRLAMA.....	58
3.5.5. ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ.....	58
3.5.6. TESTİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	59
3.6. FAKTÖR V, PROTROMBİN, MTHFR GEN MUTASYONLARININ MOLEKÜLSEL DÜZEYDE TESPİTİ.....	59
3.6.1. MOLEKÜLSEL ANALİZ.....	59
3.6.2. YÖNTEMİN PRENSİBİ.....	60
3.6.2.1. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (POLYMERASE CHAIN REACTION-PCR).....	60
3.6.2.2. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	62
3.6.2.3. HİBRİDİZASYON.....	63

3.6.3. KİTİN İÇERİĞİ.....	64
3.6.4. KULLANILAN MALZEME VE CİHAZLAR.....	64
3.6.5. ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ. ....	65
3.6.5.1. DNA İZOLASYONU.....	65
3.6.5.2. İNVİTRO AMPLİFİKASYON (PCR).....	66
3.6.5.3. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	66
3.6.5.4. HİBRİDİZASYON.....	67
3.6.5.5. YIKAMA.....	67
3.6.5.6. BOYAMA.....	67
3.6.5.7. SONUÇLARIN YORUMLANMASI.....	68
3.6.5.8. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ	70
4. BULGULAR.....	71
4.1. DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER.....	71
4.2. APC DİRENCİ TAYİNİ.....	72
4.3. FV LEİDEN MUTASYONUNUN TESPİTİ.....	73
5. TARTIŞMA.....	82
6. SONUÇLAR.....	96
7. ÖZET.....	97
8. YABANCI DİL ÖZETİ.....	99
9. KAYNAKLAR.....	101
10. EK-I.....	142
11. EK-II.....	146
12. EK-III.....	147

## TABLolar ÇİZELGESİ

	SAYFA NO
Tablo-I: Edinsel Trombofili Nedenleri.....	15
Tablo-II: Edinsel Risk Faktörlerinde Olası Trombojenik Mekanizmalar.....	15
Tablo-III: Kalıtsal Trombofili Nedenleri.....	16
Tablo-IV: Genel populasyonda ve Venöz Trombozlu Olgularda Kalıtsal Trombofili Sıklıkları.....	17
Tablo-V: Tromboemboli İle İlişkili Diğer Durumlar Ve Rölatif Riskleri.....	18
Tablo-VI: OKS Kullanımı, FV Leiden Mutasyonu Ve Tromboz İlişkisi.....	39
Tablo-VII: Hiperkoagülabilité testlerinde fonksiyonel ölçümleri etkileyen akkiz durumlar.....	42
Tablo-VIII: Kalıtsal Trombofilinin Laboratuvar Tanısında Uygulanacak Testler.....	43
Tablo-IX: Araştırmaya Alınanların Özellikleri.....	71
Tablo-X: Cinsiyete Göre APC Direnci Dağılımı.....	73
Tablo-XI: APC Direnci Saptanan Olguların Tanımlayıcı İstatistikleri.....	73
Tablo-XII: Araştırma Grubunda FV Leiden Mutasyon Dağılımı.....	76
Tablo-XIII: FV Leiden Mutasyonu Saptananların Kendi İçerisinde Genotipik Dağılımı.....	76
Tablo-XIV: FV Leiden Mutasyonuna Sahip Bireylerin Özellikleri.....	78
Tablo-XV: FV Leiden ve MTHFR Gen Mutasyonu Birlikteliği Olan Olguların Özellikleri.....	80
Tablo-XVI: FV Leiden ile Protrombin gen mutasyonu ve FV Leiden, protrombin, MTHFR gen mutasyonları birlikteliği olan olguların özellikleri	81

## ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

SAYFA NO

Şekil-1: Yeni pıhtılaşma hipotezi.....	4
Şekil-2: Pıhtılaşma sisteminin prokoagülan ve antikoagülan yolları.....	5
Şekil-3: Doğal Antikoagülanların Etki Mekanizması.....	6
Şekil-4: Protein C'nin T-TM kompleksi tarafından EPCR varlığında aktivasyonu.....	7
Şekil-5: FV'in aktivasyon ve inaktivasyonu.....	8
Şekil-6: FVIII'in aktivasyon ve inaktivasyonu.....	9
Şekil-7: APC'nin antikoagülan ve fibrinolitik etki mekanizması.....	10
Şekil-8: Protein C aktivasyon modelleri.....	11
Şekil-9: Homosistein'in İntraselüler Metabolizması.....	21
Şekil-10: FV molekülünün aktivasyonu.....	25
Şekil-11: FV'in inaktivasyon ve aktivasyon şeması.....	26
Şekil-12: Hasta plazmasında APC'ye zayıf antikoagülan yanıt.....	27
Şekil-13: FV Leiden varlığında ortalama trombotik olay görülme yaşları.....	32
Şekil-14: Normal bireylerde, heterozigot ve homozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda ortalama APC-SR değerleri.....	45
Şekil-15: FV Leiden mutasyonu'nun tanısında PCR-RFLP analizinin şematizasyonu.....	49
Şekil-16: FV Leiden gen mutasyonları.....	50
Şekil-17: Venöz Trombozu Olan Trombofilili Hastaların Tanı Ve Tedavisine Yaklaşım.....	53
Şekil-18: Denizli Haritası.....	55
Şekil-19: Bir PCR siklusu.....	61
Şekil-20: Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik olarak görünümü.....	62
Şekil-21: Konjugat solüsyonu ve color devoloper'in etkisi.....	68
Şekil-22: Referans strip'in şematik görünümü.....	69
Şekil-23: Araştırma grubunun APC-R sonuçları.....	72
Şekil-24: 174, 200 ve 222 baz çifti büyüklüğündeki amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü.....	74
Şekil-25: Hastaların Mutasyon Analizi Sonuçlarından Örnekler.....	75



## KISALTMALAR

APC	Aktive Protein C
ACV	<i>Agkistrodon Contortix</i> Yılan Venomu
AFA	Antifosfolipid Antikor Sendromu
APC-SR	APC-Sensitivity ratio
aPTT	Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı
ASO	Alel Spesifik Olgonükleotid
AT	Antitrombin
Bç	Baz Çifti
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DVT	Derin Ven Trombozu
EPCR	Epitelyal Protein C Reseptörü
ET	Esansiyel Trombositoz
FVa	Aktif Faktör V
FVIIa	Aktif Faktör VII
GIS	Gastro İntestinal Sistem
HELLP	Hemolitik Anemi, Yükselmiş Karaciğer Enzimleri Ve Trombositopeni Sendromu
HMWK	Yüksek Molekül Ağırlıklı Kininojen
HRT	Hormon Replasman Tedavisi
ISTH	Uluslararası Tromboz Ve Hemostaz Derneği
kD	Kilo Dalton
LMWH	Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin
MHC-I	Major Histokompatibilite Kompleks Sınıf 1
MI	Miyokard İnfarktüsü
MTHFR	5-10-Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
OAK	Oral Antikoagülan
OD	Otozomal Dominant
OKS	Oral Kontraseptif
OR	Otozomal Resesif
PAI	Plazminojen Aktivatör İnhibitör

PC	Protein C
PCAT-NR	Protein C Aktivasyon Süresi-Normalleştirilmiş Oranı
PCI – PAI3	Protein C İnhibitörü
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism
PF4	Platelet Faktör 4
PS	Protein S
PTE	Pulmoner Tromboemboli
PV	Polisitemia Vera
RE	Restriksiyon Endonükleaz
READIT	The Reversed Enzyme Activity DNA İnterrogation Test
TAFI	Trombin Aktivatör Faktör İnhibitörü
TFPI	Tissue Factor Pathway İnhibitor
TM	Trombomodulin
tPA	Doku Plazminojen Aktivatörü
T-TM	Trombin- Trombomodulin
UV	Ultraviyole
VT	Venöz Tromboz
VTE	Venöz Tromboemboli

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanın vasküler sistem içinde akışkanlığının sağlanması koagülan ve antikoagülan faktörlerin dengelenmesi ile olmaktadır. Tüm dünyada en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olan tromboz bu hemostatik dengenin koagülasyon yönünde bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır (1). Bazı klinik tabloların trombozu kolaylaştırdığı bilinmekte ve bu durumlara trombofili denmektedir. Cerrahi girişim, travma, hiperviskosite durumları, oral kontraseptif kullanımı, gebelik, immobilizasyon gibi edinsel nedenler yanında doğal antikoagülanların veya fibrinolitik sistemde rol alan proteinlerin eksikliği veya işlevsel bozukluğu gibi kalıtsal nedenler de tromboz oluşumunu kolaylaştırmaktadır (2-5). Tromboz bu nedenle kalıtsal ve edinsel bilinen pek çok etkenle ortaya çıkan multifaktöriyel klinik bir tablodur (5-11).

Kalıtsal nedenlerden en sık görüleni aktive protein C (APC) direnci'dir. APC, antikoagülan etki gösteren bir serin proteaz olup, aktif FV (FVa) ve aktif FVIII (FVIIIa)'i inaktif hale getirerek trombin oluşumunu engeller. 1993 yılında Dahlback ve arkadaşları (12), normal plazmaya APC eklendiğinde FVa ve FVIIIa'nın parçalanmasına bağlı olarak aktive parsiyel tromboplastin zamanının uzaması gereğinden yola çıkarak yaptıkları çalışmada; ailesel olarak tromboza yatkınlığı olan ve birbirleri ile akraba olmayan 3 hastanın plazmasına APC eklenmesi ile beklenen antikoagülan yanıtın az yada hiç olmaması durumunu APC direnci olarak tanımlamışlardır. 1994'te de Bertina ve arkadaşları APC'ye karşı bu direncin faktör V genindeki tek bir baz mutasyonundan (G1691→A) kaynaklandığını tanımlamışlar ve bu mutant faktör V'e, faktör V Leiden ismini vermişlerdir. Yapılan klinik çalışmalarda ilk venöz tromboz epizodu geçiren bireylerin %15-40'ında APC direnci tanımlanmıştır (13-15). Seçilmiş olgularda bu oran %60'lara ulaşmaktadır (5,16-18). Normal bireylere göre heterozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda venöz tromboz riski 5-10 kat, homozigotlarda ise 30-140 kat artmıştır (6,12,18-22).

FV Leiden sıklığı etnik yapı ile ilişkili olup, değişik coğrafik yerleşim alanlarında farklı oranlarda bildirilmiştir. Ülkemizde FV Leiden çalışmaları daha ziyade tromboemboli geçiren hasta gruplarında yapılmıştır. Geniş bir popülasyonu içine alan sağlıklı kişilerde FV Leiden sıklığını belirlemeye yönelik çalışmalar sınırlıdır.

Biz bu çalışmamızda, kalıtsal trombofilinin en önemli nedeni olan bu patolojinin,

-Denizli il merkezinde sağlıklı bireylerde ne oranda görüldüğünü,

-APC direnci saptanan olgularda FV Leiden sıklığının ne oranda olduğunu,

-FV Leiden mutasyonunun diğer sık kalıtsal trombofilili nedenlerinden olan protrombin gen mutasyonu ve metilentetrahidrofolat redüktaz enzim defekti ile ne oranda birliktelik gösterdiğini,

-FV Leiden mutasyonu ve kombine defekt saptanan bireylerin bilgilendirilmesi, olası tromboembolizme karşı alınması gereken önlemlerin belirlenmesi ve genetik danışmanlık hizmetleri gibi bireylere ve ailelerine yönelik sağlık hizmetlerinin verilmesini amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. HEMOSTAZ

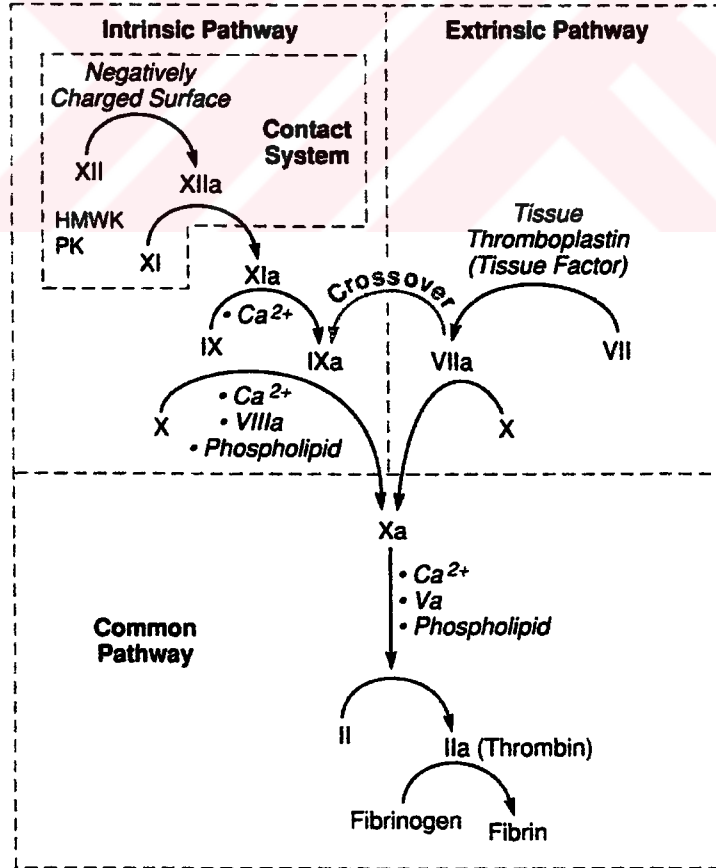
Kanın damar içerisinde sağlıklı bir şekilde akması hemostatik sistem tarafından sağlanır. Normal hemostaz, damar duvarındaki yaralanmayı takiben pıhtı oluşumu ve doku tamiri ile sonuçlanan süreçleri içerir (23-27). Damar endotel hücreleri, trombositler, pıhtılaşma proteinleri, fibrinolitik sistem ve antikoagülan proteinler normal hemostazın devamını sağlayan elemanlardır (25,26,28,29).

#### 2.1.1. PIHTILAŞMA FİZYOLOJİSİ

1964 yılında öne sürülen kaskad hipotezine göre FXII aktivasyonu ile başlayan intrinsek yol ve subendotelyal bölgeden açığa çıkan doku faktörü ile başlayan ekstrinsek yoldaki reaksiyon dizileri iki yolun son ürünleri FX aktivasyonunu sağlar ve bundan sonra ortak olarak devam eden yol, trombin ve fibrin oluşumu ile sonlanır (25). Ağır birer kanama bozukluğu olan FVIII ve FIX eksiklikleri, intrinsek sistemi yansıttığı düşünülen testlerle gösterildiğinden, intrinsek yol yıllarca hemostazın koagülasyon fazının primer yolu olarak düşünülmüştür. Ancak FXII, prekallikrein ve yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK) eksikliklerinde anormal bir kanama görülmemesi ve FXI eksikliğinde ise FVIII ve FIX eksikliğine kıyasla çok hafif bir kanama eğiliminin olması; FIX'un, FXII ve FXI'i atlayarak başka bir yolla aktive olabileceğini düşündürmüştür. Bu hipotez 1977 yılında Osterud ve arkadaşlarınca, doku faktörü ve FVII'nin  $Ca^{+2}$  varlığında FIX'u aktive ettiğinin gösterilmesi ile kesinlik kazanmıştır (25,30) (Şekil-1). Seksenli yıllarda doku faktörü yolu inhibitörünün (Tissue Factor Pathway inhibitor:TFPI) pıhtılaşma reaksiyonlarındaki öneminin anlaşılmasını takiben pıhtılaşma fiziolojisi daha iyi anlaşılmıştır (25).

Günümüzde pıhtılaşmanın aktivasyonunun endotel zedelenmesi sonucu kanla temas eden subendotelyal hücrelerden açığa çıkan doku faktörü ile başladığına kesin gözüyle bakılmaktadır. Vasküler hasar sonucu açığa çıkan doku faktörü aktive FVII ile bağlanarak kompleks oluşturur. Bu doku faktörü- FVIIa

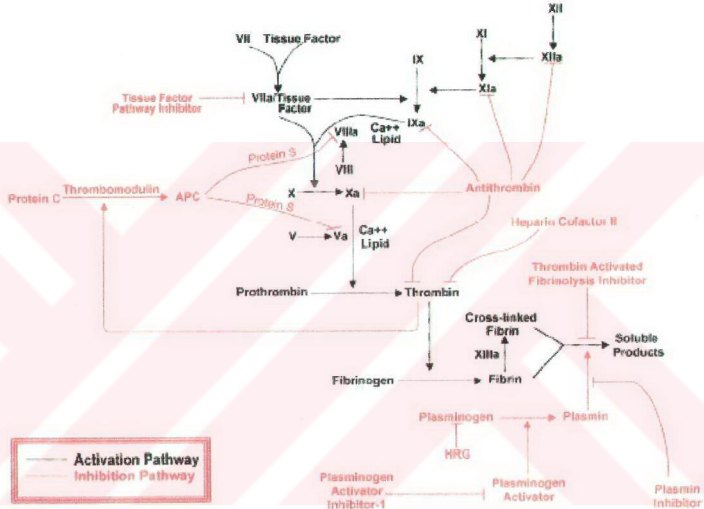
kompleksi FIX ve FX'u aktive eder (26,30-35). FX'un aktivasyonunu takiben TFPI'nün inhibitör etkisi belirginleşir ve doku faktörü/FVIIa inhibe edilerek, daha fazla FIX ve FX'un aktive olması engellenir. Bundan sonraki FX aktivasyonu hemen hemen tümüyle FIXa ve FVIIIa (intrinsek yol) üzerinden olur. FIXa, FVIIIa, fosfolipid ve kalsiyum "Tenaz" kompleksini meydana getirerek FX'u aktive eder (24,26,36). FXa, FVa kofaktörlüğünde kalsiyum, magnezyum ve fosfolipid varlığında (protrombinaz kompleks) protrombini trombine dönüştürür (24,32,37,38). Trombin pıhtılaşma sisteminin en önemli enzimidir. Trombositlerin aktivasyonunu, fibrinojenin fibrine çevrilmesi, FVII, FV, FXI ve FXIII aktivasyonu gibi bir çok görevi vardır (24,28). Ortak yoldan devam eden reaksiyonlar sonucunda oluşan fibrin monomerleri birleşerek fibrin polimerlerini meydana getirirler. Yine trombin tarafından aktive edilen FXIII kalsiyum iyonları aracılığı ile çözünür olmayan fibrin pıhtısını oluşturur (24-26,39) (Şekil-1).



Şekil-1: Yeni pıhtılaşma hipotezi (29)

## 2.2. PIHTILAŞMANIN KONTROLÜ

Koagülasyon sistemi aktivator ve inhibitörleri ile çok sıkı denetlenen bir sistemdir (Şekil-2). Pıhtılaşmayı sadece gerekli bölgeye sınırlamak için Antitrombin III, Protein C, TFPI gibi doğal koagülasyon inhibitörleri devreye girer. Diğer yandan fibrinolitik sistem de hemostaz süresince en az pıhtılaşma sistemi kadar önemli diğer bir sistemdir. Plazmin, fibrinojen ve fibrin pıhtısını etkileyerek pıhtının sınırlanmasını sağlar (25,26,28,40).

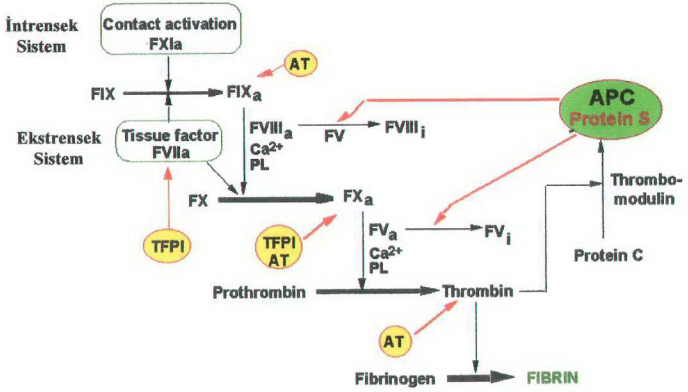


Şekil-2: Pıhtılaşma sisteminin prokoagülan ve antikoagülan yolları

### 2.2.1. DOĞAL ANTIKOAGÜLANLAR

Bilinen doğal antikoagülanlar etki mekanizmalarına göre 3 gruba ayrılırlar; (2,41,42) (Şekil-3).

1. Heparan Sülfat-Antitrombin mekanizması
2. Protein C-Trombomodulin-Protein S mekanizması
3. Doku faktörü yolu inhibitörü



Şekil-3: Doğal Antikoagülanların Etki Mekanizması

#### 2.2.1.1. Heparan Sülfat-Antitrombin Mekanizması

İlk olarak 20. yüzyılın başlarında kanda antitrombin (AT) etkisi olan maddelerin varlığı araştırılmaya başlanmış ve 1916'da McLean heparini izole etmiştir. Heparin karaciğerde sentezlenen 64 kilodalton (kD) ağırlığında vücudun önemli fizyolojik antikoagülan maddesidir. Polisakkarit yapıda olup fazla miktarda negatif yük taşır. Tek başına antikoagülan etkisi yok denecek kadar azdır (24,42,43). AT 58 kD ağırlığında, 432 aminoasitten oluşmuş bir glikoproteindir. Karaciğerde sentezlenir. Plazma konsantrasyonu yaklaşık 125 µg/ml ve plazma yarı ömrü 65 saattir. (16,24,42). AT üzerinde biri heparini, diğeri trombini bağlayan iki majör bölge bulunmaktadır. Heparin ve diğer glikozaminoglikanları bağlayan bölgeye lizin bölgesi, trombini bağlayan kısma ise arginin-serin bölgesi denmektedir. Ortamda heparin veya heparin benzeri moleküllerin (heparan sülfat, dermatan sülfat gibi glikozaminoglikanlar) varlığı lizin bölgesindeki kompleks oluşumunu ve trombin-AT etkileşimini arttırmaktadır (24,44). AT normalde yavaş bir inhibitör iken heparin varlığında etkisi yüz kat artmaktadır (41). ATIII; trombini ve FIXa, Xa, XIa, XIIa gibi serin proteazları, plazmin, ürokinaz ve kallikrein aktivitesini ve doku faktörüne bağlı olan FVIIa'yı inhibe ederek etki göstermektedir (3,16,30,35,41,42,45,46).

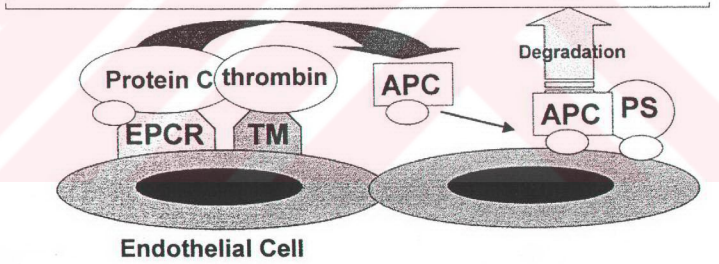


## 2.2.1.2. Protein C-Trombomodulin-Protein S Mekanizması

### 2.2.1.2.1. Protein C (PC)

İlk kez 1961 yılında tanımlanan protein C, vitamin K'ya bağımlı, 62 kD ağırlığında ağır zincir ve 21 kD ağırlığında hafif zincirden oluşur. İki zincir tek disülfid köprüsüyle bağlanır (42,47-49). Hafif zincir üzerinde  $Ca^{++}$  iyonu bağlayan Gla kısmı, epidermal büyüme faktörü kısmı ve ağır zincir üzerinde serin proteaz kısmı olarak tanımlanan üç bölümü vardır (50-52). Normal serum düzeyi 3-5  $\mu\text{g/ml}$  olup yarılanma ömrü yaklaşık 8-10 saattir (25,49).

Protein C'nin en önemli aktivatörü trombindir (25,47-49,52-54). Bu reaksiyon hızı invitro ortamda kanın pıhtılaşmasına izin verecek derecede yavaşken, vasküler endotel yüzeyinde iki kofaktör reseptör (Trombin-TromboModulin, Epitelyal Protein C Reseptörü) varlığında 20 bin kat hızlanır (39,47,48,52,53,55,56). (Şekil-4)

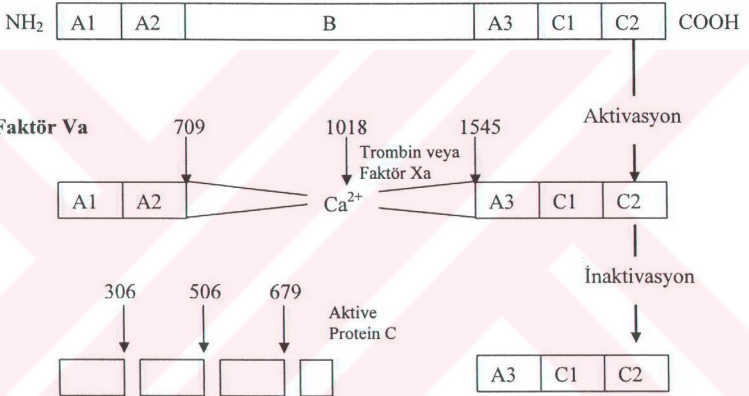


Şekil-4: Protein C'nin T-TM kompleksi tarafından EPCR varlığında aktivasyonu

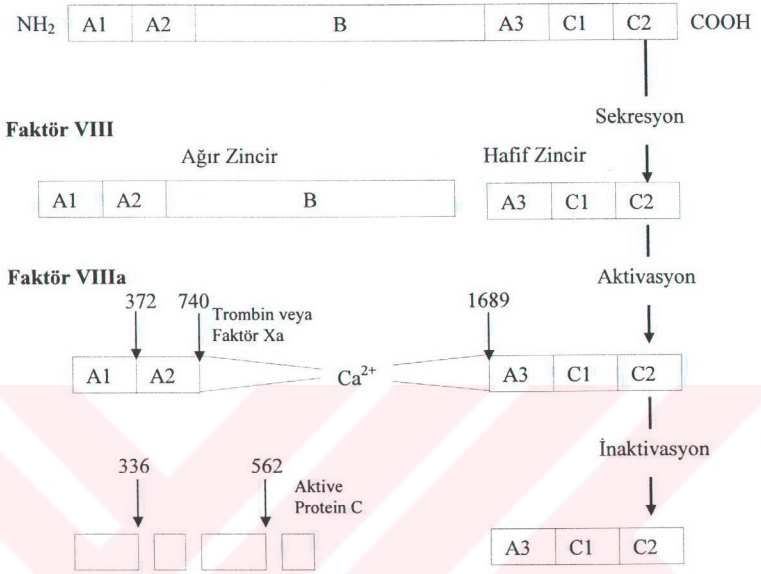
Trombinin TM'e afinitesi ve protein C'nin aktivasyonu heparin varlığında artar ve bu etki heparinin moleküler ağırlığı ile orantılıdır (57,58). APC endotelial hücre yüzeyindeki protein S ile devamlı etkileşim halindedir. Bu etkileşim, APC'nin trombosit ve diğer endotelial hücre yüzeyine bağlanmasını kolaylaştırır (25,49,59). Hücre yüzeyine bağlı olarak bulunan APC FVa ve FVIIIa'yı inaktif edebilme özelliğindedir (17,25,42). Trombin tarafından aktive edilen FV ve FVIII birbirine benzer molekül yapısında glikoproteinlerdir. Plazma FVIII yoğunluğu,

FV'in yoğunluğundan 50-100 kat daha azdır. FVIII plazmada kalsiyum ile bağlı heterodimer yapısında bulunmasına rağmen, FV tek zincir halinde bulunur. APC, FVa ve FVIIIa'yı aktive olmayan FV ve FVIII'e göre 5-10 kat daha hızlı parçalamaktadır (49). FVa'da ilk olarak Arg 506 parçalanmaya başlar, bunu Arg 306 ve Arg 679 izler (22,60-65). FVIIIa'da ise esas olarak Arg562 daha yavaş olarak da Arg336'nın kırılması ile inaktivasyon gerçekleşir (66). (Şekil-5 ve Şekil-6)

Faktör V



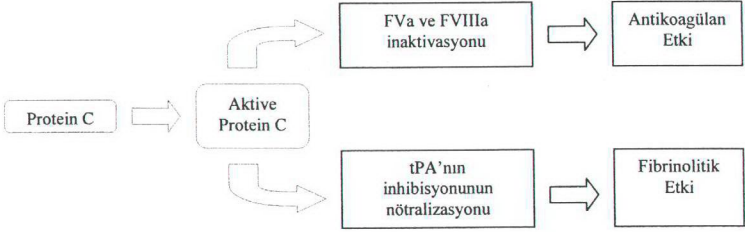
Şekil-5: FV'in aktivasyon ve inaktivasyonu (24)



Şekil-6: FVIII'in aktivasyon ve inaktivasyonu (24)

APC'nin inhibitör etkisi FXa tarafından modüle edilir, FXa fosfolipid yüzeylerde FVa'ya bağlanarak APC'nin proteolitik etkisinden korur (67). Ayrıca FXa protein S (PS)'in yıkımı ile de prokoagülan etki gösterir (42,68). En önemli PC aktivatörü trombin olmakla birlikte bunun dışında FXa da trombomodulin varlığında PC'yi aktive edebilmektedir (25,53,57). *Agkistrodon Contortix* yılan zehirinin de PC aktivatörü olduğu gösterilmiştir ve APCR tanısında koagülasyona dayalı testlerde kullanılır (69,70-73). Platelet faktör 4 (PF4), plateletlerin  $\alpha$  granüllerinde bol miktarda bulunan heparin bağlayan proteindir. PF4 trombomodulinde bulunan glikoz-amino-glikan bölgesine ve PC'nin Gla bölgesine bağlanır. Etkileşim ile PC'nin T-TM kompleksine afinitesi artar ve PC indüklenir (74).

Aynı zamanda APC, plazminojen aktivatör inhibitör (PAI) ile kompleks oluşturarak PAI'nün fibrinolizi düzenleyici etkisini ortadan kaldırıp fibrinolizi uyarmaktadır (24,75) (Şekil-7)



Şekil-7: APC'nin antikoagülan ve fibrinolitik etki mekanizması (75)  
(tPA:doku plazminojen aktivatörü).

APC; protein C inhibitörü (PCI: PAI-3),  $\alpha_1$  antitripsin,  $\alpha_2$  makroglobulin,  $\alpha_2$  antiplazmin, elastase ve katepsin G gibi proteaz inhibitörleri tarafından nötralize edilir (24,25,49). PCI; platelet ve megakaryositlerde sentezlenir (76), platelet membranlarından ve mikroveziküllerinden fosfotidil-etanolamin salgılatarak PC'yi inhibe eder (77). Trombin-trombomodulin (T-TM) kompleksini inhibe ederek (78) prokoagülan aktivite göstermektedir (79).

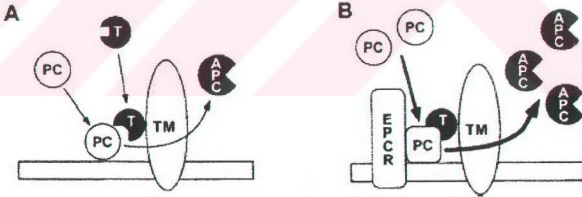
#### 2.2.1.2.2. Trombomodulin (TM)

TM, 559 aminoasitten oluşmuş transmembran proteinidir. Küçük ara bölge peptidleri ile bağlanmış 6 tane ardışık epidermal growth faktör benzeri bölgeler PC aktivasyonunda önemlidir (80). Kan ve lenfatik damarların endotel hücrelerinde ve az miktarda trombositler, monositler ve nötrofillerde bulunur. Her bir kan volümüne düşen endotel yüzeyi kapillerde ana damarlardan daha fazla olduğundan trombomodulin düzeyi mikrosirkülasyonda ana damarlara göre 1000 kat daha fazladır (24,49). TM, PC'nin trombin ile aktivasyonunda kofaktör rolü oynamakta ve PC aktivasyon hızını 1000-2000 kat arttırmaktadır (49,54,81). Ayrıca T-TM birleşmesi ile prokoagülan alandan trombin kaybı sonucu, trombinin genel substratları olan FVIII, FV, fibrinojen ve FXIII'i aktive edici etkisi yok olur. TM'in pıhtılaşma sistemi üzerindeki bir diğer etkisi yapısında

galaktozaminoglikan içerdiğinden ATIII yolu ile trombinin inaktivasyonunu arttırmaktır (24,25,82,83). T-TM kompleksi aynı zamanda TAFI (trombin aktivatör faktör inhibitörü) yolu ile fibrinolitik mekanizmada da regülatuar rol oynamaktadır. Aktive TAFI fibrinden karboksi terminal lizin ve arginin dizilerini çıkararak fibrinolizisi regüle eder. Yüksek konsantrasyonlardaki TM fibrinolizisi indüklerken düşük düzeylerdeki TM fibrinolizise inhibitör etki gösterir (39,84-88).

#### 2.2.1.2.3. Endotelial Protein C Reseptörü (EPCR)

Bir başka transmembran proteini olan EPCR'nin PC antikoagülan yolunda önemli regülatuar komponent olduğu bilinmektedir (89-91). EPCR major histokompatibilite kompleks sınıf I (MHC-I) reseptör familyasına benzer yapıda APC'nin direk bağlandığı tip I transmembran proteindir (90,92,93). EPCR, primer olarak büyük damar endotelial yüzeyinden eksprese edilir (89,92,94) ve EPCR'ye hem PC hem de APC benzer afiniteyle bağlanır (95). EPCR, invitro ortamda T-TM kompleksinin PC'ye olan afinitesini arttırmak suretiyle PC'nin aktivasyonunu 5-7 kat artırır (55,56,89,91,94,96) (Şekil-8)



Şekil-8: Protein C aktivasyon modelleri. EPCR, primer olarak büyük damar endotelial yüzeyinden eksprese edilir, küçük damarlarda bulunmaz. EPCR varlığında T-TM tarafından protein C aktivasyonu (B), EPCR yokluğundakine (A) göre önemli oranda fazladır (94)

Endotel hasar bölgesinde oluşan trombin ortamda bulunan TM'e, büyük damarlardaki endotelial hücrelerde bulunan EPCR PC'ye bağlanır (94,95,97). T-TM kompleksi ile EPCR'ye bağlı PC, serbest PC'ye göre daha etkin olarak aktifleşir (55,56,94,96).

#### 2.2.1.2.4. Protein S (PS)

İlk kez 1977 yılında bulunan PS, K vitaminine bağımlı bir protein olup, molekül ağırlığı 69 kD ve plazma düzeyi yaklaşık 22 mg/L'dir (59,98-102). PS karaciğerde ve endotelde yapılır; endotel yüzeyinde ve trombositlerin alfa granüllerinde bulunur (49,103). PS, plazmada %60 oranında klasik kompleman aktivasyonunda düzenleyici bir protein olan C4b bağlayıcı protein (C4-binding protein, prolinde zengin lipoprotein)'e bağlı olarak bulunur. PS'in sadece %40'lık serbest olan formu FVa ve FVIIIa yıkımında kofaktör olarak görev yapar (59,99,104,105). Serbest PS; negatif yüklü fosfolipidlere yüksek afiniteli APC'yi, trombosit mikropartikülerindeki ve endotel yüzeyindeki fosfolipidlere bağlayarak antikoagülasyonda kofaktör görevi görür. Antikoagülasyondaki bu rolü dışında fizyolojik önemi henüz çok iyi bilinmemekle birlikte FVa, FVIIIa ve FXa'yı direk bağlayarak da antikoagülan etki gösterir (49,98,103). FVa inaktivasyonu PS varlığında 5-20 kat artmaktadır (61,99). Ayrıca FVIIIa'nın parçalanmasında da PS ve FV sinerjik etki göstermektedir (49,101,103). PS'in inaktivasyonu; trombin, yüksek oranda PC, FXa, kallikrein,  $\alpha$  kimotripsin ile olmakta, inaktivasyona uğrayan PS'in kalsiyum bağlama yeteneği azalmakta ve antikoagülan etkisi kaybolmaktadır (68).

#### 2.2.1.3. Doku Faktörü Yolu İnhibitörü (Tissue factor pathway inhibitor: TFPI)

İlk kez 1957'de Hjört, serumda Doku Faktörü/FVIIa kompleksini inhibe eden, ancak doku faktörü veya FVIIa'yı inhibe etmeyen bir inhibitör saptamış ve antikonvertin adını vermiştir. 1991'den itibaren uluslararası tromboz ve hemostaz derneği (ISTH) standardizasyon komitesi tarafından verilen TFPI adı kullanılmaktadır (25). %50-80'i damar duvarına yapışık, %10-50'si plazma lipoproteinlerine bağlı, geri kalan küçük bölümü ise trombositlerde bulunan glikoprotein yapıda bir maddedir. Kandaki TFPI'nın %10'u plateletlerde bulunur ve trombinle uyarıldığında plateletlerden salınır. Endotel yüzeyinde de bol miktarda bağlı TFPI bulunur. Endotele bağlı TFPI, heparin verildiğinde plazmaya salınır ve bu nedenle heparin infüzyonu ile plazma TFPI düzeyleri 2-10 kat artar (25,40,106,107).

TFPI yoluyla inhibisyonda, TFPI önce FXa ile Xa/TFPI kompleksi oluşturarak Xa'yı inhibe etmektedir. İkinci basamakta ise bu kompleks VIIa/TF kompleksine VIIa tarafından bağlanarak dörtlü bir Xa/TFPI/VIIa/TF kompleksi oluşturur. Bu kompleks içerisinde yer alan VIIa/TF kompleksinin artık katalitik bir işlevi yoktur. Hangi yolla olursa olsun sonuç olarak etkin TF/VIIa inhibisyonu için FXa gereklidir (24,25,41,106,108).

### 2.2.2. FİBRİNOLİTİK SİSTEM

Fibrin polimerlerinin enzimatik olarak parçalanması anlamına gelen fibrinoliz, plazmada bulunan plazminojen-plazmin proteolitik enzim sistemi tarafından gerçekleştirilir. Plazminin inaktif öncüsü olan plazminojenin aktif bir proteinaz olan plazmine dönüşmesini başlıca iki plazminojen aktivatörü sağlar. Bunlar; doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinazdır (25,40,109,110). Fibrinolizin fibrinin olduğu bölge dışına yayılmasının önlenmesi hayati önem taşımaktadır. Bu da plazminojen aktivatör inhibitörleri (PAI) aracılığı ile sağlanır (25,109,111-116).

### 2.3. TROMBOZ

Tromboz; damar içerisinde uygun olmayan yer ve zamanda, edinsel veya kalıtsal pek çok faktör nedeni ile antitrombotik ve trombotik mekanizmalardaki dengenin bozulması sonucunda hemostazın aktive olmasıyla oluşan patolojik bir olaydır (1). Tromboz patogenezinde rol oynayan üç önemli faktör 1800'lü yıllarda Alman patolog Rudolph Virchow tarafından tanımlanmıştır (Virchow triadı) ve günümüzde halen geçerliliğini korumaktadır. Bunlar;

1. Kan akımında yavaşlama (staz)
2. Damar duvarında zedelenme (endotel hasarı)
3. Kanın bileşiminde değişiklikler (hiperkoagülabilité)

Pıhtılaşma sisteminde rol oynayan faktörlerin keşfi ve mekanizmalara ait gelişmeler, moleküler genetik bilgiler, hücre sinyal ileti yollarının aydınlanması tromboz patogenezinin daha iyi anlamamızda katkıları olmasına karşın, Virchow'un triadı tromboz patogenezinin tartışılmasında hala temel olma özelliğini sürdürmektedir (8).

“Hiperkoagülabilité” kanın pıhtılaşmaya eğiliminin artışı yani hemostatik dengenin tromboza kayan değışiklikler göstermesi olarak tanımlanabilir. Kanda pıhtılaşma faktörlerinin konsantrasyonlarının artması (FVII,FVIII, FIX) ya da doğal inhibitörlerin eksikliği (ATIII,PC,PS), fibrinolitik aktivitede azalma gibi değışiklikler hiperkoagülabilité nedenlerindedir (1,2,4,8,117).

#### **2.4. TROMBOZA EĞİLİM (TROMBOFİLİ)**

Trombofili (thrombo-philia: trombozu sevmé) tromboza eğilim yaratan tabloları tanımlamakta kullanılan bir terimdir, daha çok venöz tromboza yatkınlığı yansıtır. Trombofili için günümüzde yaygın kabul görmüş bir tanım olmamakla birlikte; yakın geçmişte, kalımsal yada edinsel veya her ikisinin sonucu olan predispozan faktörlerin neticesinde tromboz gelişimine meyil olarak tarif edilmiştir. Bu tanım, doğrudan hemostatik sisteme bağı olmayan durumlar da dahil edildiğinden daha kullanışlı bir tanımdır (2-5,8,71,117).

Tromboz sıklıkla alt ekstremitelerin derin venlerinde gelişir ve buradan kopan embolilere bağı olarak gelişen pulmoner emboliler ciddi bir sorun oluşturur (4,118,119). Objektif olarak tanı almış pulmoner emboli’li hastaların yaklaşık %70’inde venografide Derin Ven Trombozu (DVT), objektif olarak tanı almış DVT’li hastaların ise yaklaşık %40’ında klinik bulguları belirgin olsun veya olmasın pulmoner emboli mevcuttur (7,120). Venöz tromboembolizm (VTE)’in yıllık insidansını bildiren raporların sonuçları birbirinden çok farklıdır. DVT için standardize edilmiş insidans hızı yüz binde 43.7-45 arasında, pulmoner emboli için yüz binde 20.8-65.8 arasında değışen değerlerde bildirilmektedir (121).

Tromboz multifaktöriyel bir sürecin sonucudur. Çok sayıda edinsel ve herediter faktörler ayrı ayrı veya bir arada tromboz gelişimine neden olurlar (5-11).

Tablo-I’de tromboza neden olan edinsel faktörler, Tablo-II’de tromboza neden olan edinsel faktörlerin olası trombojenik mekanizmaları ve Tablo-III’de de kalımsal trombofili nedenleri belirtilmiştir.



Tablo-I: Edinsel Trombofili Nedenleri (1,2,16,122,123)

1. Vasküler bozukluklar: Ateroskleroz, diabetes mellitus, vaskülitler, protetik materyaller (graft, valv)
2. Kan akışkanlığındaki değişiklikler:
  - Staz (immobilizasyon, cerrahi, konjestif kalp yetmezliği)
  - Hiperviskosite (polisitemia vera, waldenström makroglobulinemisi, akut lösemi, orak hücreli anemi)
3. Trombosit disfonksiyonu: Miyeloproliferatif hastalıklar, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri
4. Hiperkoagülabilité ile ilişkili diğer nedenler:
  - Kanser (Trousseau's sendromu),
  - Oral kontraseptif (OKS) ve östrojen tedavisi,
  - Gebelik,
  - Nefrotik sendrom,
  - Protrombin kompleks konsantrelerinin infüzyonu,
  - İnflamatuvar barsak hastalıkları,
  - Trombotik trombositopenik purpura,
  - Yaygın damar içi pıhtılaşma sendromu (DIC),
  - Antifosfolipid antikor (AFA) sendromu,
  - Heparin ilişkili trombositopeni/tromboz

Tablo-II: Edinsel Risk Faktörlerinde Olası Trombojenik Mekanizmalar (124)

Risk Faktörü	Venöz staz	Vasküler hasar	Hiperkoagülabilité
İleri yaş	+	+	+
İmmobilizasyon	+++	-	+
Cerrahi girişim	++	+++	+
Travma	++	++	++
Gebelik	+++	-	+
OKS tedavisi	-	-	++
Malignite	++	+	++
Konjestif kalp yetmezliği	++	-	-
Variköz venler	+++	++	-
AFA sendromu	-	+	++

Tablo-III: Kalıtsal Trombofili Nedenleri (1,125,126)

	Kalıtım şekli	VT'daki tahmini prevalans (%)	Klinik bulgular
<b>I. Koagülasyon faktörlerinin eksikliği veya yapısal anormallikleri</b>			
1. APC direnci (FV Leiden)	OD	20-60	VTE
2. PC eksikliği	OD	5-6	VTE
3. PS eksikliği	OD	5-6	VTE
4. TM eksikliği	OD	1-5	VT,MI
5. ATIII eksikliği	OD	1-2	VTE
6. Heparin kofaktör II eksikliği	OD	<1	VT
<b>II. Koagülasyon zimojenlerinin anormallikleri</b>			
1. Protombin gen mutasyonu	OD	5-10	VTE
2. FVIII yüksekliği	bilinmiyor	20-25	VTE
<b>III. Fibrinolitik sisteme ait defektler</b>			
1. Disfibrinojenemi	OD	1-2	VT>AT
2. Plazminojen eksikliği	OD/OR*	1-2	VTE
3. tPA eksikliği	OD	bilinmiyor	VTE
4. PAI-1 aktivitesinde artma	OD	bilinmiyor	VTE,AT
<b>IV. Metabolik defekt</b>			
1. Hiperhomosisteinemi	bilinmiyor	Rekürren trombozlu hastalarda %10-25	AT,VT
2. CBS,MS,MTHFR,MSR eksikliği	OR	1/300bin	AT,VT

OD: otozomal dominant, OR: otozomal resesif, VTE: venöz tromboemboli, VT: venöz tromboz, MI: miyokard infarktüsü, AT: arteriyel tromboz, CBS: sistatyonin  $\beta$  sentaz, MS: metionin sentaz, MSR: metionin sentaz redüktaz, MTHFR: metilentetrahidrofolat redüktaz

\*: plazminojen eksikliği genellikle OD, displazminojenemi OR kalıtılır.

Kalıtsal trombofili; bilinen etyolojik faktörler olmaksızın genellikle genç bir yaşta oluşan (<45) ve tekrarlama eğilimi gösteren venöz tromboemboliye herediter olarak belirlenmiş yatkınlık olarak tanımlanmaktadır (2,3,16,71). Pıhtılaşma sistemine ait bilgilerin gün geçtikçe artmasıyla yirminci yüzyılın ikinci yarısında kalıtsal trombofililer de aydınlatılmaya başlanmıştır. İlk kez 1965'de AT eksikliğin tromboza eğilim yarattığı gösterilmiştir. Ardından 1981'de PC ve 1984'de PS eksiklikleri tanımlanmıştır. Bu 3 eksiklik kalıtsal trombofililerin

sadece %15'ini oluşturur (16,49,117,127). 1993 yılında Dahlback ve arkadaşları kalıtsal trombofilisi olan bazı hastalardan alınan plazma örneklerinin aktif PC'nin antikoagulan etkisine karşı dirençli olduğunu göstermişler (12), 1994'te de Bertina ve arkadaşları APC'e karşı bu direncin FV genindeki bir mutasyona bağlı olduğunu tanımlamışlar ve bu mutant gene FV Leiden ismini vermişlerdir (128). Bundan sonra yapılan çalışmalar APC'ye direncin kalıtsal trombofilinin en önemli nedeni olduğunu ve olguların %20-50'sini kapsadığını ortaya koymuştur. Yine 1994'de hiperhomosisteineminin (129), 1996'da protrombin geninde bir mutasyonun (protrombin G20210A mutasyonu) kalıtsal trombofilie neden olduğu gösterilmiştir (130). Artık kalıtsal trombofilinin %63'ünden FV Leiden ve protrombin gen mutasyonunun sorumlu olduğu düşünülmektedir (5,18). Tablo-IV'de kalıtsal trombofilinin sık veya iyi belirlenmiş nedenlerinin genel popülasyonda ve venöz trombozlu olgulardaki sıklığı özetlenmiştir.

Tablo-IV: Genel popülasyonda ve Venöz Trombozlu Olgularda Kalıtsal Trombofili Sıklıkları (1,9,16,117,123,129,131)

	Genel Populasyon	VT'lu seçilmemiş olgular	VT'lu seçilmiş olgular*
ATIII eksikliği	0.02 – 0.17	1.1	0.5 – 4.9
PC eksikliği	0.14 – 0.5	3.2	1.4 – 8.6
PS eksikliği	0.1	2.2	1.4 – 7.5
APC Direnci	3.6 – 6	21	10 – 64
Hiperhomosisteinemi	5 – 10	10	10 – 25
Protrombin G20210A	1 – 2,3	6,2	10-20
FVIII yükskeliği	6-11	20-25	

\* : 45 yaş altında ve/veya tekrarlayan trombozlu olgular

Tablo-V'da kalıtsal olduğu net olarak kanıtlanamayan venöz tromboemboli ile ilişkili diğer durumlar ve tromboz için rölatif riskleri verilmiştir.

Tablo-V: Tromboemboli İle İlişkili Diğer Durumlar Ve Rölatif Riskleri (71)

	Rölatif Risk
FXI yüksekliği (>1200 U/L)	2,2
FIX yüksekliği (>1280 U/L)	2,5
Fibrinojen yüksekliği (>5g/L)	4,0
TAFI yüksekliği (>1220 U/L)	2,0

Kalıtımsal trombofili nedenlerini genetik olarak taşıyan bireylerde tromboz riski artmakla birlikte, yaşamları boyunca hiçbir trombotik atak geçirmemeleri de mümkündür. Veya bu kişilerde tekrarlayan trombotik ataklar arasında uzun süren asemptomatik dönemler olabilmektedir. Bu durum, tromboz için tek başına kalıtsal nedenlerin yeterli olmadığını, tromboz gelişiminde bazı edinsel faktörlerin katkısı olduğunu göstermektedir (1,5,21,129,131).

#### 2.4.1. ANTİTROMBİN III EKSİKLİĞİ

ATIII eksikliği otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. Heterozigot ve homozigot şekli tanımlanmıştır. Homozigot şekli hayatla bağdaşmaz (2,3,16,45,129). Genel populasyonda semptomatik ATIII eksikliği yaklaşık 1/2000 – 1/5000 arasında, asemptomatik ATIII eksikliği ise yaklaşık 1/600 civarındadır. VTE öyküsü olan seçilmemiş vakalarda sıklık %1.1, seçilmiş vakalarda ise %2.4 (%0.5-4.9) olarak bulunmuştur (2,16,18,45). ATIII aktivitesinde yetersizlik, venöz tromboz için artmış risk oluşturur, arteriyel tromboz üzerine önemli bir katkısı yoktur. ATIII eksikliği saptanan bireylerin yaklaşık %65'i en az bir kere VTE atağı geçirirler. Özellikle ikinci dekatta alt ekstremitelerde DVT'lerinin saptanması tipiktir (132-135). Eşlik eden kalıtımsal veya edinsel protrombotik risk faktörlerinin varlığında tromboz riski 5-20 kat artar (3,135,136). İlk tromboz atağında yarıya yakın olguda kolaylaştırıcı bir risk faktörü saptanmazken, kalan kısmında gebelik, travma, cerrahi müdahale ve OKS kullanımı gibi risk faktörlerinden biri mevcuttur (2).

#### 2.4.2. PROTEİN C EKSİKLİĞİ

Otozomal dominant kalıtılan PC eksikliği'ne sebep olan şimdiye kadar 160'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır (3,16,18,47,137-142). Heterozigot şekli

genel populasyonda %0.2-%0.4 oranında görülür. Tromboembolik hastalık geçirmiş kişilerin %2-5'inde PC eksikliği saptanmıştır. Bu prevalans genç ve tekrarlayan VTE'de %10-15'e kadar çıkmaktadır (3,18,47,129,137,143). Derin ve süperfisiyel ven trombozu yaygındır. Etkilenen ailelerde VTE geçiren heterozigot kişilerin %50'sinden fazlası 40 yaş civarındadır ve epizotların yarısından fazlası spontandır (133,134). Klinik prezantasyon oldukça değişkendir. Heterozigot olgularda genelde erişkin yaşta derin veya yüzeysel venöz tromboz, pulmoner emboli ve warfarine bağlı deri nekrozu klinik tabloyu oluşturabilir (143). Homozigot yeni doğanda ise purpura fulminans, renal ven, mezenterik ven ve dural sinüs trombozları görülebilmektedir. Warfarine bağlı deri nekrozu, hiperkoagülabilitateye sekonder gelişen bir tablodur. İlaça başladıktan ilk birkaç gün içinde gövde ve ekstremitelerde ortaya çıkar. K vitaminine bağlı faktörler arasında yarı ömrü en kısa olan PC'dir (4-8 saat). Warfarin kullanımı ile PC eksikliği olan bireylerde düşük olan düzey daha da azalmakta ve geçici bir hiperkoagülabilitate tablosu meydana gelmektedir (2,75,144,145).

#### 2.4.3. PROTEİN S (PS) EKSİKLİĞİ

Otozomal dominant kalıtım özelliği gösteren PS eksikliğinin 69'dan fazla farklı mutasyonu tanımlanmıştır (146-150). Seçilmemiş venöz trombozlu olguların %3 kadarında PS düzeylerinin düşük olduğu, bu oranın 50 yaş altı ve/veya rekürren trombozlu olgularda daha da arttığı bildirilmiştir. Serbest PS eksikliği olan hastalarda tromboz riskinin 1.6 (143), 8.5 (151) ve 11.5 (152) kat arttığını belirten yayınlar mevcuttur. Homozigot PS eksikliğinde veya PS düzeyi çok düşük olan heterozigot PS eksikliğinde, PC eksikliğinde olduğu gibi "yeni doğan purpura fulminansı", OAK kullanımına bağlı deri nekrozu görülebilir (129,145). PS eksikliğinde de süperfisiyel venöz tromboflebit yanı sıra DVT ve pulmoner tromboemboli (PTE) oldukça yaygındır. Bunların yanında önemli oranda da arteriyel trombozlar rapor edilmiştir (133-135,151,153-155). Vakaların yarısından fazlasında gebelik, şişmanlık, östrojen kullanımı ve immobilizasyon gibi predispozan bir faktörün varlığı dikkati çekmektedir (129,152).

#### 2.4.4. PROTROMBİN GEN MUTASYONU (PT G20210A)

Poort ve arkadaşları 1996 yılında venöz tromboemboli saptanan hastalarda moleküler teknikleri kullanarak protrombin genini ayrıntılı olarak incelemişler ve bu hastaların %18'inde 11. kromozomun p11-p12 bölgesinde lokalize protrombin geninin 3' translasyona uğramayan bölümünde (3' UTR) 20210. nükleotidde guanin yerine adenin geldiği tek baz değişim mutasyonu tanımlamışlardır. Normal kontrol grubunda ise bu değişim olguların sadece %1'inde gözlenmiştir (130). Bu mutasyon; genin transkripsiyonunu etkilememekte ancak translasyonunu arttırmaktadır. Bu da karaciğerden protrombin üretimi ve salınımında artışa neden olur. Protrombin artışı trombin artışını, bu da tromboz riskinde artışı beraberinde getirir (3,130,131,156). Bu mutasyonun varlığında tromboz riskinin arttığını gösteren bir çok çalışma mevcuttur (13,156-164). Sıklığı çeşitli bölgelere ve ırklara göre büyük farklılıklar göstermektedir. Kuzey Avrupa'da sağlıklı popülasyonda %1.7, güney Avrupa'da ve Ortadoğu'da %3-5 oranında bildirilmiştir (126,129,165).

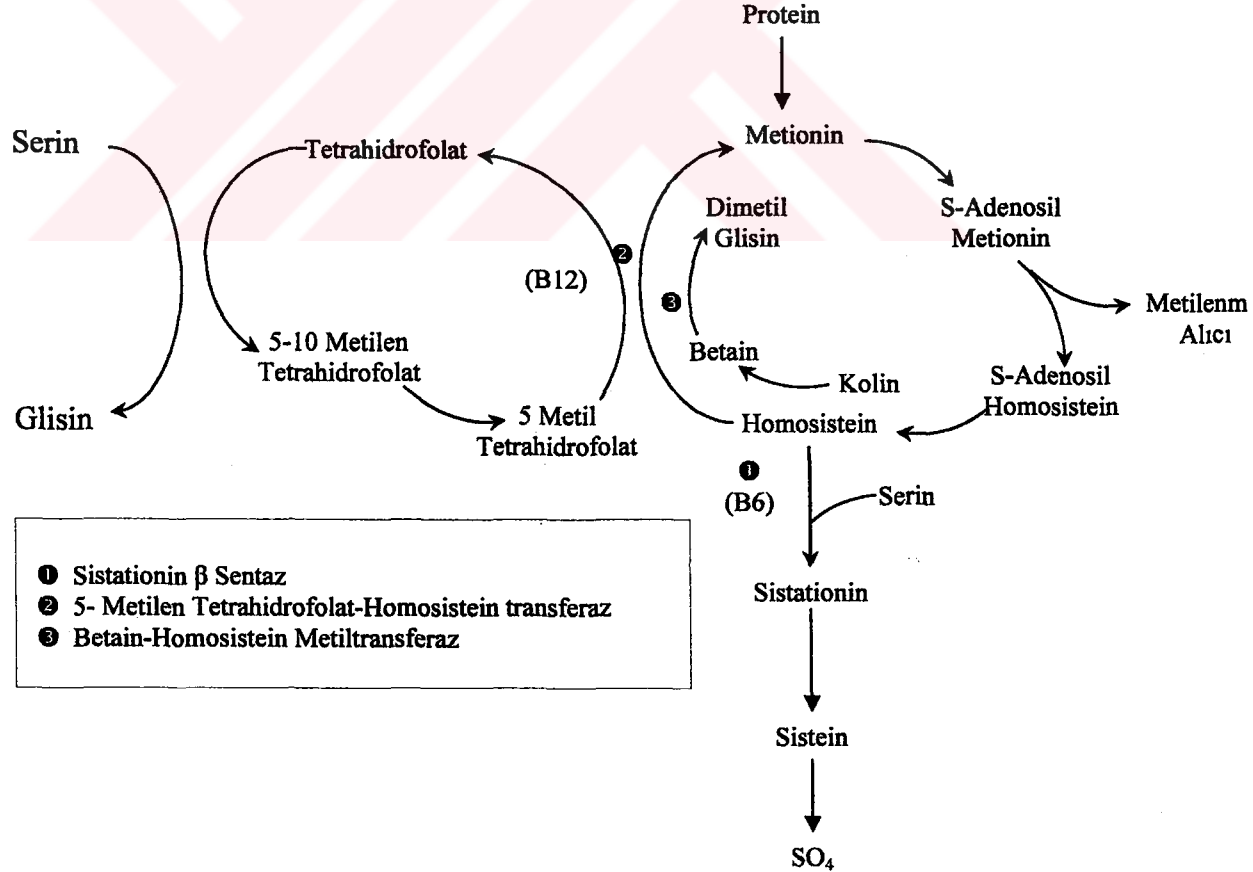
Venöz tromboembolide bu mutasyon %4-8 oranında saptanırken, rekürren trombozlu veya ailede tromboz öyküsü olanlarda %15-18 oranında görülmektedir (18,130,166,167). Bu mutasyonun varlığında tromboz riski 2-5.5 kat artmaktadır (13,130,168). Diğer kalıtsal trombofili nedenlerinde olduğu gibi spontan ve alışılmadık bölgelerde ven trombozları siktir. Hepatik ven trombozu (129), mezenterik ven trombozu (160) portal ven trombozu (129), serebral ven trombozu (169) ile ilişkisini bildiren yayınlar mevcuttur. Ayrıca protrombin gen mutasyonu olan Behçet hastalarında oküler tutulumun daha sık ve şiddetli olduğu da bildirilmiştir (170). Açıklanamayan fetal kayıp, düşük gestasyonel yaş ve plasental yetersizlik durumlarında da bu mutasyonun rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (163,171). Koroner ya da serebral arter trombozlu seçilmemiş olgularda mutant gen varlığı normal popülasyondan fazla bulunmamıştır (172,173). Bununla birlikte seçilmiş olgularda bu mutasyonun anlamlı oranlarda fazla olduğu karşılaştırmalı çalışmalarda gösterilmiştir (174-176). Heterozigot mutasyonun serebral iskemi riskini 3.8 kat arttırdığı, homozigot mutasyonun ise 208 kat arttırdığı bildirilmiştir (175). Bu mutasyonun varlığında, hiperlipidemi,

sigara ve OKS kullanımı; DVT, miyokard infarktüsü (MI) ve spinal kord infarktüsü için belirgin artmış risk oluşturur (129,177).

PT G20210A mutasyonu ile FV Leiden mutasyonu birlikteliği olabilmektedir (178,179,180,181). İki mutasyonun birlikte bulunduğu durumda spontan venöz tromboemboli, tromboz rekürrensi ve beklenmedik bölgelerde tromboz belirgin oranda artmaktadır (158,167,181-183).

#### 2.4.5. HİPERHOMOSİSTEİNEMİ

Homosistein; esansiyel aminoasit metionin'in sistein'e metabolik dönüşümü sırasında oluşan bir sülfidril aminoasittir. Hücre içi metabolizmasında; sistationin  $\beta$  sentaz, metilen tetrahidrofolat redüktaz gibi enzimler ile birlikte bu enzimlerin kofaktörü olan folat, kobalamin ve pridoksin önemli rol oynar (42,123,125,126) (Şekil-9).



Şekil-9: Homosistein'in İntraselüler Metabolizması (125)

Hiperhomosisteinemi bu homosistein metabolizmasında genetik ya da edinsel bozukluklar sonucu ortaya çıkar. Bunlardan en önemlisi sistasyonin  $\beta$  sentaz enzimidaki defektir. Bu durumda çok yüksek homosistein düzeyleri saptanabilmektedir. 5-10-metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzim eksikliğinde de hafif hiperhomosisteinemi tablosu gelişir. MTHFR enziminin termolabil varyantının homozigot varlığı hafif hiperhomosisteineminin en önemli nedenidir. MTHFR geninde 677.pozisyonda Citosin-Timin değişikliği sonucu enzimin 222.aminoasitinde alanin yerine valin gelmesi ile oluşan bu defektin sıklığı değişik popülasyonlarda %5-20 arasındadır (42,129,161,184). Bunların dışında daha nadir olarak diğer enzim defektleri de hafif hiperhomosisteinemiye neden olabilir. Folik asit, kobalamin ve pridoksin eksiklikleri, kronik böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği ve metotreksat, trimetoprim, kolestramin, karbamazepin gibi ilaçlar başlıca edinsel hiperhomosisteinemi nedenleridir (42,185).

Plazma homosistein düzeyi yüksek olan vakalarda vasküler komplikasyonların yüksek oranda gözlenmesi, homosisteinin aterosjenik ve trombofilik ajan olarak suçlanmasına neden olmuştur (161,185-187). Hiperhomosisteinemide nörolojik anormallikler, erken kardiovasküler hastalık (182), inme ve vasküler tromboz görülebilir (129,161,185,188). Hafif ve orta derecede hiperhomosisteinemi arterioskleroz ve arteryel tromboz için bağımsız risk faktörüdür (129,189). Hafif-orta düzeyli hiperhomosisteinemi ile venöz tromboz ilişkisini araştıran çalışmalar son yıllarda oldukça artmıştır. Erken yaşta görülen veya tekrarlayan venöz trombozun hafif-orta düzeyde hiperhomosisteinemi varlığı ile ilişkili olduğu ve ilk venöz tromboz epizodunda önemli oranda gözlendiği bildirilmiştir (129,190). Primer veya rekürren venöz trombozlu hastaların %10-25'inde plazma homosistein düzeylerinin yüksek olduğu ve hafif-orta hiperhomosisteineminin DVT gelişim riskini 2.5-3 kat arttırdığı yapılan çalışmalarda varılan ortak sonuçlardandır (125,126,129,185). Ayrıca yapılan çalışmalar; fetal kayıp, erken doğum, düşük ve preeklampsi gibi gebelik komplikasyonlarının kontrol grubuna göre homozigot MTHFR enzim defekti olanlarda daha fazla olduğunu göstermiştir (191).



MTHFR enzim defekti ve hiperhomosisteineminin, diğer kalıtsal trombofili nedenlerinin birlikteliğinde venöz tromboz ve VTE riskinin arttığı birçok çalışma tarafından desteklenmiş bir bilgi olmakla birlikte (13,158,161,191-193) , ek bir risk artışına neden olmadığı da ileri sürülmüştür (194). Hiperhomosisteineminin hangi mekanizma ile tromboz riskini arttırdığı net olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bununla ilgili değişik çalışmalar ve sonuçlar vardır. Damar endotelinde deskuamasyon, endotel düz kas hücrelerinde proliferasyon ve intimal hipertrofiye neden olduğu gösterilmiştir (129).

#### 2.4.6. FAKTÖR VIII DÜZEYİNDE ARTIŞ

Son yıllarda yapılan çalışmalarda FVIII yüksekliğinin VTE riskini 4-6 kat artırdığı ve VTE rekürrensi açısından güçlü risk faktörlerinden biri olduğu belirlenmiştir. İlk kez tromboz saptanan bireylerin yaklaşık %20'sinde FVIII yüksekliği olduğu ve FVIII'in akut faz reaktanı olmasına karşın, bu artışın akut faz reaksiyonundan bağımsız olduğu bildirilmiştir (126,129,195). FVIII plazma düzeyinin her 10 IU/DL artışında VTE rekürrensini nispeten 1.08 olarak saptanmıştır. FVIII düzeyinin 90 persantilin üzerinde olduğu vakalarda 2 yıl içindeki tromboz rekürrens oranı %37'dir (196).

#### 2.4.7. KALITSAL FİBRİNOLİTİK SİSTEM BOZUKLUKLARI

Tromboza neden olan kalıtsal fibrinolitik sistem anormallikleri çok nadirdir. Disfibrinojenemi, hipoplazminojenemi, displazminojenemi, plazminojen aktivatör inhibitör düzeyinde artma veya PAI-1 gen polimorfizmi gibi fibrinolitik sistem defektlerinin trombozla ilişkisi gösterilmiştir (2,131,145).

#### 2.4.8. AKTİVE PROTEİN C DİRENCİ (APC DİRENCİ)

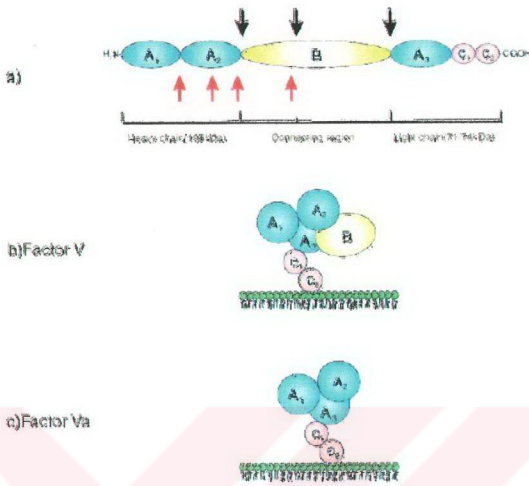
##### 2.4.8.1. FAKTÖR V (FV)

1947'de Norveçli Paul Owren tarafından keşfedilen FV hemostatik dengenin korunmasında merkezi bir rol üstlenir. 2196 aminoasit içeren FV molekülü yaklaşık 330 kD ağırlığında, tek zincirli bir glikoproteindir. Plazma konsantrasyonu yaklaşık 20 nmol/L (~0.007 g/L)'dir (11,60,80). Monosit makrofaj sisteminde ve megakaryositlerde de sentezlenen FV'in başlıca yapım

yeri karaciğerdir (11,80,131,197,198). Plazmadaki serbest formunun yanı sıra trombositlerin  $\alpha$  granüllerinde de bulunur, buradaki miktarı dolaşımdaki toplam FV'in yaklaşık %20-25'idir. Moleküler ağırlıkları ve fosfolipid membranlara afiniteleri birbirinden çok az farklı olan bu iki FV formunun ( $FV_1$  ve  $FV_2$ ) membrana bağlanma özellikleri, prokoagülan ve antikoagülan aktivitelerine de etkilidir. Fizyolojik şartlara benzer model sistemlerinde  $FV_1$ 'in  $FV_2$ 'den 7 kat fazla trombin oluşumuna neden olmasından dolayı daha trombojenik olduğu düşünülmektedir (11,67,198-200).

FV geni kromozom 1q23 üzerine yerleşmiş yaklaşık 80 kilobaz büyüklüğünde ve 25 exon içeren bir gendir. İzole cDNA, 6672 baz çifti (b.ç.) uzunluktadır ve 2224 aminoasitlik rezidü, 28 aminoasitlik sinyal peptid içeren bir protein kodlar (127,201).

FV,  $A_1-A_2-B-A_3-C_1-C_2$  şeklinde mozaik benzeri bir yapıya sahiptir (11,60,126,127). Bu yapı FVIII ve seruloplazmin ile büyük benzerlik gösterir (11,202). Trombin veya FXa tarafından Arg 709, Arg 1018 ve Arg 1545 bölgesinden parçalanarak aktifleşen FV'in B bölgesi serbestleşerek ağır ve hafif olmak üzere iki parçaya ayrılır. Ağır zincir üzerinde iki kısım ( $A_1-A_2$ ), hafif zincir üzerinde ise üç kısım ( $A_3-C_1-C_2$ ) vardır (Şekil-10). Aktifleşen FV vazgeçilmez bir FXa kofaktörüdür. FXa, FVa, kalsiyum ve fosfolipid membranlar protrombinaz kompleksini oluşturur (18,37,203) ve protrombinin trombine dönüşümünü gerçekleştirir (11,65,80,204,205).



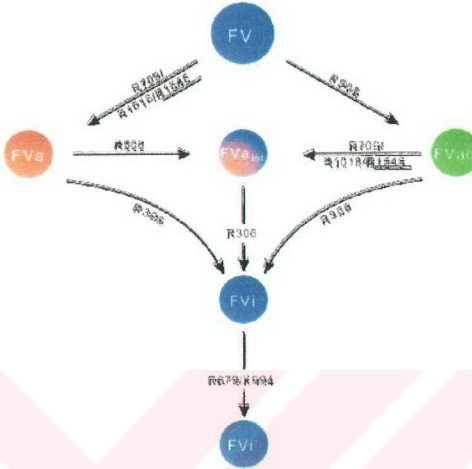
Şekil-10: FV molekülünün aktivasyonu (11)

FV molekülü 3A bölgesi ( $A_1$ - $A_2$ - $A_3$ ), 2C bölgesi ( $C_1$ - $C_2$ ) ve geniş bağlayıcı B bölgesi'nden oluşan mozaik şeklinde bir yapıya sahiptir. FV'nin aktivasyonu trombin tarafından Arg709, Arg1018 ve Arg 1545 bölgelerinden yıkılarak (siyah okla gösterilmiştir) sağlanır.

FVa'nın prokoagülan aktivitesi, FVa'nın APC tarafından Arg506, Arg306 ve Arg679 pozisyonlarındaki proteolizi ile azalır (60-63,65,126). Arg506 noktası düşük konsantrasyonlarda APC ve FV varlığında daha ön plandadır. Ancak Arg506 yıkılımı FVa'yı yalnızca kısmi olarak inaktive ederken, FVa'nın tamamen inaktif olabilmesi için Arg306 bölgesinden de yıkılması gerekmektedir. Arg679 bölgesinde yıkımın önemi tam olarak bilinmemekle birlikte daha az önemli görünmektedir (11,17,22,60-62,64,65,205-207) (Şekil-11).

Procoagulant

Anticoagulant



Şekil-11: FV'in inaktivasyon ve aktivasyon şeması (11)

FV molekülü Arg506 bölgesinden yıkıldığında antikoagülan FV (FVAc: yeşil renk ile gösterilmiştir) Arg709, Arg1018 ve Arg1545 bölgelerinden yıkıldığında ise prokoagülan FV (FVa: turuncu renk ile gösterilmiştir) oluşur.

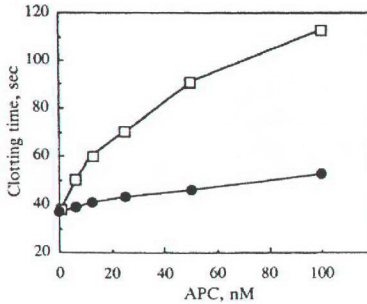
FVAc molekülü iki yöne ilerleyebilir. Eğer Arg709, Arg1018 ve özellikle Arg1545'den yıkılırsa yarı prokoagülan yolağı oluşturur (FVa int, kırmızı-mavi renk ile gösterilmiştir). Bu molekül protrombin aktivasyonunda sınırlı kofaktör aktiviteye sahiptir. Arg306'dan yıkılırsa potansiyel prokoagülan aktivitesi kaybolur (FVi mavi renk ile gösterilmiştir).

Prokoagülan FV (FVa) ise protrombin aktivasyonunda kofaktör olarak görev alan temel moleküldür. FVa'nın prokoagülan aktivitesinin kontrolü APC tarafından sağlanır. Bu molekülün de Arg506'dan yıkımı parsiyel aktif moleküle (FVa int) dönüşüm ile, Arg306'dan yıkımı aktivitenin tamamen kaybı ile sonuçlanır (FVi). Yani FVa aktivitesinin down regülasyonu Arg306'dan yıkımı ile sağlanır. İnaktif FVi'nin Arg679 ve/veya Arg994 bölgesinden yıkımı ile potansiyel proteoliz gerçekleştirilmiş olur.

Görüldüğü gibi FV iki fonksiyon görmektedir; hem trombin oluşumunu azaltan antikoagülan yolu indükler, hem de prokoagülan yolun bir elemanıdır (11,17).

#### 2.4.8.2. APC DİRENCİ PATOGENEZİ

APC direnci terimi; invitro olarak denek plazmasında APC'ye karşı anormal olarak azalmış antikoagülan yanıtı tanımlanmaktadır (12,15,18). Dahlback ve arkadaşları, 1993 yılında normal plazmaya APC eklendiğinde FVa ve FVIIIa'nın parçalanmasına bağlı olarak aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT)'nin uzaması ve bu değerin APC eklenmeden önceki aPTT'ye oranının artması gereğinden yola çıkarak yaptıkları çalışmada, venöz tromboz saptanan, birbirleri ile akraba olmayan 3 hastanın plazmasına APC eklenmesi ile beklenen antikoagülan yanıtın az ya da hiç olmaması durumunu APC direnci olarak tanımlamışlardır (Şekil-12). Aynı hastanın venöz tromboz öyküsü olan yakınlarında da APC direncinin saptanması bu bozukluğun genetik bir defekte bağlı olabileceğini düşündürmüştü ve aile ağacına bakıldığında otozomal dominant kalıtım paterni gösterdiği görülmüştür. Teorik olarak APC direncine sebep olabilecek; APC'ye karşı gelişen bir antikor veya bir proteaz inhibitörünün varlığı, PS eksikliği, FVIII veya FV genlerinde mutasyon ve PC aktivasyonunda rol oynayan bilinmeyen bir kofaktörün eksikliği gibi olasılıklar araştırılmıştır. APC inhibitörleri, fonksiyonel PS eksikliği, FVIII geninde APC direncine neden olacak mutasyon tespit edilememiştir. PC'ye karşı otoantikolar veya APC fonksiyonunu inhibe eden antifosfolipid antikorlar APC direncinin kalıtsal özelliğinden dolayı ekarte edildikten sonra APC direncinden APC'nin parçalanma bölgelerinden birini etkileyen FV genindeki bir mutasyonun veya bilinmeyen bir APC kofaktör eksikliğinin sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (12).



Şekil-12: Hasta plazmasında APC'ye zayıf antikoagülan yanıt (12)

●: hasta plazması □: kontrol plazma

Daha sonra yapılan çalışmalarda APC dirençli olguların plazmalarına saf FV ve FVIII eksik plazma eklenip APC direnci ölçümleri tekrarlandığında; FV eksik plazma eklendiğinde direncin devam ettiği, FVIII eksik plazma eklendiğinde ise direncin olmadığı gözlemlenerek, APC direncinin anormal FVa'dan kaynaklandığı bildirilmiştir (208). FV defektini destekleyen bir başka gözlem de APC dirençli plazmadan kısmen izole edilmiş FV'in APC direncini normal plazmaya taşıyabildiğidir (47). APC direncinin moleküler patolojisi ilk kez Bertina ve arkadaşları tarafından 1994 yılında aydınlatılmıştır. FV'i kodlayan gende 10. exondaki 1691.nükleotidde Guaninin Adenin ile yer değiştirmesi (G1691A) sonucu ortaya çıkan mutant gen, FV'in ağır zincirinin 506. pozisyonundaki Arginin (R) yerine Glutaminin (G) gelmesine neden olmaktadır. Bu mutasyona FVR<sup>506Q</sup>, mutant allele FV:Q<sup>506</sup> veya FV<sub>Leiden</sub> isimleri verilmiştir (128). Yapılan çalışmalar sonucunda FV genindeki DNA polimorfizmi arasındaki genetik bağlantı kesinleşmiştir (3,11,17,47,55,60,131,153,201,209).

FVa'nın APC tarafından inaktivasyonu hızlı ve yavaş olmak üzere iki fazlı bir reaksiyondur. Normal FVa ilk önce Arg506 bölgesinden parçalanır. Hızlı faz (dominant yol) olarak adlandırılan bu faz sonucunda FVa'nın aktivitesi yaklaşık %60 azalır, bunu takiben yavaş faz ile Arg306 bölgesinden yıkılarak kalan %40'luk aktivite de yok olur. FV Leiden mutasyonu varlığında ise mutant FV normal FVa'ya göre 10-20 kat daha yavaş olacak şekilde sadece yavaş monofazik yıkılım gösterir. Arg306 bölgesinden (minör yol) yavaş fakat tamamen yıkılır (17,18,22,60-63,131,205,206,210). FXa, Arg506 aracılığı ile gerçekleşen hızlı fazı spesifik olarak inhibe ederken, PS Arg306 aracılığı ile gerçekleşen yavaş fazı hızlandırır. Bu nedenle FXa'nın FV Leiden üzerine etkisi yok iken PS yavaş fazı 20 kez artırır (17,206). Mutasyona uğramış FVa normal prokoagülan FV aktivitesi gösterir (11) fakat APC aracılığı ile olan inaktivasyonun yavaş olması (62,206,210) trombinaz kompleksinin stabilizasyonuna, artmış trombin oluşum hızına (dolayısıyla protrombin F<sub>1+2</sub> artışına), FVIII ve FV'in feedback aktivasyonuna yol açar. Koagülasyonun artmış aktivasyon hızı beraberinde FV'e bağımlı APC kofaktör aktivitesinin kaybına, APC direncinin artışına ve hiperkoagülabl bir duruma neden olur.

Yakın zamanda APC direncinde ilgili tek moleküler mekanizmanın bu olmadığı ayrıca FV'in FVIII inaktivasyonunda da APC kofaktörü olarak rol oynadığı ve mutant FV varlığında bu antikoagülan özelliğini yerine getiremeyeceği için tromboza eğilim yarattığı da gösterilmiştir (11). Mutant FV geninin yavaş da olsa inaktive ediliyor olması FV Leiden mutasyonunun neden venöz tromboz için hafif risk faktörü olduğunu açıklamaktadır (17,129,211). FV Leiden'in APC yerine başka proteazlar tarafından 506. pozisyon dışında başka bölgelerinden inaktive ediliyor olması hafif risk oluşturduğunu açıklamak için öne sürülen diğer bir görüştür (129). APC direnci olan hastaların %90-95'inden heterozigot, %1-5'inden homozigot FV Leiden mutasyonu sorumludur (11,17,128,208,209,212).

FV Leiden mutasyonundan farklı olarak FV yapısında ortaya çıkan bazı nadir polimorfizm ve mutasyonlar nedeni ile de APC direnci oluşabilir. Bu gruptaki en iyi bilinen mutasyonlar FV Cambridge ve FV Hong Kong Chinese mutasyonlarıdır. FV molekülünde 306.pozisyondaki Arginin yerine Threonin gelmesi ile FV Cambridge, Glycin gelmesi ile Hong Kong mutasyonu oluşmaktadır (126,213,214). FV Cambridge açıklanamayan APC direnci olan bir hastada tanımlanmış olup, oldukça nadir görülmektedir (214). Aksine FV Hong Kong Çin popülasyonunda oldukça sık olup tromboz için bir risk faktörü olarak görülmemektedir. Ayrıca bu mutasyonun APC direnci ile arasındaki ilişki de tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (213).

Bir diğer APC direnci fenotipine neden olan mutasyon, FV geninin 13. exonundaki A4070G polimorfizmidir ki; bu durum FV'in 1299. pozisyonundaki His(H) yerine Arg(A) gelmesine neden olmaktadır. Yalnız FV Leiden mutasyonu ile karşılaştırıldığında, FV Leiden ve FV (A4070G) için çift heterozigotluk venöz tromboemboli riskini 3-4 kat arttırmaktadır. Bu mutasyon ülkemizde %8.5, Kıbrıs Türk kesiminde %4.2 olarak bildirilmiştir (215).

Aynı exonda görülen diğer bir aminoasit değişikliği G1628A (R485K); Afrika'da %32.4, Batı-Hindistan'da %6.9, Avrupa ve Tayland'da %59 gibi

önemli ölçüde sık bulunmakta ve trombofili ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde bu mutasyonun sıklığı sağlıklı kişilerde %4.7, DVT'lu hasta populasyonunda ise %6.8 bulunmuştur (216).

Yakın geçmişte bir çok araştırmacı R<sub>2</sub> adı verilen alleli (veya HR<sub>2</sub> polimorfizmi) hafifçe artmış venöz trombozla ilişkilendirmiştir. R<sub>2</sub> alleli, FV geni üzerinde bağlantılı birçok mutasyon ile karakterizedir. R<sub>2</sub> haplotipi tek başına tromboz açısından normal FV' e göre ilave risk değildir, FV Leiden mutasyonu ile bir arada bulunduğu zaman tromboz riski oluşturabilmektedir (11,217,218). Ancak Ulu ve arkadaşları tarafından, HR<sub>2</sub> haplotipinde homozigotluğun tromboz için risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (219).

APC direnci oluşturan FV geni ile ilişkili bir diğer durum heterozigot FV Leiden mutasyonu ile FV eksikliği birlikteliğidir. Bu kişilerde yalnızca FV Leiden alleli eksprese edildiği ve dolaşan FV mutant olduğu için homozigot FV Leiden'e benzer fenotip ortaya çıkar, bu nedenle pseudohomozigot FV Leiden olarak adlandırılır (11,220).

Yakın zamanda kromozom 18 üzerinde APC direnci fenotipi ve FVIII seviyelerini etkileyen yeni bir lokus tanımlanmış ve bunun tromboz için yeni bir risk faktörü olabileceği kanısına varılmıştır (221). Dolaşan yüksek FV seviyelerinin tromboz riskini artırıp artırmadığını analiz etmek için çalışmalar yapılmıştır ancak FVIII ile ilgili yayınların aksine FV plazma seviyeleri, trombozla istatistiki olarak anlamlı ilişki göstermemiştir (222).

Bu tabloların dışında edinsel bazı durumlarda da APC'ye direnç oluşabilir. Antifosfolipid antikor sendromu (223), anti FV antikor varlığı (224), HELLP (hemolitik anemi, yükselmiş karaciğer enzimleri ve trombositopeni) sendromu (225-227), OKS ve östrojen kullanımı (228,229), invitro fertilizasyon tedavisi (230), gebelik (231) ve kanser (232) gibi kazanılmış durumlarda APC direnci oluşabileceği bildirilmiştir. İlginç olarak Heterozigot FV Leiden mutasyonuna sahip donörlerin karaciğer transplantasyonu ile fenotipi aktardıkları ve alıcıda



APC direnci fenotipi saptanırken FV Leiden mutasyonunun bulunmadığı gösterilmiştir (233,234).

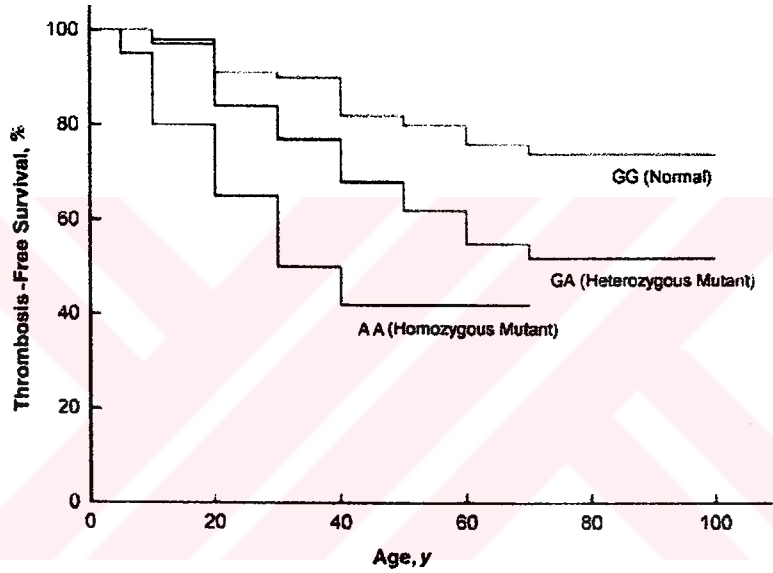
#### 2.4.8.3. EPİDEMİYOLOJİ

FV Leiden mutasyonu ilk olarak 1994 yılında keşfedilmiş olmasına rağmen trombofilili olgularda yüksek sıklıkta saptanması nedeni ile ilgi odağı haline gelmiş ve yapılan yoğun popülasyon çalışmaları ile dünyadaki dağılımı tespit edilmeye çalışılmıştır. FV Leiden prevalansı bir ülkeden diğerine, bölgeden bölgeye ve etnik gruplara göre değişkenlik gösterir (18). Özellikle güney Avrupa'da yüksek oranda bulunurken Amerikan toplumundaki prevalans %0.45-2.2 arasında değişmektedir. Güney Afrika, Çin ve Japonya'da prevalans daha düşük oranlardadır (17,235-237).

#### 2.4.8.4. APC DİRENCİ VE VENÖZ TROMBOZ

FV mutasyonunun neden olduğu APC direnci tromboz için önemli bir risk faktörüdür (12,19-21,153,209,238) ve APC direnci varlığında en yaygın klinik prezantasyon derin ve yüzeysel ven trombozudur (14,17,151,158-160,162,208,239,240). Pulmoner emboli ve alışılmadık bölgelerdeki trombozlar PC, PS ve ATIII eksikliğine göre daha azdır (129,135,151). Yapılan klinik çalışmalarda ilk venöz tromboz epizodu geçiren bireylerin %15-40'ında APC direnci tanımlanmıştır, bu oran diğer kalıtsal anormalliklerden oldukça yüksektir (13-15). Seçilmiş olgularda bu oran %60'lara ulaşmaktadır (11,16-18,129). Leiden çalışma grubu, 70 yaş altında DVT geçirmiş olan 471 kişilik hasta ve 474 kişilik kontrol grubunu içeren araştırmasında; hastaların %21'inde APC direnci saptarken, kontrol grubunda bu oranın %5 olduğunu bildirmişlerdir (21). Bir diğer çalışmada DVT geçirenlerde FV Leiden prevalansı %40.1 olarak bulunurken (13), başka bir çalışmada %21.1 (161) ve bir diğerinde %7,8 olarak tespit edilmiştir (167). Normal bireylere göre heterozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda venöz tromboz riski 5-10 kat, homozigotlarda ise 30-140 kat artmıştır (6,10,12,18-22,62). Homozigot FV Leiden mutasyonu tromboz için belirgin risk artışına rağmen, homozigot PC veya PS eksikliğine göre daha zayıf bir protrombotik durum yaratmaktadır (151,212). Örneğin homozigot PC eksikliği, yenidoğan

döneminde purpura fulminans gibi ağır bir klinik tablo meydana getirirken, FV Leiden için homozigot olanlar ileri yaşlarda bile asemptomatik olabilmektedir (135). Rosendaal ve arkadaşları homozigot mutasyonun daha sık olarak kadınlarda izlendiğini bildirmişler (21) ancak bu bilgi daha sonraki çalışmalarda desteklenmemiştir. Heterozigot FV Leiden mutasyonuna sahip kişilerde ilk trombotik olay ortalama olarak 45 yaşlarında görülmekte iken (241), homozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda ilk VTE epizodu daha genç yaşlarda (31-44 yaş) ortaya çıkmaktadır (19,21,49) (Şekil-14).



Şekil-13: FV Leiden varlığında ortalama trombotik olay görülme yaşları (19).

Heterozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda VTE riski yaşla birlikte artar ve taşıyıcı olmayanlara göre anlamlı yükseklik gösterir (135). Yapılan prospektif kohort çalışmada, VTE insidans oranlarının, mutasyonu taşımayan kişilere göre mutasyonu taşıyanlarda 50-59 yaş arasında 1.23, 60-69 yaş arasında 1.61 ve 70 yaş üstünde 5.97 kat artış gösterdiği saptanmıştır (129). Vakaların yaklaşık yarısında ilk tromboz atağı saptandığında predispoze bir faktör bulunmazken (idiopatik), %30'unda gebelik veya OKS kullanımı, %20'sinde cerrahi gibi altta yatan başka predispoze bir durumun varlığı dikkati çekmektedir (164,242).

FV Leiden mutasyonu varlığının venöz tromboz için önemli risk faktörü olduğunu vurgulayan bir çok çalışma mevcuttur (4,6,14,17,19,159,208, 209,240,243, 244). İsrail'de yapılan, 1993-1997 yılları arasında en az bir kez

DVT epizodu geçiren 162 hasta ve 336 sağlıklı kontrol grubunu içeren araştırmada hastaların %40.1'inde FV Leiden mutasyonu saptanırken, kontrol grubunda bu oran %3.9 olarak bulunmuştur. Aynı hasta grubunda protrombin gen mutasyonu %18.5 (kontrol grubunda %5.4), MTHFR enzim mutasyonu %22.8 (kontrol grubunda %14.3) bulunarak FV Leiden mutasyonunun venöz trombozda daha sık rol oynadığı bildirilmiştir (13).

PTE saptanan hastaların %6-9'unda FV Leiden mutasyonu mevcuttur. İlginç olan durum submassif PTE'li hastalarda FV Leiden mutasyon olasılığının masif PTE'li hastalara göre daha yüksek olmasıdır. Benzer şekilde fatal PTE ile FV Leiden arasında güçlü bir ilişki kurulamamıştır (17,118,164,245). Dolayısıyla FV Leiden mutasyon varlığı DVT ve PTE için risk oluşturmakla birlikte, DVT PTE'ye göre daha yüksek oranlarda görülmektedir (119,164,239,246). FV Leiden mutasyonunun PTE için daha az risk oluşturmasının sebebi trombozun yerleşimi ile ilişkili bulunmuştur. Seçilmemiş olgularda PTE en sık iliofemoral ven trombüslerinden kaynaklanır, FV Leiden mutasyonuna sahip kişilerde oluşan tromboz ise daha çok iliofemoral ven distalinde yerleşmektedir (247).

FV Leiden mutasyonunun serebral ven trombozlu erişkinlerde de sık görülen bir trombofili nedeni olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (248,249). Alışılmadık lokalizasyonlardaki örneğin; serebral sinüsler (248,250), mezenter ven (160), portal ven (251,252), hepatik ven (178,251,253-257), trombozlarında da FV Leiden mutasyon insidansı yüksektir. Santral retinal ven oklüzyonunda FV Leiden mutasyonu varlığının etyolojik faktör olabileceğini bildiren çalışmaların yanı sıra, aksi görüş bildirenlerde vardır (258).

Bunların yanında çeşitli araştırmacılar tarafından; pelvik ven trombozu ile FV Leiden mutasyonu ilişkisi (259), rekürren arterio-venöz şant trombozlu hastalarda FV Leiden mutasyonu varlığı (260), sistemik trombozlu yenidoğanda postmortem olarak FV Leiden mutasyonu tespiti (261), rekonstrüktif cerrahi sonrası replant parmakta gelişen venöz tromboz (262), trombotik mikroanjiopatili hastalarda artmış FV Leiden mutasyon sıklığı (263), Takayasu arteriti ile FV Leiden

mutasyonu ilişkisi (264) gibi çalışma sonuçları rapor edilerek FV Leiden mutasyonu ile ilgili araştırma sınırları genişletilmiştir.

APC direnci bulunan hastalarda ilk trombotik epizodu izleyen birinci yılda tromboembolik olayların görülme olasılığı %8-10'dur. Simroni ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada FV Leiden mutasyonu taşıyan kişilerde kümülatif rekürren tromboemboli insidansı %39.7 iken bu anormalliğin olmadığı hastalarda %18.3 olarak saptanmıştır (129).

Semptomatik FV Leiden mutasyonu taşıyıcılarının birinci derece akrabalarında her yıl için tromboz gelişme olasılığı %0.45'dir. 15-30 yaş grubunda bu oran %0.25 iken 60 yaş üzerinde %1.1'dir. Ailesel tromboz öyküsü olanların yaklaşık %50'sinde APC direnci saptanmıştır (135,242). Buna karşılık bazı çalışmalarda da FV Leiden mutasyonu olan ailelerde yıllık tromboemboli riskinin düşük olduğu ve sürekli profilaksinin gerekli olmadığı görüşü bildirilmektedir (60,211).

#### 2.4.8.5. APC DİRENCİ VE DİĞER HASTALIKLAR

Son yıllarda FV Leiden mutasyonu ile Behçet hastalığı ilişkisini vurgulayan yayınların sayısı artmıştır (265-267). Ülkemizde Zarrinanbour ve arkadaşları, 32 Behçet hastasında APC direnci prevalansını %34.3 olarak bildirmişler, bu olguların venöz tromboz öyküsü olan 18'inde %44.4, venöz tromboz öyküsü olmayan 14'ünde de %22.2 oranında mutasyon belirlemişlerdir (268). İtalya'da Silingardi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise Behçet hastalarında DVT ile FV Leiden mutasyonu varlığı ilişkili bulunmamıştır (170). Bunlara ek olarak çalışmalarda varılan bir diğer sonuç oküler tutulumu olan Behçet hastalarında FV Leiden mutasyonunun daha sık olduğudur (266,267,269).

Son yıllarda inflamatuvar barsak hastalığı ile FV Leiden mutasyon ilişkisini irdeleyen çalışmalar yayınlamıştır. Bazı çalışmalarda FV Leiden mutasyonu varlığının hastalık gelişiminde rolü olabileceğini vurgulanırken (11), bazılarında

da inflamatuvar barsak hastalığı olanlarda FV Leiden mutasyonunun sık olmadığı ve venöz trombozda rol oynamadığı bildirilmiştir (270,271).

Buerger hastalığı ile birlikteliğinin araştırıldığı çalışmalarda FV Leiden mutasyonu ile Buerger hastalığı arasında bir ilişki saptanmamıştır (272,273). Günümüze kadar Budd-Chiari hastalığı ile FV Leiden mutasyonu birlikteliğinin ve artmış venöz tromboz riskinin bildirildiği bir çok araştırma ve vaka raporu sunulmuştur (178,251,253-257).

Yine yapılan diğer çalışmalarda bazı hemofili hastalarında FV Leiden mutasyonunun varlığı ve bu vakalarda kanama komplikasyonlarının daha az olduğu bildirilmiştir (274,275). Miyeloproliferatif hastalıklar, özellikle Esansiyel Trombositoz (ET) ve Polisitemia Vera (PV) edinsel trombofili nedenlerindedir. İtalya'da 304 ET ve PV'lı hastada yapılan çalışmada FV Leiden mutasyonu varlığının tromboz riskini arttırdığı ve VTE rekürrensi ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (276). Yine başka bir çalışmada benzer sonuçlara ulaşılırken (256) ülkemizde Günay ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada PV'lı olgulardaki tromboz ile APC direnci varlığı arasında ilişki bulunmayarak PV'nın tromboz için APC direncinden bağımsız bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (277).

#### 2.4.8.6. APC DİRENCİ VE GEBELİK

Normal bir gebelikte hemostatik sistemde önemli değişiklikler olmakta ve hemostatik mekanizmalar trombüs oluşumuna yatkın olan yeni bir dengeye kavuşmaktadır (278). Gebelikte edinsel APC direnci gelişebilir. Bu durumdan FV ve FVIII düzeylerindeki artış ve serbest PS düzeylerindeki azalmanın sorumlu olduğu belirtilmiştir (279,280-282).

Preeklampsi/eklampsi, plasental abrupsiyon, açıklanamayan ölü doğum ve fetal gelişme geriliği gibi gebelik komplikasyonlarının varlığında, APC direnci ve FV Leiden mutasyonunun değerlendirildiği çalışmalarda FV Leiden mutasyonu varlığı, gebelik komplikasyonları ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur (281,283,284). Özellikle erken fetal kayıp (1.trimestr) ile sonuçlanan gebeliklerde

trombofili oranları çok yüksek bulunurken (%66), en yaygın trombofili nedeni olarak da FV Leiden mutasyonu (%10.3-25) rapor edilmiştir (163,279,285). Ancak diğer bir çalışmada erken düşük nedeniyle tetkik edilen 50 hastada FV Leiden mutasyonu varlığı kontrollere göre farklı bulunmamıştır (286). Yapılan çalışmalarda tekrarlayan geç fetal kayıpların etyolojisinde plasental trombozun önemli olduğu ve bunda da FV Leiden mutasyonu başta olmak üzere (yaklaşık %30) kalıtsal trombofili nedenlerinin rol oynadığı bir çok çalışmada varılan ortak sonuçtur (163,281,285,287-289). Düşük dışında plasental abrupsiyon, açıklanamayan ölü doğumlarda da FV Leiden mutasyonu yüksek oranlarda (%16.5-42.5) tespit edilmiştir (281,284,290-293). Bunlara ek olarak intrauterin gelişme geriliği ile FV Leiden mutasyon ilişkisini gösteren çalışmaların (281,292,294) yanı sıra, kalıtsal trombofili varlığının düşük gestasyonel yaş açısından risk oluşturduğu da bildirilmiştir (295). Lindqvist ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada FV Leiden mutasyonuna sahip gebelerde uteroplasental dolaşımda vasküler rezistans artışı olduğu bildirilmiştir (296). Gebelik seyrinde ortaya çıkan tromboemboli olaylarının yaklaşık %28-46'sından FV Leiden mutasyonu sorumlu tutulmaktadır. Tromboembolik olaylar özellikle gebeliğin 2. ve 3. trimestrinde meydana gelmektedir (281,287,297-299). Carrie ve arkadaşları tarafından yapılan şiddetli preeklampsi vakalarının alındığı bir çalışmada anne veya bebekte FV Leiden mutasyonu bulunması ile şiddetli preeklampsi arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken (300) bir çok çalışmada FV Leiden mutasyonu ile preeklampsi, rekürren preeklampsi ve eklampsi arasında kuvvetli bir ilişkiden bahsedilmektedir. FV Leiden mutasyonu varlığında şiddetli preeklampsi riskinin %10-67 gibi yüksek oranlarda olduğu ve FV Leiden mutasyonu varlığının preeklampsi riskini en az 3 kat arttırdığını bildiren yayınlar mevcuttur (281,292,293,297). Yine tipik laboratuvar bulguları (hemolitik anemi, yükselmiş karaciğer enzimleri ve trombositopeni) ile preeklampsinin şiddetli bir şekli olan HELLP sendromunda %33'ü aşan oranlarda APC direnci ve bunun yarısına varan değerlerde FV Leiden mutasyonu bildirilmiştir (225-227).

Yukarıda anlatılan bütün nedenlerden dolayı anamnezinde venöz tromboz, önceki gebeliklerinde preeklampsi, spontan düşük, inutero gelişme geriliği,

açıklanamayan ölü doğum gibi bulguları olan gebelerde mutlaka FV Leiden mutasyonu araştırılmalıdır (289,299,301,302).

#### 2.4.8.7. APC DİRENCİ ve ARTERYEL TROMBOZ

FV Leiden mutasyonu olan genç kadın ve erkeklerde koroner tromboz oranı yüksek bulunmuştur. Bu hastalarda rölatif risk 1.4 olup, özellikle sigara içimi başta olmak üzere; obezite, hipertansiyon ve diyabet varlığında risk 4-32 kat artmaktadır (20,174,303). Yine arteriyel tromboz, ateroskleroz ve MI ile FV Leiden mutasyonu arasında önemli ilişkinin varlığını (304-306) ve MI için FV Leiden mutasyonunun bağımsız risk faktörü olduğunu (297,307) bildiren çalışmaların yanında; koroner arterlerde intima-media kalınlaşmasında FV Leiden mutasyonunun rolünün net olmadığını (308) ve FV Leiden mutasyonu ile MI arasında ilişkinin saptanmadığını (307,309-311) bildiren çalışmalar da mevcuttur. Yine FV Leiden mutasyonu ile ani koroner ölüm (173) ve atriyal fibrilasyon (312) arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ancak özellikle genç yaşlarda etiyojisi açıklanamayan arteriyel tromboz olaylarında FV Leiden mutasyonu akla getirilmelidir (313). FV Leiden mutasyonu ile arteriyel rekonstrüksiyon sonuçlarının değerlendirildiği iki ayrı çalışmada; arteriyel rekonstrüksiyon sonrası vasküler oklüzyon gelişenlerde FV Leiden mutasyonu; bir çalışmada sık bulunurken (314) diğerinde bu şekilde bir ilişki görülmemiştir (315). İskemik stroke'lu hastalarda APC direnci bulunma oranı %0-38 arasında değişmektedir (316). İskemik stroke ile APC direnci arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmaların bir kısmında iskemik stroke ile APC direnci arasında anlamlı bir ilişki saptanırken (316-319); bir kısmında ise APC direnci varlığının iskemik stroke için risk faktörü olmadığı ileri sürülmüştür (188,309,311,320-322). Bunların yanı sıra santral retinal ven oklüzyonunda (258) olduğu gibi santral retinal arter oklüzyonlu olgularda da FV Leiden mutasyon varlığı gösterilmiştir (323,324). Ayrıca çeşitli vaka raporlarında katastrofik arteriyel tromboemboli (325), baziler arter trombozu (326,327), periferik retinal neovaskülarizasyon (Eales hastalığı) (328), anterior iskemik optik nöropati (329) ve internal karotis arterin bilateral disseksiyonu (330) ile FV Leiden mutasyon ilişkileri bildirilmiştir.

Tüm araştırmalara rağmen FV Leiden mutasyonu ile arteryel tromboz arasındaki ilişki henüz venöz trombozdaki kadar netlik kazanmamıştır (49,310).

#### 2.4.8.8. APC DİRENCİNDE TROMBOZ İÇİN PREDİSPOZAN FAKTÖRLER

FV Leiden mutasyonu yalnız başına hafif bir hiperkoagulabl durum oluştururken ilave edinilmiş veya kalıtsal trombofilik risk faktörlerinin varlığında tromboz sıklığı ve ciddiyeti artmakta ve daha erken yaşlarda görülmektedir (9,11,17). Bu ilave risk faktörleri; PC eksikliği (135,238,331), PS eksikliği (153,205,260,332,333), AT eksikliği (135,261), MTHFR enzim defekti (158), Protrombin G20210A gen mutasyonu (157,158,181,183,334,335) gibi herediter nedenler olabileceği gibi hiperhomosisteinemi (192), antifosfolipid antikorları (223,224,323,336), malign hastalıklar (232), Behçet ve inflamatuvar barsak hastalıkları (266-268,271), fiziksel inaktivite, cerrahi veya hormonal değişiklikler (337,338) gibi akkiz nedenler olabilmektedir. Bunların yanında daha da nadir olmak üzere FV Leiden mutasyonu ile FVIII yüksekliği (195), TFPI düşüklüğü (339) ve PAI-1 gen polimorfizmi (340) birliktelikleri de rapor edilmiştir.

Multipl kalıtsal trombofilik defekt bir hayli yaygındır. Venöz tromboembolili hastaların %15'inden fazlasından kombine genetik defekt sorumludur (13,71). PS eksikliği ve FV Leiden mutasyon birlikteliği literatürde %39 olarak bildirilmiştir (153). Her iki kalıtsal defekti birlikte taşıyan bireylerde trombotik olay görölme riski 1.6 kat artarken, ilk trombotik olayın görölme yaşı ortalama 32.5 olarak saptanmıştır (135). PC eksikliği ile FV Leiden mutasyonu birlikteliği %14-19, her iki kalıtsal defekti birlikte taşıyan ailelerde tromboz sıklığı %73 olarak bildirilmiştir (60,238,331). Sistemik neonatal trombozlu bir olguda heterozigot FV Leiden ve AT III eksikliği birlikteliği gösterilmiş olup (261), heterozigot ATIII eksikliği ve FV Leiden mutasyonu birlikteliği yapılan çalışmalarda %14 olarak bildirilmiştir (25). Her iki defekti birlikte taşıyanlarda VTE riski 4.4 kat artmıştır (135). FV Leiden mutasyonu ve Protrombin gen mutasyon birlikteliği sağlıklı populasyonda %0-0.5 oranında bildirilirken venöz tromboz geçirmiş populasyonda bu oran %3.1 ile %7.4 arasında değişmektedir



(13,158,161,164,183,341,342). Ve bu iki mutasyonun birlikteliğinde tromboz riski %41.6 olarak rapor edilmiştir (342). MTHFR enzim defekti ile birliktelik ise sağlıklı popülasyonda %0.29-0.98 iken, tromboz öyküsü olanlarda %5.7-6.1 oranında görülmektedir (13,158,161,341). Her iki defekti birlikte taşıyanlarda venöz tromboz riski 17 kat artmıştır (161). FV Leiden mutasyonu ile tip I plazminojen eksikliği birlikteliğinin, venöz tromboz riskinde ek bir artışa sebep olmadığı gösterilmiştir (343).

Akkiz sebeplerden en önemlisi hormonal konum ile ilgilidir. OKS kullanan kişilerin %5-10'unda edinsel APC direnci gelişmektedir (11,280,344). FV Leiden mutasyonu varlığı ile özellikle üçüncü jenerasyon OKS kullanımı arasında sinerjistik etkiler gösterilmiş ve tromboz gelişimi için kombine rölatif risk, tek tek riskler ele alındığında öngörülenden daha fazla bulunmuştur (229,248,337,338,345-347) (Tablo-XI).

Tablo-VI: OKS Kullanımı, FV Leiden Mutasyonu Ve Tromboz İlişkisi (11)

	Tromboz riski	OR
<b>FV Leiden mutasyonu (-)</b>		
OKS kullanmayan	0,8	1,0
OKS kullanan	3,0	3,7
<b>FV Leiden mutasyonu (+)</b>		
OKS kullanmayan	5,7	6,9
OKS kullanan	28,5	34,7

OKS kullanımı sırasında tromboembolik komplikasyon gözlenen kadınların %25-30'unda APC direnci saptanmıştır (297,344,346). Eğer bir kadında heterozigot FV Leiden mutasyonu var ve OKS kullanıyor ise tromboz riski 35-50 kat, homozigot mutasyona sahip ve OKS kullanıyor ise tromboz riski birkaç yüz kat artış göstermektedir (6,21,299,344,346). Bu bilgiler ışığında OKS veya hormon replasman tedavisi başlamadan önce APC direnci açısından araştırma yapılması gerekliliği, bunun sonuç-maliyet ilişkisi yönünden ekstra bir harcama getirmediğini bildiren çalışmalar (348) olmakla birlikte henüz bu durumlarda genel tarama yönünde bir fikir birliği yoktur (11,71).

Ovarian hiperstimülasyon olgularında (349,350) ve polikistik over sendromlu hastalarda (351) FV Leiden mutasyon sıklığı normal populasyondan farklı bulunmamıştır.

Kanser hastalarında da kazanılmış APC direnci yaygındır ve bu hastalarda oluşan hiperkoagülabilite nedenlerinden biridir (232,352). Ülkemizde Tiftik ve arkadaşları diabetes mellituslu hasta popülasyonunda edinsel APC direnci oranının diğer hasta gruplarına göre daha yüksek olduğunu ve bu bulgunun diabetik popülasyonun artmış kardiovasküler hastalık sıklığı için ilave bir risk faktörü olabileceğini bildirmişlerdir (353).

## 2.5. KALITIMSAL TROMBOFİLİDE TANI YÖNTEMLERİ

Kalitimsal trombofili tanısı için yapılacak testler uygun seçilmediği takdirde hem zaman, hem maddi kayıba yol açmakta hem de yanıltıcı sonuçlar doğurabilmektedir. Her hastada kalitimsal trombofili aranmaktansa belirli durumlarda akla getirilmesi daha doğrudur. İlk olarak kapsamlı bir değerlendirme yapılarak Tablo-II'de belirtilen edinsel trombofili nedenlerinin dışlanması gereklidir. Aşağıda belirtilen durumlarda akla kalitimsal trombofili gelmeli ve bu yönde tanısal testler yapılmalıdır (1,16,125,129,131);

- 40-45 yaşından önce oluşan ve nedeni açıklanamayan tromboemboli atakları olanlarda
- Alışılmadık lokalizasyonlarda (mezenterik, portal, hepatik venler, üst ekstremitte venleri, serebral sinüsler) tromboz gelişenlerde
- Tekrarlayıcı, gezici veya masif tromboz öyküsü olanlarda
- Ailesinde tromboemboli öyküsü olanlarda
- Warfarine bağlı deri nekrozu öyküsü olanlarda
- Neonatal tromboz (purpura fulminans, yenidoğanda DIC) öyküsü olanlarda

Kalitimsal trombofili nedenleri araştırılırken testler titizlikle seçilmelidir. Genç yaşta tromboz olması trombofili araştırılması için önemli bir nedendir. Bununla beraber APC direnci olan bireylerde ilk tromboz atağının ileri yaşlarda da görülebileceğini dikkate almak gereklidir. Trombofili tanı yöntemlerinin

maliyeti bir hayli yüksektir. Bu nedenle öncelikle tarama testlerine karar verirken, araştırılan kalıtsal bozukluğun değişik tiplerini kapsayabilen testlerin seçilmesi ekonomik yükü ve laboratuvar emeğini azaltacaktır. Bu tarama testinden sonra, bozukluğun alt tiplerini aydınlatan özel testler ve genetik bozukluğu ortaya koyacak moleküler genetik incelemelere geçilmelidir (71,126,354,355).

Trombofiliye yönelik test sonuçları akut olaylara yaklaşımı etkilemez, çünkü trombozun akut tedavisi nedenine bağlı değildir. Prensipte olarak test sonuçları tekrar tromboz geçirmeyi önlemeye yönelik karar etkileyecek, klinisyenin hastaları ne kadar uzun ve ne kadar yoğun tedavi edeceğine karar vermesine yardımcı olacaktır. Ayrıca kalıtsal trombofili saptanan bireylerde ilave edinsel risk faktörleri varlığında (OKS, hormon replasman tedavisi, cerrahi, travma, gebelik) yoğun profilaktik önlemlerin alınmasını sağlayacaktır. Testler aynı zamanda hastanın defekti taşıyan ancak halen asemptomatik olan yakınları için de yararlı olacaktır (6,71).

Trombozdan hemen sonraki akut devrede (ilk haftalarda) PC, PS ve ATIII aktiviteleri tüketime bağlı olarak düşük bulunabildiğinden bu ölçümler akut dönem geçtikten sonra yapılmalıdır. Ayrıca heparin kullanımı AT konsantrasyonlarında %30'lara kadar varan azalmalara neden olabilir. Bu olgularda AT aktivitesi, heparin kesilip oral antikoagülan (OAK) tedaviye geçildikten sonra bakılmalıdır. Uzun süre OAK kullanmış olgularda AT aktivitesi artabileceği dolayısıyla heterozigot AT eksikliği olan olguların gözden kaçabileceği de unutulmamalıdır. Heparin kullanımı PC ve PS aktivitesini etkilemezken, OAK alanlarda ise PC ve PS aktiviteleri düşük bulunabilir. Bu kişilerde OAK kesilip yerine düşük molekül ağırlıklı heparin başlanmalı warfarinin yarı ömrü 44 saat olduğu için 7-10 gün sonra PC ve PS aktivitelerine bakılmalıdır. Heparin ve OAK etkisine dair endişeler ikinci jenerasyon APC direnci ölçümlerini, PT gen mutasyonu metodlarını ve AFA veya homosistein ölçümlerini etkilemez. Pıhtılaşma temeline dayanan testler kullanıldığında sonuçların güvenilirliği açısından mutlaka çalışılan örneklerde lupus antikoagülanının bulunup bulunmadığı araştırılmalıdır (71,355,356).

Hiperkoagülabilité testlerinde fonksiyonel ölçümleri etkileyen akkiz durumlar Tablo-VII gösterilmiştir.

Tablo-VII: Hiperkoagülabilité testlerinde fonksiyonel ölçümleri etkileyen akkiz durumlar (117,356)

Antitrombin	Heparin kullanımı, yeni geçirilmiş tromboz, karaciğer hastalığı, DİC ve nefrotik sendromda azalır.
Protein C	Warfarin tedavisi, yeni geçirilmiş tromboz, cerrahi, DİC, karaciğer hastalığı, K vitamini eksikliği veya L-asparaginaz tedavisinde azalır.
Protein S	Warfarin tedavisi, hamilelik, OKS, veya hormon replasman tedavisi, akut faz yanıtı, karaciğer disfonksiyonu, proteinüri, K vitamini eksikliği, akut tromboz, DİC, yeni geçirilmiş cerrahi veya L-asparaginaz tedavisinde azalır.
Homosistein	Yeni geçirilmiş trombozda, B12, folat ve B6 eksiklikleri, renal yetmezlik, hipotiroidi, metotreksat, fenitoin veya teofilin gibi ilaçlar, maligniteler, hamilelik ve menapozda artar,
APC direnci	1.jenerasyon testler: Yüksek FVIII düzeyi, lupus antikoagülan, akut faz yanıtı 2. jenerasyon testler: Yüksek lupus antikoagülan, hamilelik
FVIII	Akut faz durumlarında artar, lupus antikoagülan varlığında hatalı olarak azalır.

Tablo-VIII'de kalıtsal trombofilinin sık veya iyi belirlenmiş nedenlerinin araştırılmasında önerilen testler ve bu testlerin uygulama aşamaları sunulmaktadır.

Tablo-VIII: Kalıtsal Trombofilinin Laboratuvar Tanısında Uygulanacak Testler (16,71,357)

	İLK AŞAMA	İKİNCİ AŞAMA
Antitrombin	-Heparin kofaktör-sentetik substrata dayalı fonksiyonel testler	-İmmunassay -İmmunelektroforez -DNA analizi
Protein C	-Sentetik substrata dayalı fonksiyonel testler (yılan zehiri aktivatör olarak kullanılır)	-İmmunassay -İmmunelektroforez -DNA analizi
Protein S	- Pıhtılaşma testlerine dayanan fonksiyonel testler	-İmmunassay -İmmunelektroforez -DNA analizi
APC direnci	- Pıhtılaşma testlerine dayanan fonksiyonel testler (modifiye yöntemde test öncesi FV'den yoksun plazma ile dilüsyon)	-FV Leiden mutasyonunun DNA analizi
Homosistein	-Açlıkta metionin yükleme testi sonrasında plazma total homosistein aktivitesine bakılması	-En sık görülen MTHFR ve CBS enzim defektlerinin DNA analizi
Protrombin gen mutasyonu	-DNA analizi -Plazma protrombin aktivitesi	

### 2.5.1. APC DİRENCİ VE FV LEİDEN MUTASYON ANALİZİ

APC direncinin saptanmasında koagülometrik testler, FV Leiden mutasyonunun belirlenmesinde de molekül genetik incelemeler kullanılmaktadır.

#### 2.5.1.1.APC DİRENCİ ÖLÇÜMÜ

Koagülometrik olarak APC direnci, ikisi aPTT ölçümüne dayanan ve biri de kromojenik olmak üzere üç farklı yöntem ile değerlendirilmektedir. Normalde aPTT reaksiyonuna dışarıdan APC eklenmesi FVa ve FVIIIa'nın parçalanmasını artırarak pıhtılaşma zamanını uzatır. Ancak APC direnci olan durumlarda bu uzama gerçekleşmez (49,205,358).

Dahlback tarafından tanımlanan aPTT ölçümüne dayanan yöntemde (Coatest APC resistance, chromogenix, Sweden) ortama APC ilave edilerek ve edilmeden iki kez aPTT ölçülür. Bu iki sonucun birbirine oranlanması ile APC duyarlılık oranı (APC-Sensitivity ratio : APC-SR) elde edilir (15-18,71,208, 358,359).

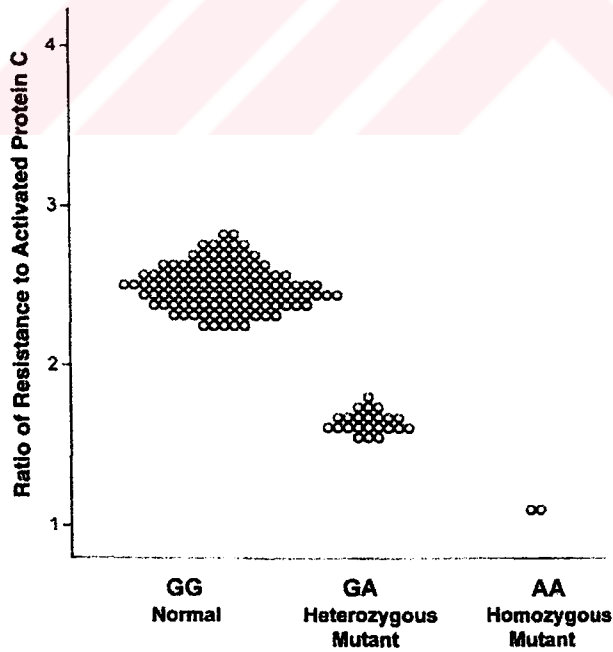
$$\text{APC-SR: } \frac{\text{aPTT} + \text{APC}}{\text{aPTT}}$$

Bu oranın belli değerin altında olması APC direncini ifade eder. Bu oran hesaplanırken kullanılan reaktifler ve koagülometri cihazının yaratacağı farklar dikkate alınmalı ve her laboratuvar kendi cut-off değerini belirlemelidir (16,17,70,71,360). Toplumda APC direnci insidansı rölatif olarak yüksek bulunduğundan cut-off değerlerini belirlerken plazma havuzunun kullanılması tavsiye edilmez. Eğer plazma havuzu kullanılacaksa, havuza katılan tüm bireylerin tek tek testleri yapılmalı ve her iki uçtaki değerler dikkate alınmamalıdır. Ölçüm sırasında plazmanın trombositlerden fakir hale getirilmesine de dikkat edilmelidir (16,354,360).

Bunların dışında APC-SR'ni etkileyen durumlar; Sitrat yoğunluğu; %3.8'lik sitrat kullanıldığında APC-SR %6 oranında artmaktadır. Ortamdaki  $\text{CaCl}_2$  yoğunluğu; yoğunluk arttıkça APC-SR da artmaktadır. APC'nin elde edilmiş yöntemi ve ortamdaki APC yoğunluğu; ortamdaki APC yoğunluğu APC-SR'yi yükseltmektedir. İdeal APC yoğunluğu 0.7  $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Ortamdaki PS yoğunluğu; PS aktivitesi %20'nin altında ise APC-SR düşük bulunarak yalancı pozitifliğe neden olabilir. Diğer pıhtılaşma faktörlerinin düzeylerindeki değişiklikler; FII, FX, FIX, FVIII ve FV'in aktivite düzeylerindeki değişiklikler APC-SR'yi etkileyebilmektedir. APC-SR en fazla FII ve FX düzeyinden etkilenmektedir. Faktörlerin aktiviteleri düştükçe APC-SR artmakta yalancı negatifliğe neden olmaktadır. OAK ve heparin tedavisi; OAK tedavi alanlarda FII ve FX düzeyleri çok belirgin olarak azalmaktadır. Bu nedenle bu hastalarda güvenilir APC-SR ölçümü yapılamaz. Heparin tedavisi de aPTT'yi uzattığı için ortamdaki heparin 'hepzym' ile uzaklaştırıldıktan sonra APC-SR belirlenmelidir. Lupus

antikoagülanı, gebelik ve OKS kullanımı; edinsel APC direncine neden olabildikleri için APC-SR'yi etkileyebilirler. APC-SR'nin örneğin hazırlanmasındaki aşamalardan (örneklerin dondurulup, çözünmesi gibi) pek fazla etkilenmediği gösterilmiştir (49,358,360).

Eğer tüm değişkenler kontrol altına alınırsa standart APC direnci testinin FV Leiden mutasyonunu gösterme duyarlılığı ve özgüllüğü %85-95 civarındadır. Ancak yukarıda tanımlandığı gibi standart APC direnci testi; OAK ve heparin kullananlarda, gebelerde, PS eksikliği olanlarda, lupus antikoagülanı varlığında, FVIII yüksekliğinde veya pıhtılaşma faktör eksiklikleri olanlarda kullanılamaz. Bu durumda hasta plazmasına 1/5 oranında FV'den yoksun plazma karıştırılarak pıhtılaşma faktörlerinin düzeylerinin normalleştirildiği modifiye APC direnci testi kullanılır. Modifiye test ile duyarlılık %100'lere kadar çıktığı için tarama testi olarak kullanılması önerilir (16-18,71,358,360). Ayrıca sonuca göre FV Leiden mutasyonunun heterozigot ve homozigot ayrımı yapılabileceği savunulmaktadır (19) (Şekil-14)



Şekil-14: Normal bireylerde, heterozigot ve homozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda ortalama APC-SR değerleri (19).

APC-SR üzerine cinsiyetin etkisi de gösterilmiş, APC-SR oranı erkeklerde kadınlara göre daha yüksek saptanmıştır. Svensson ve arkadaşları ise APC-SR'nin yaş, cinsiyet ve vücut ağırlığından etkilenmediğini bildirmişlerdir (14). Modifiye APC direnci testi yüksek lupus antikoagülanı varlığında, pseudohomozigot FV Leiden mutasyonu varlığında yine yanlış sonuç verebilir. Bu yüzden bazı araştırmacılar lupus antikoagülanı varlığında direk moleküler yöntemlere geçmek gerektiğini, bazı araştırmacılar da hasta plazmasına fosfolipid eklenerek bunların nötralize edilmesini önermektedir (247).

ProC Global test; bir diğer APC direnci ölçen koagülasyon testidir. ProC Global analizi PC yolağının işlevsel değerlendirilmesini global olarak yapmak üzere geliştirilmiş bir pıhtılaşma analizidir. *Agkistrodon Contortix* yılan venomu (ACV) tarafından aktifleştirilen endojen APC'nin aPTT'yi uzatma yeterliliğine dayanır (69-73). PC aktivasyon süresi-normalleştirilmiş oranı (PCAT-NR) olarak ifade edilen ProC Global testi sonuçları PC yolağını etkileyen PC eksikliği, PS eksikliği ve APC direnci olanlarda patolojik olarak bulunur.

$$\text{PCAT-NR: } \frac{\frac{(\text{aPTT} + \text{ACV})}{(\text{aPTT} - \text{ACV})}}{\frac{(\text{aPTT} + \text{ACV})}{(\text{aPTT} - \text{ACV})}} \quad \begin{array}{l} \text{örnek} \\ \text{Normal} \\ \text{plazma havuzu} \end{array}$$

Her laboratuvarın kendi cut-off değerini belirleme gerekliliği savunulsa da (70) PCAT-NR'nin 0.85'den büyük olduğu durumlarda normal, küçük olduğu durumlarda da PC yolağı patolojisi düşünülmesi gerektiğini belirten yayınlar mevcuttur (69,72,73). PS eksikliğinde, OAK tedavisi alanlarda ve karaciğer yetmezliğinde PC yolağı zaten etkilendiği için bu test uygun değildir (69). Modifiye ProC Global testi PC, PS veya FV'den eksik plazma kullanılarak, *Agkistrodon Contortix* yılan venomu miktarı artırılarak uygulanır. Bu testin standart ProC Global testine göre daha sensitif ve spesifik olduğu savunulmaktadır (72).

Kromojenik APC cevabı yöntemi (immunochrom ®, APC response, immuno, Wien, Austria) FVIIIa'nın APC aracılığı ile inaktivasyonuna dayanır. Bu



yöntemde plazma örnekleri FIX, FX, fosfolipid, CaCl<sub>2</sub> ve az miktarda trombin ile dilüe edilir. APC'nin varlığı ve yokluğunda kromojenik substrat kullanılarak meydana gelen FXa saptanır (49,361).

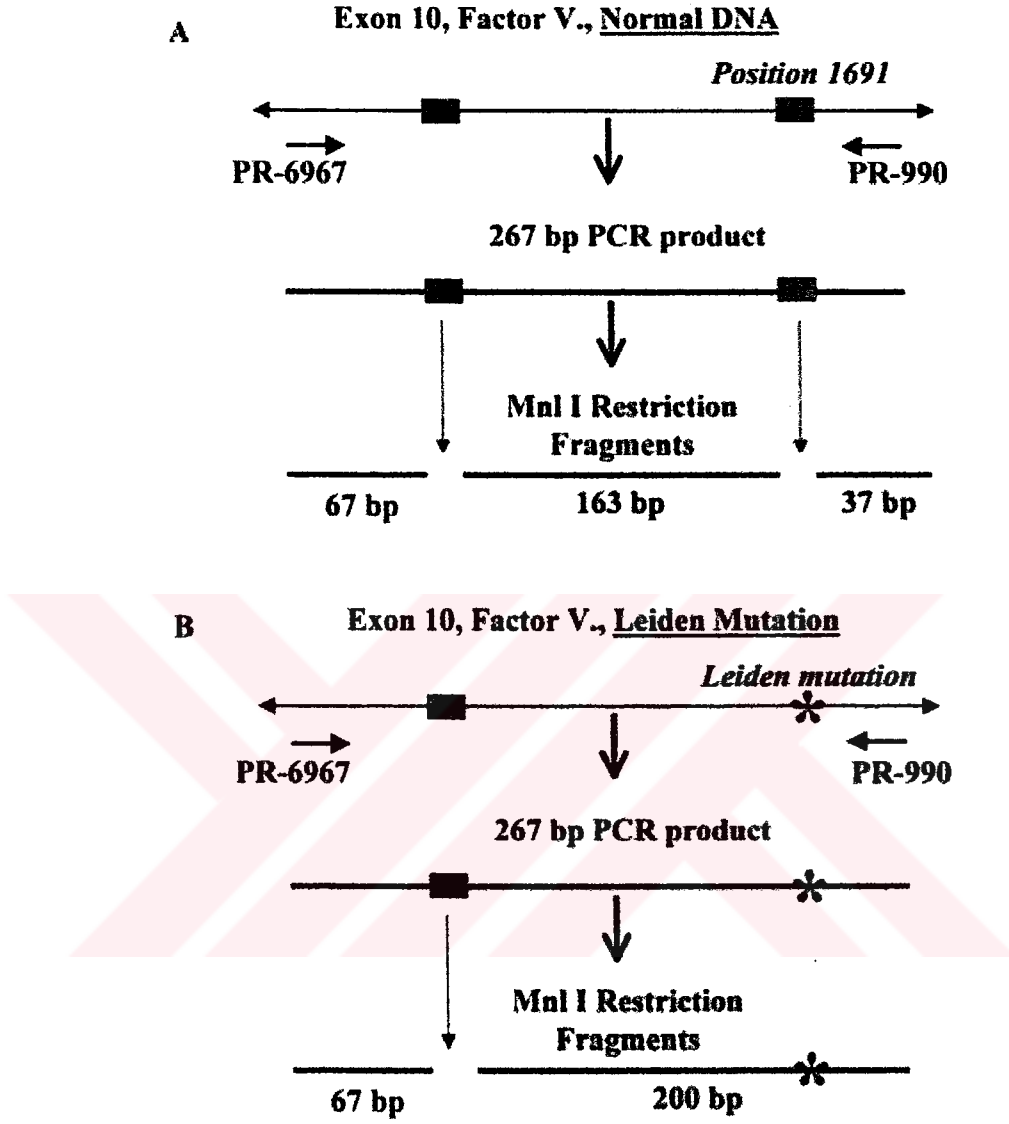
FXa bazlı kronometrik APC direnci testinde en az modifiye Coatest APC direnci testi kadar iyi olduğu savunulmaktadır . Bu test de fosfolipid, FXa, APC ve CaCl<sub>2</sub> varlığında FV'den eksik plazma ile dilüe edilmiş test plazmasının pıhtılaşma zamanını ölçmeye dayanır. Referans plazma pıhtılaşma zamanı ile oranlanır. Vitamin K'ya bağlı pıhtılaşma faktörlerinin eksikliklerinden, PS eksikliğinden ve lupus antikoagülanı varlığından ve düşük molekül ağırlıklı heparin kullanımından etkilenmediği savunulmaktadır (362). Artık son yıllarda FV Leiden mutasyonun belirlemek için molekül sel incelemeler yapmadan önce tarama testi olarak FX aktivasyonuna dayanan fonksiyonel testlerin daha güvenilir olduğu savunulmaktadır (363,364). Bu amaçla geliştirilen STA-STACLOT APC direnci testi (Diagnostica Stago,Asnieres, France) FX'un *Crotalus viridis helleri* yılan venomu tarafından spesifik olarak aktivasyonuna dayanır. Test ile hastanın plazmasında venom ve APC varlığında, pıhtılaşma süresi saniye olarak hesaplanır. Bu test PC, PS eksikliği olanlarda veya FV Leiden ile kombine defektlerde %100 duyarlı ve özgül bulunmuştur. Ayrıca OAK kullananlarda da kullanılabilceği ve test sonucuna göre FV Leiden mutasyonunun heterozigot ve homozigot ayrımı yapılabileceği savunulmaktadır. Ancak lupus antikoagülanı varlığında duyarlılığın %69'a özgülüğün %91'e düştüğü gözlenmiştir (364). Ülkemizde bu testin güvenilirliği test edilmiş ve duyarlılığı %98 olarak hesaplanmıştır (365).

#### 2.5.1.2. MOLEKÜLSEL TANI YÖNTEMLERİ

Molekül sel tanı yöntemleri, APC direnci olan hastalarda FV Leiden mutasyonu'nun varlığını araştırmak için yapılmaktadır. Sıklıkla PCR temeline dayalı teknikler uygulanmaktadır. Bu teknikler; Polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı restriksiyon enzim analizi (PCR-RFLP : Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) (128,366-368), Alel Spesifik Olgonükleotid (ASO) hibridizasyon (368-372), Reverse Dot- Blot yöntemi (373),

Multiplex PCR (374-377) ve Heteroduplex teknoloji (378) gibi isimler altında anılmaktadır. Günümüzde gelişen yazılım, elektronik ve malzeme bilimi teknolojilerinin de katkısı ile bu temel yaklaşımlar güncel cihaz sistemleri ile desteklenmektedir. Buna örnek olarak Light Cycler (374,375,379-384), Nano Chip mikroeletkonik dizi teknolojisi (380,385), Third Wave™ teknolojisi (Invader™) (385,386), READIT (The Reversed Enzyme Activity DNA Interrogation Test) (387) verilebilir.

Birçok laboratuvar FV Leiden mutasyonunun moleklssel düzeyde analizi için PCR-RFLP yöntemini kullanmaktadır. Bu yöntem FV Leiden mutasyonunun moleklssel düzeyde tanısını sağlayan ilk yöntemdir (128). Yöntemin yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü, kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle bir çok merkez tarafından tercih edilmekte ve diğer moleklssel tanı yöntemleri için referans kabul edilmektedir (128,366,368). İlk kez 1985'te bilim dünyasına sunulduğundan itibaren PCR, hem araştırmalarda, hem de klinik laboratuvarlarda yeni bir çığır açmıştır. PCR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi *in vitro* koşullarda amplifiye etmek için uygulanan tepkimelere verilen ortak isimdir. PCR-RFLP yönteminin prensibi, PCR rnlerinin 4 veya 6 nükleotidlik özgün baz dizilerini tanıyıp o bölgeden kesen restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak sonuçların bir jel üzerinde gösterilmesi esasına dayanır (128). Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilime yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır. Nokta mutasyonlarında tek bir bazın değişmesi enzimin kesim bölgesinin ortadan kalkmasına yada yeni bir kesim bölgesi oluşmasına neden olabilir. *Moraxella nonliquefciens*'den izole edilen restriksiyon endonükleaz enzimi *Mnl I* ; faktör V geninde iki spesifik bölgeyi tanıır ve katalitik bölgesi ile de fosfodiester bağlarını kırarak üç farklı uzunlukta fragmantların oluşmasına neden olur. Bu kesim bölgelerinden birisi FV Leiden mutasyon bölgesidir. Faktör V genindeki 1691. nükleotid guanin olduğu zaman kesim yapan *Mnl I* restriksiyon enzimi adenin olduğu zaman kesim yapamaz (şekil-15) (128,366,367).

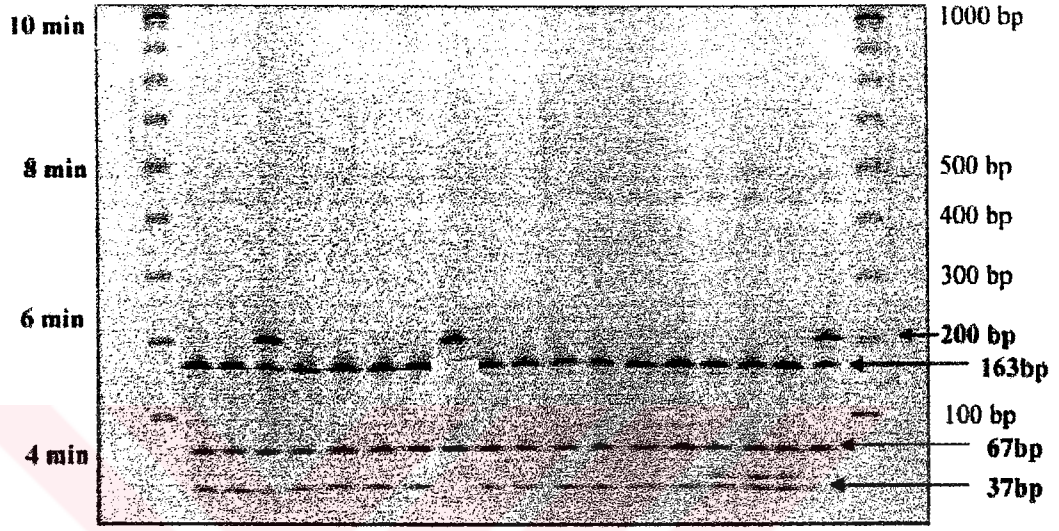


Şekil-15: FV Leiden mutasyonu'nun tanısında PCR-RFLP analizinin şematizasyonu: A: Mutasyon taşımayan 267 baz çifti (bp) uzunluğundaki FV PCR ürünü *Mnl I* enzimi ile kesildiğinde 67, 163 ve 37 bp uzunluğunda üç DNA fragmanı elde edilmektedir. B: FV Leiden mutasyonu varlığında ise 1691. nükleotiddeki guanin yerine adenin geçmesi ile kesim noktalarından biri ortadan kalkmakta ve 200 ve 67 bp uzunluğunda iki DNA fragmanı elde edilmektedir (367).

Heterozigot bireylerde normal olan FV geni iki kesim noktasından da kesilecek 67, 163 ve 37 bp uzunluğunda DNA fragmanları meydana gelecek, mutasyon taşıyan FV geni ise tek kesim noktasından kesilecek ve 67 ve 200 bp uzunluğunda DNA fragmanları oluşacaktır. Bunlar elektroforezde yürütülüp, agaroz jel UV transilluminatörde görüntülendiğinde 37, 67, 163 ve 200 bp

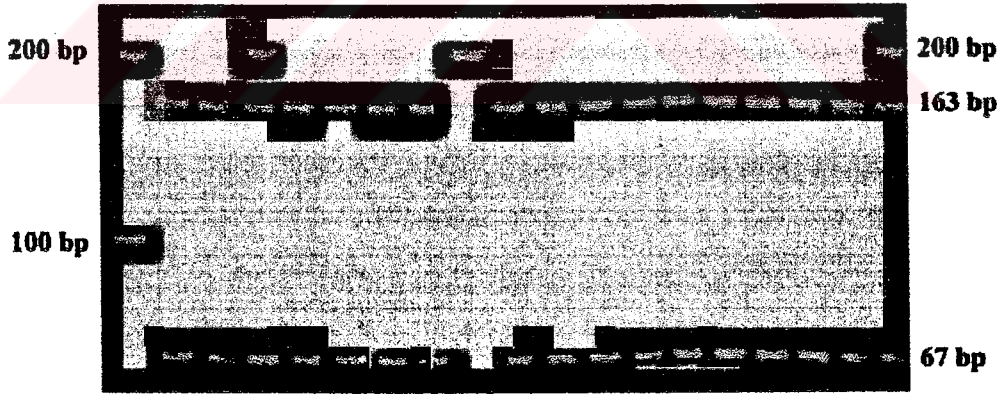
uzunluğunda bantların varlığı görülecektir. Homozigot bireylerde ise, normal FV geni bulunmadığı için tek bir noktadan kesim sonucu sadece 200 ve 67 bp uzunluğundaki DNA fragmanları görülebilecektir (Şekil-16).

**A: Ultra ince tabaka jel elektroforezinde görünüm:**



LANES S 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 S

**B: Slab (kalın) jel elektroforezinde görünüm:**



LANES: S 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Şekil-16: FV Leiden gen mutasyonları: 3, 18 nolu örnekler heterozigot, 8 nolu örnek homozigot diğerleri normal genotipi temsil etmektedir. 37 bp uzunluğundaki bantlar boyutlarının küçük olmasından dolayı kalın jelde görüntülenememektedir. Ultra ince tabaka jel elektroforezinde küçük fragmanların da görüntülenebilmesi nedeniyle daha hassas olduğu ve daha hızlı analiz imkanı sağladığı savunulmaktadır (367).

FV Leiden mutasyonu başka bir restriksiyon endonükleaz ile de saptanabilir. FV Leiden mutasyonundaki tek baz değişimi sonucunda guanin nükleotidinin adenine dönüşümüyle *Haemophilus influenzae*'den izole edilen *Hind III* restriksiyon endonükleazı için bir tanıma bölgesi yaratılmış olur. Bu enzim mutasyon taşımayan normal FV genini kesmezken, mutasyon taşıyan PCR ile çoğaltılan FV genini bu noktadan keserek 2 fragmana ayırır (376).

PCR tekniğinden yola çıkılarak geliştirilen tekniklerden biri olan **Multiplex PCR**; birden fazla gen bölgesini amplifiye etmek için birden çok primer çiftinin kullanıldığı PCR yöntemidir. Multiplex PCR dizaynındaki ilk basamak primer çiftlerinin seçimidir. İstenen bütün gen bölgelerinin optimal amplifikasyonunun sağlanmasında ısı döngülerinin doğru ve uygun seçimi çok önemlidir (374-377).

**Alel spesifik oligonükleotid hibridizasyon**'da amplifiye edilmiş DNA bir naylon membran üzerine konduktan sonra ayrı ayrı oligonükleotidler ile hibridize edilir. Bu oligonükleotidlerin dizileri birbirlerinden mutasyona uygun tek nükleotid değişikliği ile ayrılırlar (368,369,371).

**Reverse Dot-Blot yöntemi**'nde mutasyona uyan oligonükleotidler ve normal DNA dizisine uyan oligonükleotidler nitroselülöz / naylon membrana emdirilerek sabitlenmektedir. Amplifiye edilen DNA radyoaktif madde, enzim gibi işaretleyici ile birlikte işaretlenerek hibridizasyona alınmaktadır (373).

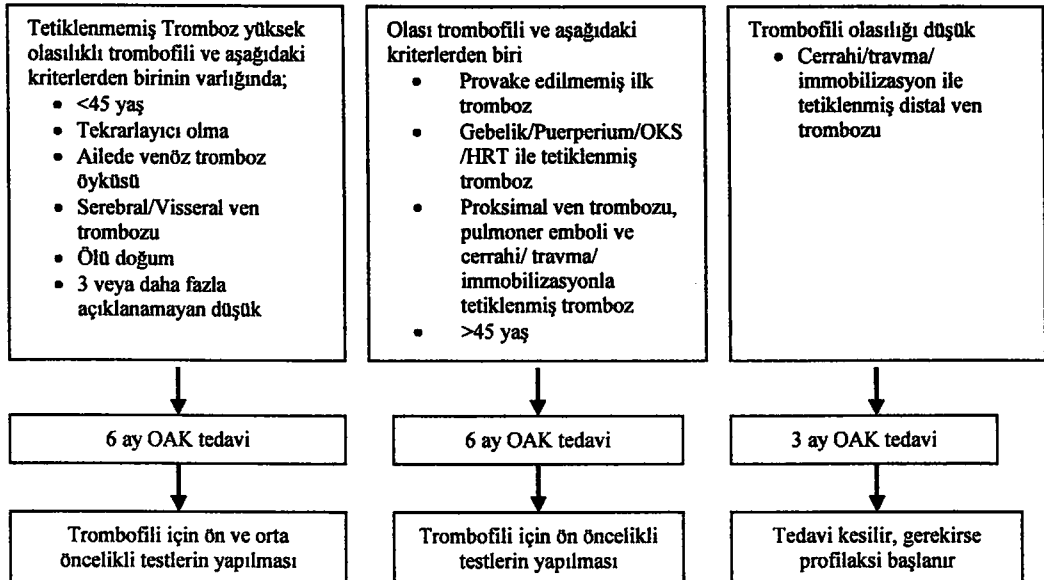
**Light Cycler Sistemi ile "Real Time PCR"**; Light Cycler sisteminin diğer PCR cihazlarına göre en büyük avantajı amplifikasyon ürün oluşumunun anında "real-time" izlenebilmesidir. Burada PCR'da kullanılan primerler fluoresans işaret ile kullanılmaktadır. Cihaz, PCR'nun gelişimini işaretli primeri görerek izlemektedir. Hızlı analiz, yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik avantajlarının olduğu savunulmaktadır (374,375,379-384).

## 2.6. KALITIMSAL TROMBOFİLİDE TEDAVİ YAKLAŞIMLARI

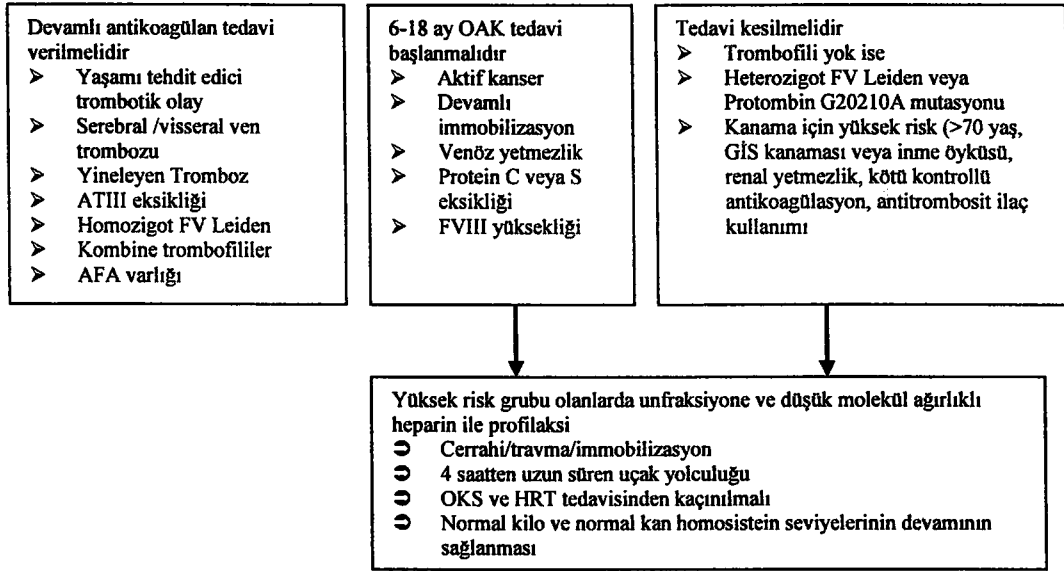
Derin ven trombozu veya pulmoner tromboemboli gelişen bir olguda kalıtsal trombofili olsun veya olmasın başlangıç olarak warfarin ve heparin başlanır ve warfarin ile tedaviye devam edilir. Optimal tedavi süresi altta yatan trombofili nedeni, öykü ve klinik ile bağlıdır (1,3,129). Öz ve soygeçmişlerinde tromboz öyküsü olmayan FV Leiden genotipi yönünden heterozigot olan kişilere, diğer hiperkoagülabilitate oluşturacak defekt yok ise trombozu provoke eden cerrahi girişim, immobilizasyon, OKS kullanımı gibi durumlarda profilaktik antikoagülan tedavi önerilmektedir (3,21,47,388). Öz ve soygeçmişlerinde tromboz öyküsü olmayan homozigotlarda ve hiperkoagülabilitateye neden olan iki veya daha fazla genetik defekt saptanan olgularda devamlı profilaktik antikoagülan tedavinin verilir verilmeyeceği, yada hangi durumlarda ne kadar süre ile verileceği konusunda kesin bir fikir birliği yoktur. Bazı çalışmalarda bu olgularda ömür boyu profilaksinin tromboz riskini belirgin derecede azaltacağı savunulurken (21), bazı araştırmacılar da devamlı antikoagülan tedavinin kanama riskinden dolayı gereksiz olduğunu, risk durumlarında profilaktik tedavinin verilmesi gerekliliğini bildirmişlerdir (47,388).

Heterozigot ve homozigot FV Leiden mutasyonuna sahip tromboz gelişen bir olguya yaklaşım diğer trombofililere yaklaşım ile aynıdır. Bu konuda geliştirilen algoritm yol göstericidir (117,242) (Şekil-17).

A



**B**



**Şekil-17: Venöz Trombozu Olan Trombofilili Hastaların Tanı Ve Tedavisine Yaklaşım (117)**  
Panel A: Olası trombofililerin klinik değerlendirmesi, başlangıç antikoagülan tedavi ve testlerin seçimi

Panel B: Tedavi ve profilaksi kriterleri

\* HRT: Hormon Replasman Tedavisi, GİS:Gastroİntestinal Sistem

Bu algoritme göre hastalar başlangıçta trombofili olabilme olasılığı yönünden değerlendirilmelidir; En düşük olasılığa sahip hastalar en az 3 ay süreyle tedavi edilmelidir. Bu hastalarda trombofili için testlerin yapılma gerekliliği yoktur. Diğer tüm hastalar 6 ay süreyle oral antikoagülan ile tedavi edilmeli ayrıca trombofilinin var olup-olmadığı araştırılmalı ve tekrarlayıcı tromboz ve hemoraji olasılığı yönünden değerlendirilmelidir. Bu yaklaşım ile tedavi kesilebilir, 6-18 ay veya ömür boyu devam edilebilir. Eğer hastada hayatı tehdit edici tromboemboli, serebral veya visseral VT, tekrarlayıcı trombozlar, homozigot FV Leiden mutasyonu, kombine trombofili ve antifosfolipid antikolar mevcut ise tedaviye süresiz devam edilebilir. Hastada trombofili yanında aktif malignite, devamlı immobilizasyon, venöz yetmezlik, protein C veya S eksikliği, FVIII yüksekliğinden en az biri var ise OAK tedavi 6-18 ay devam edilmelidir. Trombofilisi olmayan veya heterozigot FV Leiden veya heterozigot protrombin gen mutasyonu taşıyan kişilerde veya kanamaya karşı yüksek risk durumunda tedavi kesilmelidir. Trombofilisi olup tromboz için yüksek riskli hastalarda travma, cerrahi, immobilizasyon, 4 saatten fazla süren uçak yolculuğu gibi durumlarda düşük molekül ağırlıklı veya unfraksiyone heparin ile profilaksi

gereklidir. Bu hastalarda OKS ve HRT uygulanmamalı, ideal kiloda ve homosistein seviyesi normal sınırlarda tutulmaya çalışılmalıdır.

### 2.6.1. GEBELİK VE TROMBOFİLİ

Trombofilili gebelerde plasental vasküler tromboza bağı olarak fetal kayıplar, şiddetli preeklampsi, erken doğum, in utero gelişme geriliği, ablasyo plasenta görülebilir. Daha önce tromboz öyküsü olmayan heterozigot FV Leiden mutasyonu taşıyıcısı olan bir gebede rutin heparin profilaksisi önerilmemektedir. Diğer yandan VT, ölü doğum veya üçten fazla spontan düşük yapanlar ile homozigot FV Leiden mutasyonu taşıyan veya kombine trombofilisi olan kadınlar hamileliği boyunca ve postpartum dönemde 4-6 hafta süre ile düşük molekül ağırlıklı heparin (LMWH) ile tedavi edilmelidir (3,129,287).

### 2.6.2. HRT VE OKS KULLANIMI VE TROMBOFİLİ

Trombofilili bir hastada OKS kullanımı tromboz riskini arttırmaktadır. Özellikle 3. jenerasyon OKS kullanan FV Leiden mutasyonuna sahip bir kadında tromboz riski 30-50 kat artmıştır. Bu risk artışı homozigotlarda çok daha fazladır. Bu nedenle tromboz öyküsü olan veya homozigot FV Leiden mutasyonu taşıyan kadınlarda OKS kullanımından kaçınılmalıdır. Kalıtsal trombofilili kadınlarda HRT tartışmalıdır. Östrojen replasmanında rölatif risk anlamlı derecede artar, fakat absolut risk düşüktür (1/5000 bayan / her yıl). Bununla birlikte HRT alan ve FV Leiden mutasyonu veya başka genetik trombofilik risk faktörü taşıyan kadınlarda tromboz için rölatif veya absolut risk konusunda çalışmalar yetersizdir (3,129).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI YERİN ÖZELLİKLERİ:

Denizli ili, Anadolu Yarımadası'nın güneybatı, Ege Bölgesi'nin doğusunda yer almaktadır. Ege, İç Anadolu ve Akdeniz Bölgeleri arasında bir geçit durumundadır. Doğuda Burdur, Isparta, Afyon; batıda Aydın, Manisa; güneyde Muğla; kuzeyde Uşak illeri ile komşudur. Yüzölçümü 11.868 km<sup>2</sup>'dir. Denizli'nin 2002 yılında toplam nüfusu 843.122, şehir nüfusu 410.776, kırsal bölge nüfusu 432.346'dır.



Şekil-18: Denizli Haritası

#### 3.2. ARAŞTIRMANIN TİPİ:

Denizli ilinde Aktive Protein C Direnci ve Faktör V Leiden prevalansını belirleyen kesitsel bir araştırmadır.

### 3.3. ÖRNEKLEM HACMİNİN BELİRLENMESİ VE BİREYLERİN SEÇİMİ

İlimizde 1994'ten bu yana evlenmek için başvuran tüm bireylere İl Sağlık Müdürlüğü laboratuvarında talasemi taraması yapılmaktadır. Sağlık müdürlüğünden yazılı izin alınarak bu bireylerden Denizli ilinde yaşayan, sağlıklı ve gönüllü olanlar çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın örneklem hacmi, Denizli nüfusu baz alınarak %95 güvenilirlik  $\pm 2$  SD ve %5 tahmini prevalansa göre 466 kişi olarak hesaplandı. Çalışmamızın daha güvenilir olması için bu örneklem hacminin en az iki katı yani 932 kişiye ulaşılması planlandı.

Örneklem hacminin hesaplanmasında kullanılan formül;

$$n = \frac{N \cdot t^2 \cdot p \cdot q}{d^2 \cdot (N-1) + t^2 \cdot p \cdot Q}$$

N = Evrendeki birey sayısı

t = Belirli serbestlik derecesinde ve saptanan yanılma düzeyinde t tablosundan bulunan teorik değer

p = Görülme olasılığı

q = Görülmememe olasılığı (1-p)

d = Olayın görülüş sıklığına göre yapılmak istenen  $\pm$  sapma

n = Alınacak olgu sayısı

Çalışmaya alınacak kişilere geçmiş ve şu anki sağlık durumlarını ortaya çıkıracak bir form doldurtulup, gerekenlerde fizik muayeneleri yapıldı.

### 3.4. KAN ÖRNEKLERİNİN ELDESİ

Sağlıklı olduklarına karar verilen 1030 gönüllü bireyden 3cc trisodyum sitratlı kan alınıp, en geç bir saat içinde 2500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazmalar endorf tüplere alınarak - 80 derecede derin dondurucuda çalışılincaya kadar saklandı. Dondurulan plazmalar kullanılmadan önce 37 °C'de 15 dakika bekletilip, eritildikten sonra iyice karıştırılarak kullanıldı.

### 3.5. AKTİVE PROTEİN C DİRENCİ TAYİNİ

STA-Staclot APC-R aktive protein C direnci tayin kiti (Kat. No. 00721) kullanılarak ölçüm yapıldı.

#### 3.5.1. KİT'İN İÇERİĞİ

Reaktif 1: Faktör V'ce immuno-eksik ve fosfolipidlerce zenginleştirilmiş, dondurulmuş, kuru insan plazması.

Reaktif 2: Dondurulmuş, kuru Crotalus viridis helleri venomu (yılan zehiri).

Reaktif 3: Kalsiyumlu ortamda, dondurulmuş, kuru, insandan elde edilmiş aktive protein C içeriği.

Reaktif 4: Negatif kontrol olarak kullanılan, dondurulmuş, kuru, sitratlı insan plazması.

Reaktif 5: Pozitif kontrol olarak kullanılan, dondurulmuş, kuru, sitratlı insan plazması.

160 testlik kit içeriğinde her reaktiften 4 adet bulunmaktadır.

#### 3.5.2. KİT İÇİNDE BULUNMAYIP KULLANILAN MALZEMELER

- \* STA-Owren Koller
- \* ST art 4 -STA analizörü (koagülometre cihazı)
- \* Otomatik pipet ve disposable uçlar

#### 3.5.3. TEST PRENSİBİ

Aktive protein C direncinin tayini, aktive protein C varlığında ve kalsifiye edilmiş bir ortamda, test edilen plazmanın pıhtılaşma zamanındaki oldukça küçük uzamalar göz önünde bulundurulur yapılır. Normalde aPTT reaksiyonuna dışarıdan APC eklenmesi faktör Va ve faktör VIIIa'nın parçalanmasını artırarak pıhtılaşma zamanını uzatır. Ancak APC direnci olan durumlarda bu uzama gerçekleşmez. STA-Staclot APC-R sisteminde; dilüe edilmiş test plazmasının koagülasyonu, faktör V'ce yetersiz plazma (reaktif 1) ve Crotalus viridis helleri venomunun (reaktif 2) varlığında sağlanır. Faktör V'ce eksik plazma ile diğer pıhtılaşma faktörlerinin eksikliklerinden doğabilecek yanlış sonuçlar engellenmiş olur. Crotalus viridis helleri venomu faktör X'u aktive eder ve koagülasyon

şelalesinin ortak yoldan ilerlemesini sağlar. Bu şekilde koagülasyonu yukarı yönde etkileyebilecek bütün faktörler elimine edilmiş olur. Son aşamada da faktör Va'yı inaktive etmek için ortama eklenen aktive protein C (reaktif 3) sonrası pıhtılaşma zamanı ölçülerek sonuçlar değerlendirilir.

#### 3.5.4. REAKTİF HAZIRLAMA

Reaktif 1: Her bir vial 2 ml distile su ile hazırlandı. Homojen hale gelmesi için oda sıcaklığında ( 18-25 °C ) 60 dakika bekletildi.

Reaktif 2: Her bir vial 2 ml distile su ile hazırlandı. Homojen hale gelmesi için oda sıcaklığında ( 18-25 °C ) 60 dakika bekletildi.

Reaktif 3: Her bir vial 2 ml distile su ile hazırlandı. Homojen hale gelmesi için oda sıcaklığında ( 18-25 °C ) 60 dakika bekletildi.

Reaktif 4: Her bir vial 1 ml distile su ile hazırlandı. Hazırlanan solüsyon kuvvetli bir şekilde çalkalandıktan sonra homojen hale gelmesi için oda sıcaklığında ( 18-25 °C ) 60 dakika bekletildi.

Reaktif 5: Her bir vial 1 ml distile su ile hazırlandı. Hazırlanan solüsyon kuvvetli bir şekilde çalkalandıktan sonra homojen hale gelmesi için oda sıcaklığında ( 18-25 °C ) 60 dakika bekletildi.

#### 3.5.5. ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ

- STA cihazı açıldıktan sonra 37 °C'ye gelmesi için 3 dakika beklenildikten sonra gelen ekranda TEST MODE seçilerek APTT seçeneğine girildi.
- Cihaza ilk olarak küvetler yerleştirilip bilyalar her küvete bir tane olacak şekilde bırakıldı.
- Çalışılacak olan bireylerin plazmaları ve kontrol serumu 1/10 dilüe edildi. ( 50 µl hasta plazması + 450 µl Owren Koller )
- Küvetin içerisine dilüe edilmiş hasta plazmasından 50 µl , hazırlanan 1 nolu reaktif (FV eksik plazma)'den 50 µl ve 2 nolu reaktif (yılan zehiri)'den 50 µl koyduktan sonra inkubasyon tuşuna basıldı.
- 230. saniyeden itibaren cihazın verdiği uyarı sesi ile küvetler ölçüm bloğuna alındı.

- 240.saniyeden itibaren her bir küvete 50 µl 3 nolu reaktif (aktif protein C)'den konuldu ve test edilen plazmaların pıhtılaşma zamanları saniye cinsinden cihaz tarafından otomatik olarak dökümanite edildi.
- Her 100 hastada bir negatif-normal (reaktif 4) ve pozitif-patolojik (reaktif 5) kontrol ile sonuçların doğruluğu ve cihazın güvenilirliği kontrol edildi. Bu işlemde hazırlanan reaktif 4 ve reaktif 5 bir birey plazması gibi yukarıdaki işlemlerden geçirildi. Ve sonucun kontrol kutusu içerisinde bulunan reaktif 4 ve 5 için belirlenmiş "clotting time" aralığında kalmasına dikkat edildi.

### 3.5.6. TESTİN DEĞERLENDİRİLMESİ

STA cihazı ile STA-Staclo APC-prosedürü uygulanarak test edilen plazmalar; pıhtılaşma zamanları 120 saniyeye eşit ve daha yüksek çıkarsa APC-R negatif, 120 saniyeden daha düşük çıkarsa pozitif olarak değerlendirildi.

## 3.6. FAKTÖR V, PROTROMBİN, MTHFR GEN MUTASYONLARININ MOLEKÜLSEL DÜZEYDE TESPİTİ

1030 kişi içinden APC-R pozitif kabul edilen 93 birey telefonla çağrılarak kendilerine aktive protein C direnci ve faktör V Leiden mutasyonu hakkında bilgi verilerek molekül sel analiz için yazılı onayları alındı. Bireylerin şimdiki ve geçmiş sağlık durumları, trombotik hastalık öyküsü ve kullandığı ilaçlar, ailede trombotik hastalık varlığı sorgulanarak tekrar kaydedildi. Bireylerden 9 cc kan 1cc EDTA oranında kan alındı. Kanlar bekletilmeden DNA izolasyonu işlemine geçildi.

### 3.6.1. MOLEKÜLSEL ANALİZ

Faktör V, Protrombin ve MTHFR gen mutasyonlarını aynı anda saptayabilen FV-PTH-MTHFR StripA<sup>ssay</sup> (Vienna Lab – Labordiagnostika GmbH- Austria) kiti kullanılarak molekül sel düzeyde analizi yapıldı.

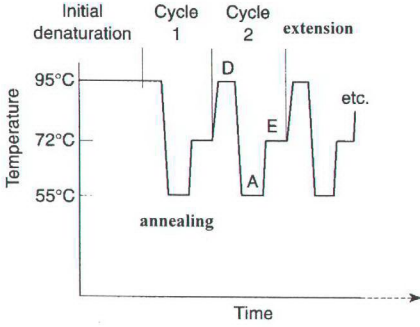
### 3.6.2. YÖNTEMİN PRENSİBİ

FV-PTH-MTHFR Strip yöntemi PCR ile çoğaltılmış DNA ürünlerinin mutasyona özgü oligonükleotid problemleriyle hibritleşmesi prensibi üzerine kurulmuştur. Test şu aşamalardan oluşmaktadır;

1. Kandan DNA izolasyonu,
2. Faktör V, protrombin ve metilentetrahidrofolat redüktaz gen dizilerinin biyotin ile işaretlenmiş primerlerle invitro amplifikasyonu (PCR)
3. Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülüp görüntülenmesi,
4. Bu PCR ürünlerinin normal ve mutant problemleri paralel bantlar şeklinde taşıyan test stripleri ile hibridizasyona sokulması ve,
5. Biyotin ile işaretli gen dizilerinin, streptavidin – alkalın fosfataz ve boya substratları kullanılarak görüntülenmesi.

#### 3.6.2.1. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Bir çeşit “in vitro klonlama” olarak da tanımlanan PCR yönteminin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR uygulamaları için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin bilinmesi gereklidir. Metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanan moleküler bir fotokopi makinesi olarak da düşünülebilir. PCR’da yer alan bileşenler; amplifiye (çoğaltılacak) hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA, amplifiye edilecek kalıp DNA’nın tümleyicisi olacak şekilde seçilmiş yaklaşık 15-20 bazlık yapay kısa tek zincirli DNA molekülleri oligonükleotid primerler, termostabil karakterli Taq DNA polimeraz enzimi, bu enzimin substratları olarak görev yapan dNTP’ler (ATP, GTP, TTP, CTP) ve uygun pH ve iyon ( $Mg^{+2}$ ) koşullarını sağlayan tampon karışımıdır. Reaksiyondaki her döngü denatürasyon, annealing (primer eşleşmesi), extension (uzama) adı verilen 3 aşamadan oluşmaktadır (Şekil-19 ve Şekil-20)

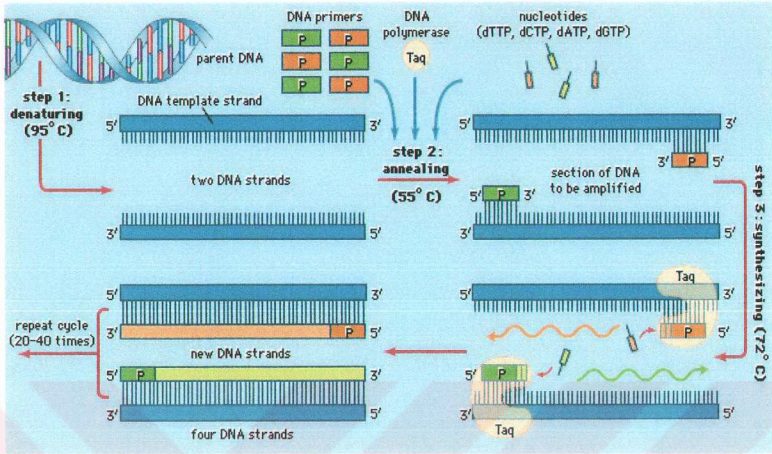


Şekil-19: Bir PCR siklusu, farklı sıcaklıklarda gerçekleşen 3 aşamadan oluşmaktadır.

*Denatürasyon*; Çift iplikli kalıp DNA'ya ait baz çitleri arasındaki hidrojen bağları yüksek ısı karşısında iki iplik halinde ayrılır. ( $94^{\circ}\text{C} - 98^{\circ}\text{C}$ )

*Annealing (primer eşleşmesi)*; Primerler, çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgü dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile eşleşmektedirler. Bu eşleşme, birbirlerini tümleyen oligo ve kalıp DNA'sı arasında, her primer için özgün bir sıcaklıkta genellikle  $40^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$  arasında gerçekleşmektedir. Bu sıcaklığı belirleyen temel etken nükleotid içeriğidir.

*Extension (uzama)*, DNA polimeraz enziminin maksimum aktiviteye sahip olduğu  $72^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleşir. Bu aşamada Taq polimeraz ortamdaki dNTP'leri kullanarak eşleşen primerleri  $5' \rightarrow 3'$  doğrultusunda uzatır. Tek iplikli DNA çift iplikli forma gelir.  $\text{Mg}^{+2}$  iyonu da işlemde kofaktör olarak önemlidir. Konsantrasyonu belli oranda (her primer için farklı) olmalıdır.



Şekil-20: Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik olarak görünümü

PCR uygulamasında üç evre bir döngü olarak kabul edilir ve hedef DNA'nın çoğaltılması 20-40 döngü arasında gerçekleşir. Bir döngü sonunda sentezlenen ürün öncekinin iki katı kadardır. Döngü sayısı "n" kabul edilirse " $2^n$ " çoğaltılmış DNA materyali miktarını verir.

FV-PTH-MTHFR StripA<sup>ssay</sup> kitin içeriğinde; amplifiye edilecek hedef DNA'nın tümleyicisi olacak şekilde seçilmiş primerleri, dNTP'leri ve uygun pH ve Mg konsantrasyonlarını sağlayan tampon karışımını içeren amplifikasyon mix solüsyonu hazır bulunmaktadır.

### 3.6.2.2. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Moleküllerin sahip oldukları net elektrik yükleri, bu moleküllerin bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkiler. Elektroferez tekniği bu prensibe dayanır. Moleküllerin büyüklüklerine göre ayrılabilme özellikleri, jel elektroferezin pek çok amaç için kullanımına olanak sağlamıştır. Nükleik asit fragmentlerinin tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en uygun yöntem agaroz jel elektroferezidir. Agaroz ; kırmızı bir alg türü olan "agar



agar"dan izole edilen doğrusal bir polisakariddir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. DNA'nın agaroz jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasında bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorplaması sonucu floresan etki göstermesi ile olur. Agaroz jelde DNA'nın hareket hızı, DNA'nın molekül büyüklüğüne ve yapısına, agaroz konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan voltaja bağlı olarak değişmektedir.

### 3.6.2.3. HİBRİDİZASYON

Kullandığımız bu kit reverse hibridizasyon prensibine dayanmaktadır. Hibridizasyon, temel olarak iki nükleik asit zincirinin benzer komplementer bazları arasındaki hidrojen bağlarının kurulması ile birbirine bağlanması olayıdır. Genom üzerinde aranan bir DNA dizisinin varlığını veya yokluğunu ortaya koymaya yarayan bir yöntemdir. Oligonükleotidler hedef DNA dizisini, baz dizisi yönünden kendisine çok benzeyen diğer DNA sekanslarından ayırt etmeye yarayan, yaklaşık 12-30 baz uzunluğundan oluşan tek DNA zinciridir. Oligonükleotidler radyoaktif izotoplarla veya non-radyoaktif metodlarla işaretlenerek görüntülenebilir. Non-radyoaktif olarak biyotin ile işaretlenip, streptavidin-biyotin konjugasyonundan yararlanılarak görünür hale getirilmesi mümkün olmaktadır. Bu şekillerle işaretlenmiş hedef DNA dizisini tümleyici yapay tek zincir DNA dizisine ise prob denir. Problar genellikle hedef DNA dizilerine özgün oligonükleotid problemler olarak isimlendirilirler. Prob, niteliği araştırılacak olan hedef DNA molekülü ile hibridizasyona tabi tutulur ve hibridizasyonun gerçekleşmesi durumunda aranan dizinin varlığı, gerçekleşmemesi durumunda ise aranan dizinin yokluğu ortaya konmuş olur.

Kullandığımız kit, PCR ile çoğaltılmış DNA ürünlerinin mutasyona özgü oligonükleotid problemleriyle hibritleşmesi prensibi üzerine kurulmuştur. Dot-Blot hibridizasyonunda DNA örnekleri membrana sabitleştirilip, problemlerin ilavesi ile hibridizasyon gerçekleştirilirken, bu yöntemde oligonükleotid problemler strip olarak tanımlanan şerit görünümündeki membran üzerine sabitlenmiş durumdadır. Amplifikasyon ürününün ilavesi ile hibridizasyon sağlanır. (Reverse Dot-Blot)

### 3.6.3. KİTİN İÇERİĞİ

20 testlik kit içeriğinde,

1. Lysis Solüsyonu	50 ml
2. Gen <sup>X</sup> TRACT Resin	5 ml
3. Amplifikasyon Mix	500 µl
4. Taq Dilüsyon Buffer	500 µl
5. DNAT	1,5 ml
6. Plastik hibritleme kabı	3 adet
7. Test stripleri	20 adet
8. Hibridizasyon Buffer	25 ml
9. Yıkama Solüsyonu A	80 ml
10. Conjugate Solüsyon	25 ml
11. Yıkama Solüsyonu B	80 ml
12. Color Developer	25 ml bulunmaktadır.

### 3.6.4. KULLANILAN MALZEME VE CİHAZLAR

1. 1.5 ml ve 0.5 ml'lik Ependorf tüpler
2. Ayarlanabilir pipet ve disposable uçlar
3. Mikrosantrifüj cihazı
4. Isısı ayarlanabilir çalkalayıcı su banyosu
5. Vortex karıştırıcı
6. Taq DNA polimeraz
7. Agaroz jel elektroforez donanımı
8. Agaroz
9. Etidyum Bromür
10. 1X TBE Buffer
11. Termometre
12. Orbital shaker
13. Thermocycler (sıcaklık döngü cihazı )
14. UV ışın kaynağı (transilluminatör)
14. CCD kamera ve görüntüleme sistemi
15. Etüv 0

### 3.6.5. ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ

#### 3.6.5.1. DNA İZOLASYONU

- Kit içeriğindeki lysis solüsyonu ve Gen<sup>X</sup>TRACT resin oda sıcaklığına getirildi.
- EDTA'lı tüpe alınmış oda sıcaklığındaki kan örneklerinden 100 µl, 1.5ml'lik ependorf tüplere alındı.
- Üzerine 1ml lysis solüsyonu eklenerek hafifçe karıştırıldı ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant kısım pipetle çekilip uzaklaştırıldı.
- Tekrar 1ml lysis solüsyonu eklenerek hafifçe karıştırıldı.
- 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip nükleer pelletin üstündeki sıvı uzaklaştırıldı
- 200 µl Gen<sup>X</sup>TRACT resin eklenerek 10 sn vortexlendi.
- Thermocycler'da 56 °C'de 20 dakika inkübasyon ve sonrasında 10 sn vortex,
- Thermocycler'da 98 °C'de 10 dakika inkübasyon ve tekrar 10 sn vortexlendi.
- 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı steril ependorf tüplere alındı. Bu sıvı invitro amplifikasyon (PCR)'da kullanım için uygun olan tek iplikçikli DNA içermektedir.

### 3.6.5.2. İNVİTRO AMPLİFİKASYON (PCR)

- Steril 0.5 ml'lik ependorf tüplere 15 µl amplifikasyon mix, 5 µl DNA ürünü ve 1 µl Taq DNA polimeraz (1U/µl) konuldu.
- Tüpler thermocycler'a yerleştirilip aşağıdaki PCR programı uygulandı:

<u>Isı (°C)</u>	<u>Zaman</u>	
94	2 dakika	
94	15 saniye	} 40 döngü
58	30 saniye	
72	30 saniye	
72	3 dakika	

### 3.6.5.3. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

- Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde EtBr ile boyanıp analiz edildi.
- 0.5 gr agaroz, 25 ml 1X TBE ve 1 µl EtBr ile hazırlanan %2'lik agaroz jel çözeltisi elektroforez kabına döküldükten sonra katılaşması beklendi. Katılaştıran agaroz jelin elektroforez tarakları yardımıyla oluşturulan kuyulardan en baştakine 1.5 µl Generuler 50 bp marker, diğerlerine 4µl PCR ürünü, 1 µl bromfenol mavisi ile karıştırılarak yüklendi ve 100 V'da 30 dakika yürütüldükten sonra jel U.V. ışın kaynağında (transilluminatör) incelenerek Faktör V geninin Leiden mutasyonunu, Protrombin geninin 3' translasyonu yapılmayan bölgesinde 20210. nükleotidini ve metilentetrahidrofolat redüktaz geninin 677. nükleotidini kapsayan bölgelerin PCR ile çoğaltılıp çoğaltılmadığı incelendi. 174, 200 ve 222 baz çifti uzunluğundaki bölgelerin çoğaltıldığı görüldükten sonra hibridizasyon işlemine geçildi.

#### 3.6.5.4. HİBRİDİZASYON

- Hibridizasyon tamponu ve yıkama solüsyonu A etüv'de 45 °C'ye kadar ısıtıldı.
- Her bir birey için bir test stripi çıkarılarak kurşun kalemle numaralandırıldı.
- Plastik hibritleme kabının her bir bölümüne 10 µl DNAT (denatüre edici solüsyon) ve 10 µl amplifikasyon ürünleri konularak yavaşça karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Böylece amplifikasyon ürünlerinin denaturasyonu sağlandı.
- Önceden 45 °C'ye kadar ısıtılmış hibridizasyon tamponundan 1 ml her bir bölmeye konularak hafifçe karıştırıldı. Birey numaralarının kurşun kalemle işaretlendiği test stripi kendi bölmelerine yerleştirilerek çalkalayıcı su banyosunda 45 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Böylece biotin ile işaretli amplifikasyon ürünlerinin strip üzerindeki proplarla hibridizasyonu sağlanmış oldu.

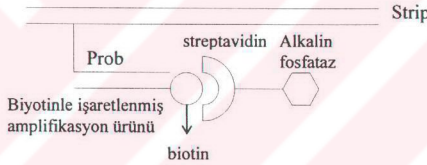
#### 3.6.5.5. YIKAMA

- İnkübasyonun sonunda hibridizasyon solüsyonu pipetle uzaklaştırılıp 1 ml yıkama solüsyonu A ile (önceden 45 °C'ye kadar ısıtılmış) 3 kez yıkılarak bağlanmayan DNA'lar uzaklaştırıldı. Yıkamalar 45 °C'de çalkalayıcı su banyosunda yapıldı. Birinci yıkama, strip yıkama solüsyonu A ile 10 saniye çalkalandıktan sonra ikinci ve üçüncü yıkama ise strip ile yıkama solüsyonu A 45 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra yapıldı.

#### 3.6.5.6. BOYAMA

- Yıkama solüsyonu A pipetle uzaklaştırıldıktan sonra hibritleme kabı oda sıcaklığına alındı ve 1 ml konjugat solüsyon eklenerek orbital shaker'da 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu aşama ile konjugat solüsyon içeriğindeki streptavidin-alkaline fosfatın, biotin ile işaretli DNA'ya bağlanması sağlanmış oldu. (şekil-21)

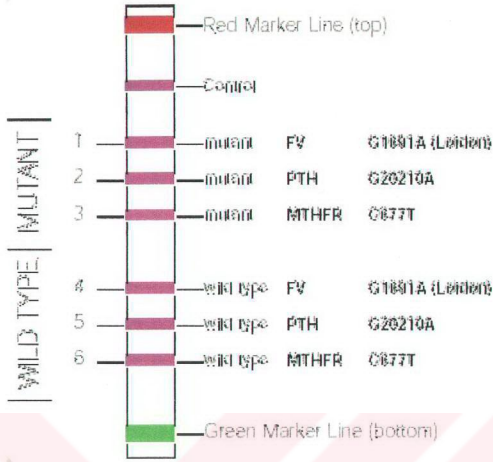
- İnkübasyon sonunda konjugat pipetle uzaklaştırılıp 1 ml yıkama solüsyonu B ile üç kez yıkanarak fazla streptavidin-alkalin fosfataz uzaklaştırıldı. Birinci yıkama, strip yıkama solüsyonu B ile 10 saniye çalkalandıktan sonra ikinci ve üçüncü yıkama ise strip ile yıkama solüsyonu B oda sıcaklığında orbital shaker'da 5 dakika inkübe edildikten sonra yapıldı.
- Yıkama solüsyonu B pipetle uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml color developer eklenip karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Color developer, konjugat solüsyonundaki alkalin fosfataz enziminin substratını içermektedir ve böylece bu enzimin bağlandığı bölgenin renklenmesini sağlar (Şekil-21).
- Test stripleri birkaç kez distile su ile yıkanarak karanlıkta kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakıldı.



Şekil-21: Konjugat solüsyonu ve color developer'ın etkisi: Strip üzerine sabitlenmiş normal ve mutant proplar biyotinle işaretlenmiş PCR ürünleri ile hibridize edildikten sonra streptavidin-alkalin fosfataz içeren konjugat solüsyon ve alkalin fosfatazın substratını içeren color developer ile görüntülenir.

### 3.6.5.7. SONUÇLARIN YORUMLANMASI

- Test sribinde elde edilen bantlar referans strip ile, üstteki kırmızı ve alttaki yeşil marker çizgileri aynı hizaya getirilerek karşılaştırıldı. Kırmızı marker altındaki kontrol çizgisinin pozitif reaksiyonu konjugat solüsyon ve color developer'ın etkileşiminin doğruluğunu gösterir. Bu çizgi daima pozitif boyanmalıdır. Test sonucunu yorumlamada şekilde gösterilen referans strip kullanılmaktadır. (şekil-22)



**Şekil-22:** Referans strip'in şematik görünümü

Yorumlamada, yalnızca wild type problemleri boya almışsa normal genotip, wild type ve mutant prob boyanmışsa heterozigot genotip (taşıyıcı), yalnızca mutant prob boyanmışsa homozigot genotip olarak yorumlandı.

### Örneğin;

Normal



FV heterozigot



MTHFR:heterozigot, FV:homozigot



#### 3.6.5.8. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ:

Veriler kişisel bilgisayarda Statistical Package for Social Sciences Version 10.0 (SPSS-10.0) istatistik paket programında değerlendirildi. Verilerin analizinde ki-kare analizleri (Pearson Chi-Square, Yates Continuity Correction, Fisher's Exact Test) ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

$p < 0.05$  düzeyinde anlamlı kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER

Denizli il merkezinde oturan Denizli İl Sağlık Müdürlüğü Laboratuvarına evlilik öncesi talasemi tarama testi için başvuran sağlıklı ve gönüllü 1030 kişi çalışmaya alındı. Örneklem grubunun yaş ortalaması  $25.11 \pm 6.21$  idi. Araştırmaya alınanların 530'u kadın (% 51.5) ve yaş ortalamaları  $23.74 \pm 6.11$  (14-55), 500'ü erkek (%48.5) ve yaş ortalamaları  $26.56 \pm 6.00$  (16-22) idi, yaş ortalamaları açısından iki cins arasında anlamlı fark yoktu ( $p < 0.05$ ). Kişilerin %56.1'i 14-24 yaş grubunda iken %36.0'sı 25-34 yaş grubunda ve %7.9'u 35 yaş üzerindedir.

Örneklem grubuna ait özellikler Tablo-IX'de özetlenmiştir.

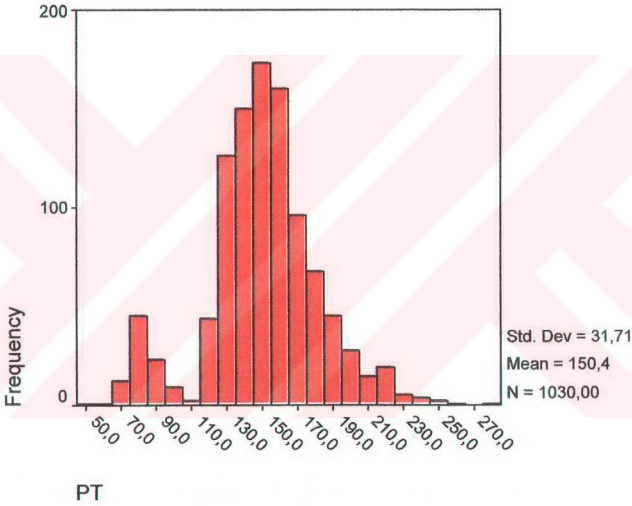
Tablo-IX: Araştırmaya Alınanların Özellikleri

		Erkek		Kadın		Toplam	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Araştırmaya katılım		500	48.5	530	51.5	1030	100
YAŞ GRUPLARI	14-24	214	42.8	364	68.7	578	56.1
	25-34	243	48.6	128	24.2	371	36.0
	35 +	43	8.6	38	7.2	81	7.9

Çalışmaya dahil edilen 1030 kişiden alınan örneklerde APC direnci çalışıldı. Daha sonra APC direnci saptanan bireylerde FV Leiden mutasyon varlığı araştırıldı.

## 4.2. APC DİRENCİ TAYİNİ:

STA-Staot APC-R aktive protein C direnci tayin kiti kullanılarak ölçüm yapıldı. APC-R değeri 120 saniyeye eşit ve daha yüksek çıkanlar APC direnci negatif, 120 saniyeden daha düşük çıkanlar pozitif olarak değerlendirildi. Buna göre 1030 kişiden 93'ünde APC-R değeri 120 saniyenin altında bulunarak araştırma grubunda APC direnci oranı % 9.0 olarak hesaplandı. Şekil-23'te araştırma grubunun APC-R değerlerinin dağılımı verilmiştir.



Şekil-23: Araştırma grubunun APC-R sonuçları

Erkeklerde APC direnci oranı %9.0 (45/500), kadınlarda %9.1 (48/530) olarak bulundu. Cinsiyet ile APC direnci varlığı arasındaki ilişkiye bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ( $p=0.975$ ) (Tablo-X).

Tablo-X: Cinsiyete Göre APC Direnci Dağılımı

Cinsiyet	APC Direnci yok		APC Direnci var		p
	Sayı	%	Sayı	%	
Erkek	455	91.0	45	9.0	0.975
Kadın	482	90.9	48	9.1	
Toplam	937	91.0	93	9.0	

APC direnci saptanan olguların yaş ortalaması  $26.53 \pm 6.47$ , APC-R değerlerinin ortalaması  $80.41 \pm 9.13$  bulundu. (Tablo-XI)

Tablo-XI: APC Direnci Saptanan Olguların Tanımlayıcı İstatistikleri

	Ortalama $\pm$ SD	Min-max	N
Yaş	$26.53 \pm 6.47$	16-56	93
APC-R değeri	$80.41 \pm 9.13$	54.7-109.8	93

#### 4.3. FV LEİDEN MUTASYONUNUN TESPİTİ

1030 kişi üzerinde APC direnci pozitif kabul edilen 93 bireyden alınan örneklerde molekül analizi yapıldı. Molekül analizi için FV Leiden, protrombin ve MTHFR gen mutasyonlarını aynı anda belirleyebilen FV-PTH-MTHFR StripA<sup>ssay</sup> (Vienna Lab – Labordiagnostika GmbH- Austria) kiti kullanıldı. APC direnci pozitif bireylerin DNA'ları kit içerisindeki DNA izolasyon solüsyonları ile çalışma prosedürüne uygun olarak izole edildi. Mutasyon bölgesini içeren FV, protrombin ve MTHFR gen dizilerinin amplifikasyonu için biyotin ile işaretlenmiş özel primerler kullanılarak PCR'ları yapıldı. PCR sonucunda 174, 200 ve 222 baz çifti (b.ç.) büyüklüğünde ürünler elde edildi (Şekil-24).



Şekil-24: 174, 200 ve 222 baz çifti büyüklüğündeki amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü (M:100 b.ç. DNA ağırlık standardı)

PCR ürünleri, normal ve mutant problemleri paralel bantlar şeklinde taşıyan test stripleri ile hibridizasyona sokuldu ve biyotin ile işaretli gen dizileri streptavidin-alkalin fosfataz ve boya substratları kullanılarak görüntülendi. Test stribinde elde edilen bantlar referans strip ile karşılaştırılarak yorumlandı. Yorumlamada, yalnızca wild type problemleri boya almışsa normal genotip, wild type ve mutant prob boyanmışsa heterozigot genotip (taşıyıcı), yalnızca mutant prob boyanmışsa homozigot genotip olarak yorumlandı. Şekil-25'te hastaların strip sonuçları ve yorumlarından örnekler sunulmuştur.



Homozigot FV Leiden



Heterozigot FV Leiden



Heterozigot FV Leiden  
Heterozigot MTHFR mut.



Homozigot FV Leiden  
Heterozigot MTHFR mut



Heterozigot FV Leiden  
Heterozigot PT gen mut.



Heterozigot FV Leiden  
Heterozigot PT gen mut.  
Heterozigot MTHFR mut

Şekil-25: Hastaların Mutasyon Analizi Sonuçlarından Örnekler

APC direnci saptanan 93 kişiden 87'sinde (%93.5) FV Leiden mutasyonu saptanırken, 6 kişide (%6.5) tespit edilmedi. Araştırma grubunda heterozigot FV Leiden mutasyon sıklığı % 7.34 (76/1030), homozigot FV Leiden mutasyon sıklığı %1.06 (11/1030) bulunarak toplamda prevalans % 8.4 (87/1030) olarak belirlendi (Tablo-XII).

Tablo-XII: Araştırma Grubunda FV Leiden Mutasyon Dağılımı

	Erkek		Kadın		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Heterozigot	36	7.2	40	7.54	76	7.34
Homozigot	7	1.4	4	0.75	11	1.06
FVL negatif	457	91.4	486	91.7	943	91.6
<b>Toplam</b>	<b>500</b>	<b>100</b>	<b>530</b>	<b>100</b>	<b>1030</b>	<b>100</b>

Araştırmaya alınan erkeklerin %8.6'sında (43/500) FV Leiden mutasyonu saptanırken, kadınların %8.29'unda (44/530) FV Leiden mutasyonu belirlendi. İki cins arasında FV Leiden mutasyon varlığı açısından anlamlı fark yoktu ( $p=0.95$ ) (Tablo-XII).

FV Leiden mutasyonu saptananların kendi içerisinde %87.4'ü (76 kişi) heterozigot iken, %12.6'sı (11 kişi) homozigot idi. Erkeklerin %83.7'sinde (36/43) heterozigot, %16.3'ünde (7/43) homozigot; kadınların ise %90.9'unda (40/44) heterozigot, %9.1'inde (4/44) homozigot mutasyon belirlendi. İki cins arasında genotip açısından anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.352$ ). (Tablo-XIII)

Tablo-XIII: FV Leiden Mutasyonu Saptananların Kendi İçerisinde Genotipik Dağılımı

	Erkek		Kadın		Toplam		P
	n	%	n	%	n	%	
Heterozigot	36	83.7	40	90.9	76	87.4	0.352
Homozigot	7	16.3	4	9.1	11	12.6	
<b>Toplam</b>	<b>43</b>	<b>100</b>	<b>44</b>	<b>100</b>	<b>87</b>	<b>100</b>	

FV Leiden mutasyonu saptanan 87 kişinin yaş ortalaması  $26.72 \pm 6.59$  idi. Ortalama APC-R değeri; FV Leiden mutasyonu belirlenenlerde  $78.90 \pm 7.03$ , mutasyon saptanmayanlarda  $102.35 \pm 8.17$  olarak bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0.0001$ ).

Heterozigot FV Leiden mutasyonu saptanan kişilerde ortalama APC-R değeri  $79.86 \pm 6.20$ , homozigot FV Leiden mutasyonu saptanan kişilerde  $72.23 \pm 8.96$  olarak bulundu. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0.003$ ).

FV Leiden mutasyonu belirlenen 87 olgunun 41'inde (%47.1) izole FV Leiden mutasyonu saptandı. Bunların 6'sı homozigot, 35'i heterozigot FV Leiden mutasyonuna sahipti. Olguların anamnezinde trombotik hastalık öyküsü yoktu. Yalnız homozigot mutasyona sahip 27 yaşındaki erkek olgunun babasında DVT ve heterozigot mutasyona sahip 22 yaşındaki bayan olgunun ablasında tekrarlayan düşük ve ölü doğum öyküsü bulunmaktaydı. (Tablo-XIV)

Tablo-XIV: FV Leiden Mutasyonuna Sahip Bireylerin Özellikleri

	Yaş	Cins.	Tromboz öyküsü	Aile öyküsü	APC-R değeri	FVL
H.U	27	E	-	-	75,4	Heterozigot
F.Ö	18	K	-	-	70,6	Heterozigot
V.T	32	K	-	-	74,5	Heterozigot
M.C	41	K	-	-	78,6	Heterozigot
S.E	26	K	-	-	79,4	Heterozigot
H.H	27	K	-	-	85,1	Heterozigot
G.S	25	K	-	-	88,9	Heterozigot
Y.B	23	E	-	-	84,7	Heterozigot
Ş.P	36	K	-	-	84,0	Heterozigot
V.D	24	E	-	-	84,9	Heterozigot
Ş.A	25	E	-	-	90,7	Heterozigot
H.E	16	K	-	-	71,7	Heterozigot
E.A	26	E	-	-	85,5	Heterozigot
C.N	23	E	-	-	88,6	Heterozigot
S.A	24	E	-	-	77,8	Heterozigot
N.B.	19	K	-	-	81,0	Heterozigot
Ş.B	26	K	-	-	73,6	Heterozigot
B.P	29	E	-	-	87,2	Heterozigot
E.U	21	K	-	-	85,0	Heterozigot
E.D	27	E	-	-	73,9	Heterozigot
N.Y	22	K	-	Var	80,6	Heterozigot
P.T.A	23	K	-	-	85,7	Heterozigot
Z.G	24	E	-	-	83,4	Heterozigot
M.Y	20	E	-	-	84,4	Heterozigot
P.K	25	E	-	-	85,1	Heterozigot
T.K	23	K	-	-	81,9	Heterozigot
M.K.Ç	21	K	-	-	72,2	Heterozigot
A.B	24	E	-	-	78,8	Heterozigot
H.B	22	K	-	-	88,8	Heterozigot
B.T	29	E	-	-	82,0	Heterozigot
M.A	29	E	-	-	76,7	Heterozigot
A.P.Ö	23	K	-	-	73,8	Heterozigot
İ.O	21	E	-	-	86,3	Heterozigot
H.Ş	19	E	-	-	80,1	Heterozigot
H.İ	24	E	-	-	73,1	Homozigot
E.İ	30	E	-	-	75,0	Homozigot
M.S	27	E	-	Var	54,7	Homozigot
İ.A	27	E	-	-	65,2	Homozigot
M.Ü	28	K	-	-	89,9	Homozigot
Y.T	25	E	-	-	78,0	Homozigot



FV Leiden ile MTHFR gen mutasyonu birlikteliği 45 (%51.72) olguda saptandı. Bu 45 olgunun 32'sinde heterozigot FV Leiden ve heterozigot MTHFR gen mutasyonu, 6'sında heterozigot FV Leiden ve homozigot MTHFR gen mutasyonu, 3'ünde homozigot FV Leiden ve heterozigot MTHFR gen mutasyonu ve 1 olguda da homozigot FV Leiden ve homozigot MTHFR gen mutasyonu birlikteliği belirlendi (Tablo-XV). Kalan 3 olguda FV Leiden ve MTHFR gen mutasyonuna ek olarak heterozigot protrombin gen mutasyonu da mevcuttu (Tablo-XVI). Homozigot FV Leiden ve heterozigot MTHFR gen mutasyonu taşıyan 34 yaşındaki bir erkek olgunun anamnezinde DVT öyküsü mevcuttu. Heterozigot FV Leiden ve heterozigot MTHFR gen mutasyonu taşıyan 24 yaşındaki bir bayan olgu ve heterozigot FV Leiden ve homozigot MTHFR gen mutasyonu taşıyan 24 ve 35 yaşlarındaki iki bayan olgunun anamnezlerinde de 1 kez abortus öyküsü bulunmaktaydı.

Tablo- XV: FV Leiden ve MTHFR Gen Mutasyonu Birlikteliği Olan Olguların Özellikleri

	Yaş	Cins	Tromboz öyküsü	Aile öyküsü	APC-R değeri	FVL	MTHFR
Y.U	27	E	-	-	75,5	Heterozigot	Heterozigot
H.S	34	E	-	-	85,3	Heterozigot	Heterozigot
U.Ö	31	E	-	-	81,2	Heterozigot	Heterozigot
S.Ö	28	K	-	-	75,9	Heterozigot	Heterozigot
S.D	39	K	-	-	83,2	Heterozigot	Heterozigot
M.K	19	K	-	-	80,4	Heterozigot	Heterozigot
F.E	25	E	-	-	82,6	Heterozigot	Heterozigot
E.B	35	K	-	-	74,3	Heterozigot	Heterozigot
A.Ç	21	K	-	-	71,0	Heterozigot	Heterozigot
İ.K	36	E	-	-	80,5	Heterozigot	Heterozigot
E.C	25	E	-	-	78,1	Heterozigot	Heterozigot
A.T	23	K	-	-	68,4	Heterozigot	Heterozigot
G.O	29	K	-	-	80,7	Heterozigot	Heterozigot
C.A	35	E	-	-	87,2	Heterozigot	Heterozigot
Ş.M	42	K	-	-	80,3	Heterozigot	Heterozigot
B.İ	56	K	-	-	73,3	Heterozigot	Heterozigot
M.A	26	E	-	-	78,9	Heterozigot	Heterozigot
Ö.A	26	E	-	-	77,4	Heterozigot	Heterozigot
M.Ç	23	E	-	-	83,0	Heterozigot	Heterozigot
A.H	21	K	-	-	83,0	Heterozigot	Heterozigot
S.B	25	K	-	-	94,7	Heterozigot	Heterozigot
Ş.D	20	K	-	-	76,8	Heterozigot	Heterozigot
F.T	29	K	-	-	82,5	Heterozigot	Heterozigot
M.S	25	E	-	-	87,1	Heterozigot	Heterozigot
D.Ç	20	K	-	-	71,9	Heterozigot	Heterozigot
H.Ş	20	E	-	-	81,0	Heterozigot	Heterozigot
A.Ö	30	E	-	-	75,3	Heterozigot	Heterozigot
G.SÇ	24	K	-	-	83,3	Heterozigot	Heterozigot
B.K	24	K	Abortus	-	82,7	Heterozigot	Heterozigot
R.K	25	E	-	-	85,2	Heterozigot	Heterozigot
N.E.S	22	K	-	-	79,3	Heterozigot	Heterozigot
Ü.B.Y	23	K	-	-	87,5	Heterozigot	Heterozigot
Ş.G.T	20	K	-	-	71,2	Heterozigot	Homozigot
H.K	35	E	-	-	70,3	Heterozigot	Homozigot
A.E	26	K	Abortus	-	58,8	Heterozigot	Homozigot
A.A	24	K	-	-	70,7	Heterozigot	Homozigot
E.T	20	K	-	-	80,7	Heterozigot	Homozigot
NÇ	35	K	Abortus	-	78,3	Heterozigot	Homozigot
Ö.D.Ö	27	K	-	-	76,7	Homozigot	Heterozigot
E.T	34	E	DVT	-	68,7	Homozigot	Heterozigot
B.S	27	K	-	-	75,1	Homozigot	Heterozigot
N.G	29	K	-	-	73,1	Homozigot	Homozigot

FV Leiden ile protrombin gen mutasyonu birlikteliği 4 olguda (%4.59) saptandı. Bunların 3'ünde ek olarak MTHFR gen mutasyonu da bulunmaktaydı (%3.45). Her 3 mutasyonu da heterozigot olarak taşıyan 39 yaşındaki bir erkek olgunun anamnezinde iki kez derin ven trombozu ve bir kez de pulmoner tromboemboli atağı öyküsü bulunmaktaydı. Diğer üç olgunun anamnezinde ve ailesinde tromboz öyküsü yoktu. (Tablo-XXIV)

Tablo-XVI: FV Leiden ile Protrombin gen mutasyonu ve FV Leiden, protrombin, MTHFR gen mutasyonları birlikteliği olan olguların özellikleri

	Yaş	Cins.	Özgeçmiş	Aile öyküsü	APC-R değeri	FVL	PT	MTHFR
H.P	39	E	DVT, PTE	-	70,5	heterozigot	heterozigot	heterozigot
F.Ç	28	E	-	-	79,3	heterozigot	heterozigot	heterozigot
İ.Ö	45	E	-	-	65,1	homozigot	heterozigot	heterozigot
A.G	30	E	-	-	75,0	heterozigot	heterozigot	-

FV Leiden mutasyonu belirlenen 87 olgunun 3'ünün anamnezinde abortus öyküsü mevcuttu (%3.44). Bunlardan birincisi heterozigot FV Leiden ve heterozigot MTHFR gen mutasyonuna, diğer iki olgu da heterozigot FV Leiden ve homozigot MTHFR gen mutasyonuna sahipti.

FV Leiden mutasyonuna sahip olgulardan 2'sinin anamnezinde DVT öyküsü mevcuttu (%2.29). Bunlardan birincisi homozigot FV Leiden ve heterozigot MTHFR, diğeri heterozigot FV Leiden, heterozigot PT ve heterozigot MTHFR gen mutasyonu taşımaktaydı. Bu ikinci olgunun anamnezinde DVT sonrası pulmoner tromboemboli öyküsü de mevcuttu.

FV Leiden mutasyonu belirlenen 87 olgunun 2'sinde aile anamnezi pozitifliği (%2.29). Bunlardan homozigot FV Leiden mutasyonuna sahip birinci olgunun babasında DVT, heterozigot FV Leiden mutasyonu taşıyan diğeri olgunun ablasında tekrarlayan düşük ve ölü doğum öyküsü bulunmaktaydı.

## 5. TARTIŞMA

Venöz tromboembolizm etyopatogenez açısından edinsel risk faktörleri ile genetik yatkınlıklar arasında kompleks etkileşim ile gelişen multifaktöriyel bir hastalıktır (5-11). Alman patolog Virchow'un 1856'da tanımladığı triad bugün hala geçerliliğini korumakta olup buna göre tromboz gelişiminde; endotel hasarı, kan akımında yavaşlama ve hiperkoagülabilité olmak üzere üç faktör rol oynamaktadır. Arteriyel sistemde damar hasarı ve trombosit fonksiyon bozuklukları; venöz sistemde ise staz ve pıhtılaşma sistemine ait bozuklukların tromboz gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle pıhtılaşma sistemini kontrol altında tutan mekanizmaların bozuklukları sonucu ortaya çıkan kalıtsal trombofilik sendromların büyük kısmında venöz tromboz riski artmıştır ve tromboza yol açan temel olay koagülasyon sistemindeki prokoagülan ve antikoagülan güçler arasındaki hassas dengeyi hiperkoagülabilité lehine bozan değişimlerdir (1,8).

20. yüzyılın başlarında bazı ailelerde trombotik olayların birikimi gözlenmesine karşın, hiperkoagülabilitenin kalıtımı ile ilgili ilk somut veriler 1960'lı yıllarda AT, 1980'li yıllarda ise PC ve PS eksikliğinin tromboza yatkınlık yarattığının belirlenmesi ile elde edilmeye başlanmıştır. Bu 3 doğal antikoagülanın eksikliği kalıtsal trombofilik düşünülen hastaların sadece %15'inin nedenini açıklarken (16,49,127) 1993 yılında APC direnci (12) ve 1994 yılında da buna yol açan FV Leiden mutasyonunun tanımlanması (128) ile trombofilik ailelerin %50'sinde, trombozlu hastaların ise %20'sinde etyolojinin aydınlatılması sağlanmıştır. Yine 1994'te hiperhomosisteinemi'nin, 1996'da protrombin gen mutasyonunun kalıtsal trombofilik neden olduğunun gösterilmesiyle trombofilik hastaların önemli bir kısmında trombotik olayın etyopatogenezi açıklanabilir hale gelmiştir. Artık kalıtsal trombofililerin %63'ünde FV Leiden ve protrombin gen mutasyonunun sorumlu olduğu düşünülmektedir (5,18).

Kalıtımsal nedenlerden en sık görüleni APC direncidir. APC, antikoagulan etki gösteren bir serin proteaz olup, FVa ve FVIIIa'yı inaktif hale getirerek trombin oluşumunu engeller. 1993 yılında Dahlback ve arkadaşları, normal plazmaya APC eklendiğinde FVa ve FVIIIa'nın parçalanmasına bağlı olarak aktive parsiyel tromboplastin zamanının uzaması gereğinden yola çıkarak yaptıkları çalışmada; ailesel olarak tromboza yatkınlığı olan ve birbirleri ile akraba olmayan 3 hastanın plazmasına APC eklenmesi ile beklenen antikoagulan yanıtın az ya da hiç olmaması durumunu APC direnci olarak tanımlamışlardır (12). 1994'te de Bertina ve arkadaşları APC'ye karşı bu direncin faktör V genindeki tek bir baz mutasyonundan (G1691→A) kaynaklandığını tanımlamışlar ve bu mutant faktör V'e, faktör V Leiden ismini vermişlerdir (128). Burada FV geninin 10. ekzonunda 1691. nükleotidde guaninin adenine dönüşümü sonucunda 506.pozisyonadaki aminoasit arginin iken glutamine dönüşür. Normal FV ve FV Leiden trombin tarafından eşit oranda aktive edilir. Her ikisinin de protrombin aktivasyonundaki kofaktör aktiviteleri aynıdır. Normal ve mutant Faktör V'in fonksiyonel farklılıkları sadece protein C yolunda ortaya çıkmaktadır. APC normal FV'yi Arg 506 bölgesinden parçalarken, mutant FV'yi parçalayamamaktadır. Sonuçta aktif FV Leiden'in inaktifleştirilmesi yavaşlamakta ve trombin oluşumu artmaktadır (11,62,206,210). Yapılan klinik çalışmalarda ilk venöz tromboz epizodu geçiren bireylerin %15-40'ında APC direnci tanımlanmıştır (13,14,15). Seçilmiş olgularda bu oran %60'lara ulaşmaktadır (11,16-18). Normal bireylere göre heterozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda venöz tromboz riski 5-10 kat, homozigotlarda ise 30-140 kat artmıştır (6,12,18-22). FV Leiden mutasyonunun genel popülasyondaki sıklığı coğrafi bölgeler ve etnik topluluklara göre belirgin farklılıklar gösterir. Avrupa ve Avrupa kökenli toplumlarda sık olduğu, fakat Asya ve Uzak Doğu toplumlarında çok düşük oranda olduğu yada hiç rastlanılmadığı bildirilmiştir (236,237).

Bu bilgilerin ışığında bu çalışmamızda Avrupa'da tromboembolizm geçiren hastalarda ilk araştırılması gereken bir defekt olarak belirtilen FV Leiden'in bölgemizdeki sağlıklı kişilerdeki sıklığını belirlemeyi amaçladık ve çalışmamız sonucunda Denizli il merkezinde yaşayan sağlıklı bireylerde APC direnci oranını

%9, FV Leiden mutasyon sıklığını %8.4 olarak saptadık. APC direnci saptadığımız 93 olgunun 87'sinde FV Leiden mutasyonu mevcuttu. Bu olgulardan 76'sı heterozigot, 11'i homozigot genotipteydi. Daha önce yapılan çalışmalarda APC direncinin %95'inin FV Leiden mutasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (128,208,209,212). Bizim çalışmamızda APC direnci belirlediğimiz olguların %93.5'unda (87/93) FV Leiden mutasyonu mevcuttu. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuç daha önce literatürde bildirilen oranlarla benzerlik göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda taze donmuş plazmadaki FV aktivitesinin -65 – -80 dereceye soğutulduktan sonraki ilk çözülmede etkilenmediği bulunmuştur (128,209,358,360,364). Biz de çalışmamızda saklamadan ötürü yanlış sonuçların önüne geçebilmek için sağlıklı gönüllülerden elde ettiğimiz plazmaları hızlıca -70 derecede dondurup, işlemiden hemen önce çözdürerek çalıştık.

APC direnci taramasını STA-STACLOT APC direnci testi (Diagnostica Stago, Asnieres, France) ile yaptık. APC direnci değerlendirilmesinde FX aktivasyonuna dayanan fonksiyonel testlerin daha güvenilir olduğuna dair yayınların çoğaldığı bu son yıllarda yeni bir teknik olan STA-STACLOT APC-R testi FX'un Crotalus viridis helleri yılan venomu tarafından spesifik olarak aktivasyonuna dayanır. Testin güvenilirliğini değerlendirmek için FV Leiden mutasyonu olduğu bilinen hastalarda yapılan çalışmalarda STA-STACLOT APC-R testi %98-100 duyarlı ve özgül bulunmuştur (364,365). Ayrıca test ile ilgili yapılan çalışmada test sonucuna göre bireyin homozigot ve heterozigot genotip ayırımı yapılabileceği savunulmaktadır (364). Bizim çalışmamızda da homozigot bireylerin APC-R sonuçları ile heterozigot bireylerin sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0.003$ ). Biz çalışmamıza FII, FX düzeylerine, protein C ve protein S aktivitesine bakmadık. Ancak yapılan çalışmada STA-STACLOT APC-R testinin; PC, PS eksikliği olanlarda veya bunların FV Leiden ile kombine defektlerinde ve FII ve FX düzeyi eksikliklerinde %100 duyarlı ve özgül olduğu gösterilmiştir (364).

Bir çok laboratuvar FV Leiden mutasyonunun moleklssel düzeyde analizi için Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) yöntemini kullanmaktadır. Bu yöntem FV Leiden mutasyonunun moleklssel düzeyde tanısını sağlayan ilk yöntemdir (128). Yöntem, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü, kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle bir çok merkez tarafından tercih edilmekte ve diğer moleklssel tanı yöntemleri için referans kabul edilmektedir (128,366,368). Biz FV Leiden'in moleklssel düzeyde analizi için FV Leiden, PT G20210A ve MTHFR C677T gen mutasyonlarını aynı anda belirleyebilen FV-PTH-MTHFR StripA<sup>ssay</sup> (Vienna Lab – Labordiagnostika GmbH- Austria) kitini kullandık. Bu yöntem PCR ile oğaltılmış DNA rnlerinin mutasyona özgü olgonkleotid problemleriyle hibritleşmesi prensibi üzerine kurulmuştur. Normal Dot-Blot hibridizasyonunda DNA rnekleri membrana sabitleştirilirken, bu yöntemde oligonükleotid problemleri membrana sabitleştirilmiş durumdadır. Literatürde FV-PTH-MTHFR Strip testi kullanılarak yapılan çalışmaya rastlamadık. Ancak lkemizde, aynı firma tarafından aynı prensibe dayanarak üretilen  $\beta$  globin strip testi yaygın olarak kullanılmaktadır ve talaseminin moleküler tanısını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. Sistemin güvenilirliği bir yüksek lisans tezi çerçevesinde kanıtlandıktan (389) sonra bir çok laboratuvar da rutin uygulamaya girmiştir. Strip tekniğinin olguların %90'ını tek aşamada %100 güvenilirlik ile tanımladığı ve yöntemin klinik laboratuvar ortamında uygulanabilirlik ve kısa sürede sonuç alma gibi çok önemli avantajlarının olduğu belirtilmiştir (390).

FV Leiden'in dünya üzerindeki dağılımına bakıldığında en yüksek oranın Avrupa ve Avrupa kökenli göçmenlerin yerleştiği bölgelerde olduğu gözlenmiştir. Avrupa'da en yüksek oranlar İşve ve Yunanistan'dan bildirilmiştir. Yunanistan'da Rees ve arkadaşları 187 sağlıklı kişide heterozigot FV Leiden prevalansını %12.8, homozigot mutasyon sıklığını %0.5 olarak bildirirken (237), Chaida ve arkadaşları 203 sağlıklı kişide FV Leiden alel sıklığını %4.1 olarak saptamışlardır (236). İşve'te Dahlback ve arkadaşları tarafından rapor edilen FV Leiden prevalansı %15 gibi yüksek bir orandır, homozigot mutasyon belirlenmemiştir (237). Almanya'da Schröder ve arkadaşları 814 sağlıklı kişide

heterozigot FV Leiden prevalansını %6.9, homozigot mutasyon sıklığını %0.1 olarak tespit etmişlerdir. März ve arkadaşları 196 sağlıklı kişide FV Leiden prevalansını %4.3, Aschka ve arkadaşları 117 kişide %8.5, Heinrich ve arkadaşları ise 222 kişide %6.3 olarak bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar çalışmalarında homozigot mutasyona rastlamamışlardır (237). Grossmann ve arkadaşları DVT'lu hastalarda protrombotik risk faktörlerini değerlendirdikleri çalışmalarında, 410 kişilik sağlıklı kontrol grubunda FV Leiden prevalansını %7.1 olarak saptamışlardır (158). Hollanda'da Rosendaal tarafından yapılan iki ayrı çalışmanın birisinde FV Leiden prevalansı %2.9 (21), diğesinde %4.7 olarak bildirilmiştir. Her iki çalışmada da homozigot mutasyon görülmemiştir (237). Rees ve arkadaşları İzlanda'daki FV Leiden prevalansını %4.1 olarak rapor etmişlerdir (237). Olafsson ve arkadaşları ise 159 sağlıklı kişide alel sıklığını %3.1 olarak bulmuşlardır (236). Finlandiya'da Hakala ve arkadaşları 303 sağlıklı kişinin 12'sinde (%4) heterozigot, 1'inde homozigot (%0.3) FV Leiden mutasyonu belirlemişlerdir. Syrjälä ve arkadaşları ise FV Leiden prevalansını %6 olarak bildirmişler (237), Kontula ve arkadaşları ise alel sıklığını %1.4 olarak vermişlerdir (236). Fransa'dan bildirilen FV Leiden prevalansları, çalışmanın yapıldığı bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Emmerich ve arkadaşları FV Leiden prevalansını Toulouse'da 207 sağlıklı kişide %2.9, Lille'de 148 sağlıklı kişide %0.7, Strasbourg'da 193 sağlıklı kişide %8.8 olarak rapor ederken, Querrec ve arkadaşları Normandiya'da 300 sağlıklı kişide %2.7 olarak bulmuşlardır. Homozigot mutasyon sadece Strasbourg'da 1 kişide (%0.5) tespit edilmiştir (237). Hermann ve arkadaşları Polonya'da 200 sağlıklı birey taramışlar ve FV Leiden prevalansını %5 olarak belirlemişler, homozigot mutasyona rastlamamışlardır (237). Ferrer-Antunes ve arkadaşları Portekiz'de Kafkas kökenli 203 kişide FV Leiden prevalansını %1.6 olarak bulmuşlar ancak Afrika kökenli 108 kişide mutasyona rastlamamışlardır (237). İtalya'daki FV Leiden sıklığı belirgin farklılıklar göstermektedir. Genova bölgesinde Caprino ve arkadaşları 80 kişide FV Leiden prevalansını %7.5 olarak saptarken, aynı bölgede Rees ve arkadaşları 49 kişide mutasyona rastlamamışlardır (237). Vicenza bölgesinde Tosetto ve arkadaşları 4703 kişiyi taramışlar 124 kişide (%2.6) heterozigot, 4 kişide (%0.09) homozigot mutasyon varlığını belirlemişlerdir (237). Yine Vicenza bölgesinde



Rodeghiero ve arkadaşları 15109 kişinin 447'sinde (%2.9) heterozigot, 7'sinde (%0.04) homozigot mutasyon belirleyip bu bölgedeki FV Leiden prevalansını %3 olarak bildirmişlerdir (243). Cattaneo ve arkadaşları ise Milano'da 416 kişilik sağlıklı kontrol grubunda FV Leiden sıklığını %3.2 olarak bulmuşlardır (161). İngiltere'de Catto ve arkadaşları 247 kişide mutasyon sıklığını %5.6 olarak bildirmişlerdir (237). Benzer şekilde Amitrano ve arkadaşları 431 kişilik sağlıklı kontrol grubunda %5.1 oranında mutasyon belirlemişlerdir (160). Her iki çalışmada da homozigot mutasyona rastlanmamıştır. De Maat ve arkadaşları Greenland'da 133 kişiyi taramışlar, FV Leiden mutasyonuna rastlamamışlardır (236). Avusturya'da Renner ve arkadaşları DVT'lu hastalarda protrombotik risk faktörlerini değerlendirdikleri çalışmalarında 308 sağlıklı kontrol grubunda FV Leiden mutasyon sıklığını %7.8 olarak bulmuşlardır (162). Brodmann ve arkadaşları ise çalışmalarında 262 kişide %3.4 oranında mutasyon belirlemişlerdir (273). Her iki çalışmada da homozigot mutasyon saptanmamıştır. İrlanda'da Emmerich ve arkadaşları 178 sağlıklı kişide FV Leiden alel sıklığını %2.8 olarak saptamışlar, homozigot mutasyon bildirmemişlerdir (236). Tordai ve arkadaşları Macaristan'daki FV Leiden alel sıklığını %5.6, García-Gala ve arkadaşları İspanyada'ki alel sıklığını %1.6 olarak bildirmiş, homozigot mutasyon tespit etmemişlerdir (236).

Amerika kıtasında bu mutasyon Avrupa'dan daha az sıklıkta görülmekte ve oranlar bölgeden bölgeye ve etnik gruplara göre değişkenlik göstermektedir. Arjantin'de Genoud ve arkadaşları 418 sağlıklı kişide FV Leiden mutasyonunu %2.9 (341), Herpner ve arkadaşları 498 kişide %1.6 (391) olarak bulmuşlardır. Varela ve arkadaşları ise 200 kişilik sağlıklı kontrollerinde %3.0 oranında mutasyona rastlamışlardır (159). Bu üç çalışmada da homozigot mutasyon saptanmamıştır. Hermann ve arkadaşları da 215 kişiyi içeren prevalans çalışmalarında 10 bireyde heterozigot (%4.65), 1 bireyde homozigot (%0.47) mutasyon belirleyerek toplam prevalansı %5.1 olarak rapor etmişlerdir (237). Kanada'da Lee ve arkadaşları 229 kişi taramışlar ve FV Leiden prevalansını %5.7 olarak saptamışlar, homozigot mutasyon tespit etmemişlerdir (237). Yapılan çalışmalarda Peru, Brezilya ve Jamaika'da FV Leiden mutasyonuna

rastlanmamıştır (237,392). Amerika'da bir çok ırk bulunduğu için FV Leiden prevalansı da etnik kökene göre farklılık göstermektedir. Gregg ve arkadaşları 4 farklı etnik kökenden 602 kişi taramışlar ve FV Leiden prevalansını Hispanik kökenlilerde %1.65, Afrika kökenlilerde %0.87 oranında belirlemişler, Asya ve Native kökenlilerde mutasyona rastlamamışlardır (393). Pottinger ve arkadaşları da 214 Afrika kökenli bireyde %1.4, 130 Kafkas kökenli bireyde %1.6 oranında mutasyon sıklığı bildirmişlerdir. Ridker ve arkadaşları 704 Kafkas kökenli kadının 42'sinde FV Leiden mutasyonu belirleyerek prevalansı %6 olarak rapor etmişlerdir (237). Washington'dan bildirilen Reiner ve arkadaşlarının çalışmasında 592 sağlıklı kontrol grubunda FV Leiden prevalansı %6 olarak bulunmuştur (173). Bu çalışmaların hiçbirinde homozigot mutasyon saptanmamıştır. Hermann ve arkadaşları Venezüella'da sağlıklı 126 kişide mutasyon sıklığını %1.6 olarak bildirmişlerdir (237).

Avustralya'nın Papua Yeni Gine bölgesinde FV Leiden mutasyonuna rastlanmazken, Perth bölgesinde FV Leiden prevalansı %4 olarak bildirilmiştir (237).

Uzak ve Orta Doğu'da FV Leiden mutasyonu çok daha az sıklıktadır. Rees ve arkadaşları çalışmalarında; Sri Lanka'dan 47 kişi, Pakistan'dan 36 kişi, Endonezya'dan 105 kişi, Tayvan'dan 83 kişi, Hong Kong'tan 48 kişi, Suudi Arabistan'dan 55 kişi ve Hindistan-Pencap'tan 36 kişi taramışlar ve heterozigot ve homozigot FV Leiden mutasyonu saptamamışlardır (392). Kodaira ve arkadaşları; Kore'den 93 kişide, Çin'den 113 kişide ve Japonya'dan 270 kişide FV Leiden mutasyonu araştırmışlar ve çalışmaları sonucunda mutasyona rastlamamışlardır (237). Hermann ve arkadaşları; Hindistan-Pencap'ta sağlıklı 150 kişinin 2 sinde heterozigot mutasyon belirleyerek, bu bölgedeki FV Leiden prevalansını %1.3 olarak bildirmişlerdir (237). Çin'de Ko ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmanın 330 kişilik sağlıklı kontrol grubunda sadece 1 kişide (%0.03) heterozigot mutasyon belirlenmiştir (235). Angchaisuksiri ve arkadaşlarının Tayvan'da 500 sağlıklı kontrol ve 50 seçilmemiş DVT'lu olguda yapmış oldukları çalışmada sadece sağlıklı kontrol grubunda 1 kişide heterozigot

FV Leiden mutasyonunun varlığı tespit edilerek Tayvan'da FV Leiden mutasyonunun nadir görüldüğü vurgulanmıştır (394). İsrail'de Salomon ve arkadaşlarının idiopatik VTE'de tek ve kombine protrombotik risk faktörlerini değerlendirdikleri çalışmalarında, 336 kişiyi içeren sağlıklı kontrol grubunda FV Leiden mutasyonu sıklığı %3.9 olarak bulunmuştur (13). Yine ilginç olarak Sarig ve arkadaşlarının çalışmasında da 145 kişilik sağlıklı kontrolde %7.6 oranında mutasyona rastlanmıştır (279). İran-ı Hakime ve arkadaşları Lübnan'da 174 sağlıklı kişinin 24'ünde heterozigot, 1'inde homozigot FV Leiden mutasyonu tespit ederek prevalansı %14.4 olarak rapor etmişler ve çalışmalarında bu oranın Suriye (%13.6), Kıbrıs Rum kesimi (%13.4) ve Ürdün (%12.3)'den daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır (395).

Afrika'dan bildirilen çalışmalar az sayıdadır ve az sayıda olgu içermektedir. Rees ve arkadaşları çalışmalarında Kenya'dan 60 kişi, Zambiya'dan 95 kişi ve Senegal'dan 96 kişi taramışlar, heterozigot ve homozigot FV Leiden mutasyonu saptamamışlardır (392). Yine benzer şekilde Hira ve arkadaşları tarafından yapılan plasental abrupsiyon ile trombofili ilişkisinin incelendiği araştırmada 217 sağlıklı kontrol grubunda da mutasyona rastlanmamıştır (396).

Türkiye'de FV Leiden ile ilgili ilk populasyon çalışması 1996 yılında Özbek ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. 120 sağlıklı olguda FV Leiden prevalansı %9.16, alel sıklığı %4.5 olarak rapor edilmiştir (236). Tursen ve arkadaşları Behçet hastalığı ile FV Leiden ilişkisini değerlendirdikleri çalışmalarında 95 kişilik sağlıklı kontrol grubunda %5.2 oranında mutasyon belirlemişlerdir (267). Avcu ve arkadaşlarının genç trombozlu olgularda FV Leiden mutasyonunu araştırdıkları çalışmalarında, 55 kişilik sağlıklı kontrol grubunda heterozigot FV Leiden mutasyonu %3.6, alel sıklığı %1.8 oranında belirlenmiştir, homozigot mutasyon saptanmamıştır (397). Yine Demir ve arkadaşlarının tez çalışmalarında 49 sağlıklı kontrol grubunda %2.04 oranında mutasyon sıklığı belirlenmiştir (398). Vurkun ve arkadaşları ise Edirne il merkezinde sağlıklı 467 kişide yaptıkları taramada 18 heterozigot (%3.8), 2 homozigot (%0.4) mutasyon saptayarak bu bölgedeki FV Leiden prevalansını % 4.28, alel sıklığını %2.35

olarak bildirmişlerdir (399). Akar ve arkadaşları da 99 sağlıklı bireyin 12'sinde heterozigot mutasyon saptayarak FV Leiden prevalansını %12.1, alel sıklığını %6.0 olarak rapor etmişlerdir (236).

Biz, yapmış olduğumuz çalışmada 1030 sağlıklı gönüllünün 76'sında heterozigot (%7.34), 11'inde homozigot (%1.06) mutasyon belirleyerek Denizli il merkezindeki FV Leiden prevalansını %8.4 olarak saptadık. Görüldüğü gibi bizim saptadığımız bu oran Vurkun ve arkadaşlarının, Avcu ve arkadaşlarının, Demir ve arkadaşlarının ve Tursen ve arkadaşlarının bildirmiş oldukları oranlardan daha yüksek olup, Özbek ve arkadaşlarının sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. İlginç olarak tüm Dünya ülkelerinde yapılan ve ulaşabildiğimiz FV Leiden prevalans çalışmaları ile karşılaştırıldığında bulmuş olduğumuz homozigot FV Leiden mutasyon sıklığı daha yüksektir.

Çeşitli çalışmalarda tespit edilen heterozigot ve homozigot FV Leiden prevalansları ve çalışmamız ile karşılaştırması EK-I'de sunulmuştur.

FV Leiden mutasyonuna edinilmiş veya kalıtsal trombofilik risk faktörleri eklendiğinde tromboz sıklığı ve ciddiyeti artmakta ve daha erken yaşlarda görülmektedir (9,11,17,238,331). Bu ilave risk faktörleri; PC eksikliği (135,238,331), PS eksikliği (153,205,260,332,333), AT eksikliği (135,261), MTHFR enzim defekti (158), Protrombin G20210A gen mutasyonu (157,158,181,183,334,335) gibi herediter nedenler olabileceği gibi hiperhomosisteinemi (192), antifosfolipid antikorları (223,224,323,336), malign hastalıklar (232), Behçet ve inflamatuvar barsak hastalıkları (266-268,271), fiziksel inaktivite, cerrahi veya hormonal değişiklikler (337,338) gibi akkiz nedenler olabilmektedir. Biz de bu bilgilerden yola çıkarak APC direnci saptadığımız 93 olguda FV Leiden mutasyonu ile birlikte diğer sık kalıtsal trombofili nedenlerinden olan protrombin gen mutasyonu ve metilentetrahidrofolat redüktaz enzim defektini de araştırdık.

Sağlıklı kişilerde FV Leiden, protrombin, MTHFR gen mutasyonları birlikteliğinin araştırıldığı çalışma sınırlıdır. İtalya’da, Cattaneo ve arkadaşlarının ilk DVT epizodu geçirenlerde FV Leiden, Protrombin ve MTHFR gen mutasyonlarının sıklıklarını değerlendirdikleri çalışmalarında; 118 kişilik DVT’lu olgu grubunda FV Leiden ve protrombin gen mutasyonu birlikteliği 3 olguda (%3.1) saptanırken 416 kişilik sağlıklı kontrol grubunda birliktelik saptanmamıştır. FV Leiden ve MTHFR gen mutasyonu birlikteliği olgu grubunda 6 kişide (%6.1), sağlıklı kontrol grubunda ise 2 kişide (%0.5) belirlenmiştir. 3 mutasyonu da taşıyan olgu tespit edilmemiştir (161). Arjantin’de Genoud ve arkadaşları 418 sağlıklı kişiyi taramışlar ve 3 kişide FV Leiden ve MTHFR gen mutasyonu birlikteliği (%0.7), 2 kişide protrombin ve MTHFR gen mutasyonu birlikteliği (%0.4) belirlemişler ancak FV Leiden ve protrombin gen mutasyonu birlikteliği saptamamışlardır (341). Grossmann ve arkadaşlarının DVT’lu hastalarda protrombotik risk faktörlerini değerlendirdikleri çalışmalarında; FV Leiden ve protrombin gen mutasyonu birlikteliği 410 kişilik sağlıklı kontrol grubunda görülmezken, 300 olgulu DVT’lu grupta %3.3 oranında belirlenmiştir. FV Leiden ve MTHFR gen mutasyonu birlikteliği ise sağlıklı kontrol grubunda %0.98, DVT’lu olgu grubunda ise %5.7 oranında saptanmıştır (158). Salomon ve arkadaşları da çalışmalarında FV Leiden ve protrombin gen mutasyonu birlikteliğini 336 sağlıklı kontrol grubunda 1 kişide (%0.29), VTE’li 162 olgunun 12’sinde (%7.4) tespit etmişlerdir. FV Leiden ve MTHFR gen mutasyonu birlikteliği ise sağlıklı kontrol grubunda yine 1 kişide (%0.29), olgu grubunda ise 10 kişide (%6.1) saptanmıştır. VTE geçiren olgu grubunda her 3 mutasyonu da taşıyan 3 kişi (%1.8) belirlenirken, kontrol grubunda rastlanmamıştır (13). Etiévant ve arkadaşları da FV Leiden ve protrombin gen mutasyonu birlikteliğini 240 sağlıklı bireyi içeren kontrol grubunda saptamazken, 260 düşük yapmış kadında %1.92 olarak bildirmiştir (163). Meyer ve arkadaşları DVT ve pulmoner embolili 773 hastada FV Leiden ve protrombin gen mutasyonu birlikteliğini %1.9 olarak rapor etmişlerdir (164).

Ülkemizde Gürgey ve arkadaşlarının çalışmasında tromboz geçiren 146 olguda FV Leiden ve protrombin gen mutasyonu birlikteliği 6 olguda saptanmış

olup oran %4.1 olarak bildirilmiştir (342). Yine ülkemizde Akar ve arkadaşları çalışmalarında; tromboz geçiren 269 olguda FV Leiden ve protrombin gen mutasyonu birlikteliğini %3.7, 190 kişilik sağlıklı kontrol grubunda ise %0.5 olarak rapor etmişlerdir (183). Vurkun ve arkadaşları Edirne il merkezinde sağlıklı 467 kişide yaptıkları taramada 20 kişide FVL mutasyonu belirlemişler, bu kişilerde protrombin gen mutasyonu saptamamışlardır (399).

Biz yapmış olduğumuz çalışmamızda FV Leiden mutasyonu saptadığımız 87 olgunun 45'inde MTHFR gen mutasyonu belirledik (%51.72). 1030 sağlıklı-gönüllü kişi içinde değerlendirdiğimizde FV Leiden ile MTHFR gen mutasyonu birlikteliği %4.3 (45/1030)'e tekabül etmektedir ve yapılan çalışmalarda bildirilen oranlardan daha yüksektir. Yine çalışmamızda FV Leiden mutasyonu saptanan 87 olgunun 4'ünde protrombin gen mutasyonu ile birliktelik saptadık (%4.59). Genel araştırma grubumuz içinde değerlendirildiğinde bu oran %0.3 (4/1030) olarak hesaplandı. Bu sonuç Salomon ve arkadaşlarının ve Akar ve arkadaşlarının sağlıklı kontrol grubunda belirledikleri oranlarla benzerdir. Araştırmamızda FV Leiden mutasyonu saptadığımız 87 olgunun 3'ünde ek olarak protrombin ve MTHFR gen mutasyonu belirledik (%3.45). Genel araştırma grubumuz içinde değerlendirildiğinde bu oran %0.2 (3/1030) olarak hesaplandı. Yapılan çalışmalarda sağlıklı kontrollerde bu 3 mutasyonun birlikteliği hiç bildirilmediği için çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonucun değerli olduğu kanaatindeyiz.

Yapılan çalışmalarda FV Leiden mutasyonunun otozomal dominant kalıtıldığı ve her iki cinsiyette yaklaşık eşit oranlarda görüldüğü bildirilmiştir (1,12,125,126). Rosendaal ve arkadaşları homozigot mutasyonun daha sık olarak kadınlarda izlendiğini bildirmişler (21) ancak bu bilgi daha sonraki çalışmalarda desteklenmemiştir. Biz de yapmış olduğumuz çalışmada, FV Leiden mutasyonu saptanan erkeklerin %83.7'sinde heterozigot, %16.3'ünde homozigot; kadınların ise %90.9'unda heterozigot, %9.1'inde homozigot mutasyon belirleyerek iki cins arasında genotip açısından anlamlı fark saptamadık ( $p=0.352$ ).

FV Leiden mutasyonu tromboz için önemli bir risk faktörüdür (12,19-21,153,209,238) ve APC direnci varlığında en yaygın klinik prezantasyon derin ve yüzeysel ven trombozudur (14,17,151,158-160,162, 208,239,240). Pulmoner emboli ve alışılmadık bölgelerdeki trombozlar PC, PS ve ATIII eksikliğine göre daha azdır (129,135,151). Yapılan klinik çalışmalarda ilk venöz tromboz epizodu geçiren bireylerin %15-40'ında APC direnci tanımlanmıştır, bu oran diğer kalıtsal anormalliklerden oldukça yüksektir (13-15). Seçilmiş olgularda bu oran %60'lara ulaşmaktadır (11,16,17,18,129). Normal bireylere göre heterozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda venöz tromboz riski 5-10 kat, homozigotlarda ise 30-140 kat artmıştır (6,10,12,18-22,62).

Biz yapmış olduğumuz çalışmamızda FV Leiden mutasyonuna sahip olgulardan 2'sinin anamnezinde DVT öyküsü belirledik (%2.29). Bunlardan birincisi homozigot FV Leiden ve heterozigot MTHFR, diğeri heterozigot FV Leiden, heterozigot PT ve heterozigot MTHFR gen mutasyonu taşımaktaydı. Bu ikinci olgunun anamnezinde DVT sonrası pulmoner tromboemboli öyküsü de mevcuttu.

Preeklampsi/eklampsi, plasental abrupsiyon, açıklanamayan ölü doğum ve fetal gelişme geriliği gibi gebelik komplikasyonlarının varlığında, APC direnci ve FV Leiden mutasyonunun değerlendirildiği çalışmalarda FV Leiden mutasyonu varlığı, gebelik komplikasyonları ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur (281,283,284). FV Leiden mutasyonu ile gebelik ilişkisinin incelendiği çalışmalarda, özellikle erken fetal kayıp (1.trimestr) ile sonuçlanan gebeliklerde trombofili oranları çok yüksek bulunurken (%66), en yaygın trombofili nedeni olarak da FV Leiden mutasyonu (%10.3-25) rapor edilmiştir (163,279,285). Biz araştırmamızda, FV Leiden mutasyonuna sahip 87 olgunun 3'ünün anamnezinde abortus öyküsü belirledik (%3.44). Bunlardan birincisi heterozigot FV Leiden ve heterozigot MTHFR gen mutasyonuna, diğeri iki olgu da heterozigot FV Leiden ve homozigot MTHFR gen mutasyonuna sahipti.

FV Leiden mutasyonu taşıyıcılarının birinci derece akrabalarında her yıl için tromboz gelişme olasılığı %0.45'dir. 15-30 yaş grubunda bu oran %0.25 iken 60 yaş üzerinde %1.1'dir. Ailesel tromboz öyküsü olanların yaklaşık %50'sinde APC direnci saptanmıştır (135,242). İsveç'te yapılan bir aile çalışmasında; 40 yaşın altında venöz tromboz anamnezi olan 50 vakanın ailelerinden 306 birey taranmış ve homozigot FV Leiden mutasyonu %40, heterozigot mutasyon %20 bulunarak kontrol grubuna göre (%8) anlamlı oranda yüksek olduğu bildirilmiştir (361). Svensson ve Dahlback APC direnci saptanan 34 ailenin 211 bireyinin 49'unda (%23) tromboz anamnezi belirlemişlerdir (14).

Yapmış olduğumuz bu araştırmada, FV Leiden mutasyonu taşıyan 87 olgunun 2'sinde aile anamnezi belirledik (%2.29). Bunlardan homozigot FV Leiden mutasyonuna sahip birinci olgunun babasında DVT, heterozigot FV Leiden mutasyonu taşıyan diğer olgunun ablasında tekrarlayan düşük ve ölü doğum öyküsü bulunmaktaydı.

Homozigot veya heterozigot FV Leiden mutasyonunun tromboz riskini arttırdığı bir çok çalışmada kanıtlanmış olmasına rağmen FV Leiden mutasyonu saptanan olgularda profilaktik olarak antikoagülan tedavi verilmesi hala tartışmalıdır. Öz ve soygeçmişlerinde tromboz öyküsü olmayan FV Leiden genotipi yönünden heterozigot olan kişilere, diğer hiperkoagülabilité oluşturacak defekt yok ise trombozu provoke eden cerrahi girişim, immobilizasyon, OKS kullanımı gibi durumlarda profilaktik antikoagülan tedavi önerilmektedir (3,21,47,388). Öz ve soygeçmişlerinde tromboz öyküsü olmayan homozigotlarda ve hiperkoagülabilitéye neden olan iki veya daha fazla genetik defekt saptanan olgularda devamlı profilaktik antikoagülan tedavinin verilip verilmeyeceği, yada hangi durumlarda ne kadar süre ile verileceği konusunda kesin bir fikir birliği yoktur. Rosendaal ve arkadaşları bu olgularda ömür boyu profilaksinin 80 kat artmış olan tromboz riskini belirgin derecede azaltacağını savunmaktadırlar (21). Dahlback ve Bauer ise devamlı antikoagülan tedavinin kanama riskinden dolayı gereksiz olduğunu, risk durumlarında profilaktik tedavinin verilmesinin daha uygun olduğunu bildirmişlerdir (47,388). Homozigot FV Leiden mutasyonuna



veya kombine defekte sahip tromboz gelişen bir olguda ise ömür boyu profilaksi gereklidir (117). Çalışmamızda, tromboz öyküsü belirlediğimiz 2 olguda kombine genetik defekt mevcuttu. Bu olgulara geniş kapsamlı bilgi verilip, ömür boyu profilaktik oral antikoagülan tedavi başlandı. Anamnezlerinde tromboz öyküsü olmayan diğer olgulara risk durumlarında (cerrahi, gebelik, travma v.b.) profilaktik tedavinin gerekliliği ve önemi vurgulandı.

Sonuç olarak; yapmış olduğumuz bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre sağlıklı bireylerde FV Leiden sıklığı oldukça yüksektir. Sağlıklı popülasyonda bu derece sık görülen, tromboz etyolojisinde suçlanan kalıtsal nedenlerin başında gelen APC direnci ve FV Leiden mutasyon varlığı, tromboz vakalarında ilk araştırılması gereken patolojiler olmalıdır.

## 6. SONUÇLAR

1. Denizli il merkezinde yaşayan 1030 sağlıklı gönüllü kişide yaptığımız çalışma sonucunda APC direnci prevalansı %9 (93/1030) olarak saptandı. Erkeklerde APC direnci oranı %9.0 (45/500), kadınlarda %9.1 (48/530) olarak bulundu. Cinsiyet ile APC direnci varlığı arasındaki ilişkiye bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (p:0.975).
2. APC direnci saptanan olguların %93.5'inde (87/93) FV Leiden mutasyonu belirlendi.
3. Denizli il merkezindeki sağlıklı popülasyonda FV Leiden prevalansı %8.4 (87/1030) oranında bulundu. Bunlarda heterozigot olanların oranı % 7.34 (76/1030), homozigot olanların oranı ise %1.06 (11/1030) olarak belirlendi.
4. Kombine defektler açısından yapılan incelemelerde; FV Leiden ile protrombin G20210A gen mutasyonu birlikteliği %4.59 (4/87) olarak bulundu. Bu olguların hepsinde hem protrombin, hem de FV Leiden gen mutasyonu için heterozigot genotipteydi.
5. FV Leiden ile MTHFR C677T gen mutasyonu birlikteliği %51.72 (45/87) oranında belirlendi. Bunların %71'inde heterozigot FV Leiden ve heterozigot MTHFR gen mutasyonu, %13'ünde heterozigot FV Leiden ve homozigot MTHFR gen mutasyonu, %6.6'sında homozigot FV Leiden ve heterozigot MTHFR gen mutasyonu, %2.2'sinde homozigot FV Leiden ve homozigot MTHFR gen mutasyonu mevcuttu.
6. FV Leiden, protrombin G20210A ve MTHFR C677T gen mutasyonu birlikteliği ise %3.45 (3/87) oranında bulundu.

## 7. ÖZET

### DENİZLİ İLİNDE SAĞLIKLI KİŞİLERDE AKTİVE PROTEİN C DİRENCİ VE FAKTÖR V LEİDEN MUTASYON SIKLIĞI

**Giriş ve Amaç:** Herediter trombozise yol açan nedenlerden en sık görüleni aktive protein C direncidir. APC dirençli hastaların %25 inde 50 yaşından önce tromboz gelişir. Homozigot FV Leiden'li kişiler normallere göre 90 kat fazla, heterozigotlara göre ise 10 kat fazla tromboz riskine sahiptir. Seçilmiş venöz trombozlu olguların %20-60'ında etyolojik neden APC direncidir. FV Leiden sıklığı etnik yapı ile ilişkili olup, değişik coğrafik yerleşim alanlarında farklı oranlarda bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı Denizli yöresinde sağlıklı kişilerde Faktör V Leiden sıklığını araştırmaktır.

**Metod:** Çalışma; evlilik öncesi talasemi taraması yaptırmak üzere il sağlık müdürlüğü laboratuvarına başvuran, sağlıklı-gönüllü 1030 kişide yapıldı. APC direnci tayini STA-STACLOT APC-R kiti, molekül analiz FV-PTH-MTHFR strip A<sup>ssay</sup> (Vienna Lab-Labordiagnostica GmbH Austria) kiti kullanılarak yapıldı. APC direnci saptananların tamamında aynı zamanda protrombin ve Metilentetrahidrofolatredüktaz (MTHFR) gen mutasyonu araştırıldı.

**Bulgular:** Çalışmaya alınan sağlıklı-gönüllülerin yaş ortalaması  $25.11 \pm 6.21$  olup, 500'ü erkek, 530'u kadındı. Tarama yapılan 1030 gönüllünün 93 tanesinde (%9) APC direnci saptandı. Bu 93 kişinin 45'i erkek 48'i kadın idi ve iki cins arasında APC direnci varlığı açısından istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı ( $p:0.975$ ). APC direnci saptanan 93 kişinin 87'sinde (%93.5) FV Leiden mutasyonu pozitif olarak saptandı. FV Leiden pozitifliği olanların %87.4'ü (76 kişi) heterozigot iken, %12.6'sı (11 kişi) homozigot idi. Çalışma grubunda FV Leiden pozitifliği 87 kişide (%8.4) saptanmış olup, bunlarda heterozigot olanların oranı % 7.34 (76 kişi), homozigot olanların oranı ise %1.06 (11 kişi) olarak bulundu. FV Leiden ile Protrombin G20210A mutasyonu birlikteliği 4 kişide (%4.59); FV Leiden ile MTHFR C677T mutasyonu birlikteliği 45 kişide (%51.72); FV Leiden,

Protrombin ve MTHFR gen mutasyonları birlikteliği ise 3 kişide (%3.45) saptandı.

**Sonuç:** APC direnci ve FV Leiden sıklığı Avrupa'da %3-10 arasında bulunurken, Asya ve Afrika'da çok nadir olarak görülmektedir. Ülkemizde FV Leiden alışmaları daha ziyade tromboemboli geçiren hasta gruplarında yapılmıştır. Sağlıklı kişilerde yapılan çalışmalar sınırlı olup, oranları %1.8-%7.1 arasında değişmektedir. Denizli yöresindeki oran biraz daha yüksek çıkmıştır. Dikkati çeken bir diğer bulgu da FV Leiden mutasyonu olanların yarısında beraberinde MTHFR gen mutasyonu bulunmasıdır.



## 8. SUMMARY

### INCIDENCE OF ACTIVE PROTEIN C RESISTANCE AND FACTOR V LEIDEN MUTATION IN HEALTHY SUBJECTS LIVING IN DENIZLI

**Background and Objective :** The most common cause of hereditary thrombosis is active protein C resistance. In 20 percent of APC resistant patients a thrombotic event occurs before age 50. Homozygous carriers of FV Leiden mutation bear 90 fold increased thrombosis risk when compared to normal subjects and 10 fold risk than heterozygous carriers. In selected venous thrombosis cases, etiology seems to be APC resistance in 20 to 60 percent of the group. FV Leiden mutation is related with ethnical structure and incidence of the mutation has been shown to be difference in different geographical regions. The purpose of this study is to determine the incidence of Factor V Leiden mutation in the city of Denizli.

**Method :** Study is carried out with 1030 health volunteers who admitted to the laboratory of health ministry office for pre-marriage thalassaemia screening. APC resistance was studied by STA-STACLOT APC-R kit and molecular analysis was performed using FV-PTH-MTHFR Strip Assay (Vienna Lab-Laboradiagnostica GmbH, Austria) kit. Subjects showing APC resistance were also screened for Prothrombin and Methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) gene mutation.

**Results :** The study group was formed by 500 male and 530 female healthy volunteers and their mean age was  $25.11 \pm 6.21$  years. In 93 of 1030 subjects (9 %) APC resistance was detected. 45 of those APC resistant subjects were male and 48 of them were female where we found no statistically significant difference regarding APC resistance ( $p:0.975$ ). In 87 of this APC resistant group (93.5 %) FV Leiden mutation was present. 87.4 % of FV Leiden positive group (76 subjects) were heterozygous and 12.6 % (11 subjects) of them were homozygous carriers. FV Leiden mutation was detected in 87 subjects (8.4 %) and 76 of them

were heterozygous carriers who consisted 7.34 % of the study group. Homozygous carriers of FV Leiden were 1.06 % of the group (11 subjects). FV Leiden and Prothrombin G20210A mutation co-existence was present in 4 (4.59 %) subjects; FV Leiden and MTHFR C677T mutation co-existence was detected in 45 (51.72 %) volunteers; where FV Leiden, Prothrombin and MTHFR gene mutation have co-existed in 3 (3.45 %) subjects.

**Conclusion :** Incidence of APC resistance and FV Leiden is between 3 and 10 percent in Europe, however it is rarely seen in Asia and Africa. In our country, FV Leiden studies have been carried out on patients suffered from thromboembolic events. Studies consisting of healthy subjects are quite restricted and does not exceed 1.8 or 7.1 % of the studies. Incidence of the mutation was found to be slightly higher in Denizli population. Another striking finding is the co existence of MTHFR gene mutation in half of the FV Leiden carrier group.

## 9. KAYNAKLAR

1. Rodgers GM. Thrombosis and antithrombotic therapy. In Wintrobe's Clinical Hematology, 10th edition (eds: G.Richard Lee, John Foerster, John Lukens, Frixos Paraskevas, John P Greer, George M Rodgers) Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, page:1781-1820
2. Nachman RL, Silverstein R. Hypercoagulable state. *Ann Intern Med* 1993;119:819-827
3. Walker ID, Greaves M, Preston FE. Guideline:Investigation and management of heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2001;114:512-528
4. Bauer KA, Rosendaal FR, Heit JA: Hypercoagulability: Too many tests, too much conflicting data. *Hematology* 2002 (1): 353
5. Bertina RM. Genetic aspects of venous thrombosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:189-192
6. Ornstein DL, Cushman M. Factor V Leiden. *Circulation* 2003;107:e94-e97
7. Hirsh J and Lee AYY. How we diagnose and treat deep vein thrombosis. *Blood* 2002;99:3102-3110
8. Thomas DP, Roberts HR. Hypercoagulability in Venous and Arterial Thrombosis. *Ann Intern Med* 1997;126:638-644
9. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1993;353:1167-1173
10. Bertina RM. Venous Thrombosis — The Interaction of Genes and Environment. *N Engl J Med* 1998; 338:1839-1841
11. Nicolaes GAF, Dahlbäck B. Factor V and thrombotic disease. Description of a Janus-Faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:530-538
12. Dahlbäck B, Carlsson M, Svenson 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 USA* 1993;90:1004-1008
13. Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, Gitel S, Dardik R, Rosenberg N, Berliner S, Inbal A, Many A, Lubetsky A, Varon D, Martinowitz U, Seligsohn U. Single and combined prothrombotic factors in patients with

idiopathic venous thromboembolism. Prevalence and risk assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:511-518

14. Svensson PJ, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994;330:517-522
15. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernández JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993;82:1989-1993
16. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996;87:3531-3544
17. Zöller B, Hillarp A, Berntorp E, Dahlbäck B. Activated protein C resistance due to a common factor V gene mutation is a major risk factor for venous thrombosis. *Annu Rev Med* 1997;48:45-58
18. Bertina RM. Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin Chem* 1997;43:1678-1683
19. Price DT, Ridker PM. Factor V Leiden mutation and the risk for thromboembolic disease. *Ann Intern Med* 1997;127:895-903
20. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Beverly RK, Psaty BM, Longstreth WT, Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997;89:2817-2821
21. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance) *Blood* 1995;85:1504-1508
22. Gale AJ, Heeb MJ, Griffin JH. The autolysis loop of activated protein C interacts with factor Va and differentiates between the Arg506 and Arg306 cleavage sites. *Blood* 2000;96:585-593
23. Samama MM, Trossaert M, Horellou MH, Elalamy I, Conard J: Risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden. *Blood* 1995;86:4700-4702
24. Esmon CT. Blood Coagulation. In Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 5th edition (eds: David G Nathan, Stuart H Orkin) WB



Saunders Company, Philadelphia, page:1531-1556

25. Greenberg CS, Orthner CL. Blood Coagulation and fibrinolysis. In Wintrobe's Clinical Hematology, 10th edition (eds: G.Richard Lee, John Foesrster, John Lukens, Frixos Paraskevas, John P Greer, George M Rodgers) Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, page:684-764
26. Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet* 2000;355:1627-32
27. Sayinalp N. Hemostaz Tarama Testleri: Önce Hangisini Kullanmalıyım? XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi  
III. Hematoloji ilk Basamak Kursu
28. Mann KG. Coagulation 1999. Medscape Conference Coverage, based on selected sessions at the: XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Release Date: September 9, 1999; Valid for credit through September 9, 2000
29. Lind SE, Marks PW, Ewenstein BM. Hemostatic System. In Handin RI, Lux SE, Stossel TP (eds.): Principles and Practice of Hematology, second ed, 2003, Lippincott Williams & Wilkins, Chap 31,17865-17893
30. Sheehan J, Templer M, Gregory M, Hanumanthaiah R, Troyer D, Phan T, Thankavel B, Jagadeeswaran P. Demonstration of the extrinsic coagulation pathway in teleostei: Identification of zebrafish coagulation factor VII. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:8768-8773
31. Kuenen BC, Levi M, Meijers JCM, Kakkar AK, van Hinsbergh VWM, Kostense PJ, Pinedo HM, Hoekman K. Analysis of Coagulation Cascade and Endothelial Cell Activation During Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Pathway in Cancer Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1500-1505
32. Sekiya F, Yoshida M, Yamashita T, Morita T. Magnesium(II) Is a Crucial Constituent of the Blood Coagulation Cascade. *J Biol Chem* 1996;271:8541-8544
33. Kjalke M, Silveira A, Hamsten A, Hedner U, Ezban M. Plasma Lipoproteins Enhance Tissue Factor-Independent Factor VII Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1835-1841
34. Chow TW, Hellums JD, Moake JL, Kroll MH. Shear stress-induced von

- Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. *Blood* 1992;80:113-120
35. Ruf W. Tissue Factor. Medscape Conference Coverage, based on selected sessions at the: XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Release Date: September 9, 1999; Valid for credit through September 9, 2000
  36. Blostein MD, Furie BC, Rajotte I, Furie B. The Gla Domain of Factor IXa Binds to Factor VIIIa in the Tenase Complex. *J Biol Chem* 2003;278:31297-31302
  37. Nesheim ME, Tracy RP, Mann KG. "Clotspeed," a mathematical simulation of the functional properties of prothrombinase. *J Biol Chem* 1984;259:1447-1453
  38. Pryzdial ELG, Bajzr L, Nesheim ME. Prothrombinase Components Can Accelerate Tissue Plasminogen Activator-catalyzed Plasminogen Activation. *J Biol Chem* 1995;270:17871-17877
  39. Gresele P, Momi S, Berrettini M, Nenci GG, Schwarz HP, Semeraro N, Colucci M. Activated human protein C prevents thrombin-induced thromboembolism in mice. *J Clin Invest* 1998;101:667-676
  40. Ulutin ON. The Relationship of Haemostatic System to the Vessel Wall, Thromboembolism, Atherosclerosis from Pathogenesis and Laboratory Standpoints. *Turk J Haematol* 2002;19(1):7-29
  41. Mammen EF. Natural coagulation inhibitors and inflammation. *Turk J Haematol* 2002;19:97-102
  42. Bauer KA, Zwicker JI. Natural Anticoagulants and the Prethrombotic State. In Handin RI, Lux SE, Stossel TP (eds.): *Principles and Practice of Hematology*, second ed, 2003, Lippincott Williams & Wilkins, Chap 42, 18105-18147
  43. Crawford BE, Olson SK, Esko JD, Pinhal MAS. Cloning, Golgi Localization, and Enzyme Activity of the Full-length Heparin/Heparan Sulfate-Glucuronic Acid C5-epimerase. *J Biol Chem* 2001;276:21538-21543.
  44. Arai T, Parker A, Busby W, Clemmon DR. Heparin, heparan sulfate, and dermatan sulfate regulate formation of the insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein complexes. *J Biol Chem* 1994;269:

20388-20393

45. van Boven HH, Olds RJ, Thein SL, Reitsma PH, Lane DA, Briet E, Vandembroucke JP, Rosendaal F.R. Hereditary Antithrombin Deficiency: Heterogeneity of the Molecular Basis and Mortality in Dutch Families. *Blood*, 1994;84:4209-4213
46. Jochmans K, Lissens W, Vervoort R, Peelers S, De Waele M, Liebaers I. Antithrombin-Gly 424 Arg: A Novel Point Mutation Responsible for Type 1 Antithrombin Deficiency and Neonatal Thrombosis. *Blood* 1994;83:146-151
47. Dahlbäck B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic Factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995;85:607-614
48. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989;264:4743-4746
49. Chrobak L, Dulicek P. Resistance to activated protein C as pathogenic factor of venous thromboembolism. *ACTA MEDICA* 1996; 39: 55-62
50. Regan LM, Mollica JS, Rezaie AR, Esmon CT. The interaction between the endothelial cell protein C receptor and protein C is dictated by the  $\gamma$ -carboxyglutamic acid domain of protein C. *J Biol Chem* 1997;272:26279-26284
51. Smirnov MD, Safa O, Regan L, Mather T, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Rezaie AR, Esmon NL, Esmon CT. A chimeric protein C containing the prothrombin Gla domain exhibits increased anticoagulant activity and altered phospholipid specificity. *J Biol Chem* 1998;273:9031-9040
52. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GI, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996;93:10212-10216
53. Rezaie AR, Esmon CT. Proline at the P2 position in protein C is important for calcium-mediated regulation of protein C activation and secretion. *Blood* 1994;83:2526-2531
54. Rezaie AR, Esmon CT. The function of calcium in protein C activation by thrombin and the thrombin-thrombomodulin complex can be distinguished by mutational analysis of protein C derivatives. *J Biol Chem* 1992;267:26104-

26109

55. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica J, Ferrell GL, Esmon T. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10212-10216
56. Xu J, Esmon NL, Esmon CT. Reconstitution of the human endothelial cell protein C receptor with thrombomodulin in phosphatidylcholine vesicles enhances protein C activation. *J Biol Chem* 1999;274:6704-6710
57. Petäjä J, Fernández JA, Gruber A, Griffin JH. Anticoagulant synergism of heparin and activated protein C in vitro. *J Clin Invest* 1997;99:2655-2663
58. De Cristofaro R, De Candia E, Landolfi R. Effect of High- and Low-Molecular-Weight Heparins on Thrombin-Thrombomodulin Interaction and Protein C Activation. *Circulation* 1998;98:1297-1301
59. Arnljots B; Dahlbäck B. Antithrombotic Effects of Activated Protein C and Protein S in a Rabbit Model of Microarterial Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:937-941
60. Kalafatis M, Lu D, Bertina RM, Long GL, Mann KG. biochemical prototype for familial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2181-2187
61. Nicolaes GAF, Tans G, Thomassen MCLGD, Hemker HC, Pabinger I, Varadi K, Schwarz HP, Rosing J. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor Va<sup>R506Q</sup> by activated protein C. *J Biol Chem* 1995;270:21158-21166
62. Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD, Mann KG. Characterization of the molecular defect in factor V<sup>R506Q</sup>. *Biol chem* 1995;270:4053-4057
63. Camire RM, Kalafatis M, Cushman M, Tracy RP, Mann KG, Tracy PB. The mechanism of inactivation of human platelet factor Va from normal and activated protein C-resistant individuals. *J Biol Chem* 1995;270:20794-20800
64. Friedrich U, Nicolaes GAF, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Secondary substrate-binding exosite in the serine protease domain of activated protein C important for cleavage at Arg-506 but not at Arg-306 in factor Va. *J Biol Chem* 2001;276:23105-23108
65. Villoutreix BO, Dahlback B. Structural investigation of the A domains of

- human blood coagulation factor V by molecular modeling. *Protein Sci* 1998;7:1317-1325
66. Regan LM, Lamphear BJ, Huggins CF, Walker FJ, Fay PJ. Factor IXa protects factor VIIIa from activated protein C. *J Biol Chem* 1994;269:9445-9452
  67. Monkovic DD, Tracy PB. Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin. *J Biol Chem* 1990;265:17132-17140
  68. Long GL, Lu D, xie R-L, Kalafatis M. Human protein S cleavage and inactivation by coagulation factor Xa. *J Biol Chem* 1998;273:11521-11526
  69. Toulon P, Adda R, Perez P. Sensitivity of the ProC Global Assay for protein C pathway abnormalities. Clinical experience in 899 unselected patients with venous thromboembolism. *Thromb Res* 2001; 104:93-103
  70. Toulon P, Lequerrec A, Piquet P, Robert A, Biron C. Significant influence of the instrument on the result of the ProC global assay. A multicenter evaluation using lyophilized plasmas and frozen plasma samples from carriers and non-carriers of the factor V Leiden mutation. *Thromb Res* 2002;107:181-188
  71. Tripodi A, Mannucci PM. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 2001;47:1597-1606
  72. Gemmati D, Serino ML, Scapoli GL. A modified functional global test to measure protein C, protein S activities and the activated protein C-resistance phenotype. *Thromb Res* 1998;92:141-148
  73. Sillero PL, Velasco JF, Loscertales J, Espinoza J, Soto C, Tomas JF. ProC global: An automated screening test for factor V Leiden and prothrombin mutation 20210 G to A detection. *Thromb Res* 2001;101:215-216
  74. Dudek AZ, Pennell CA, Decker TD, Young TA, Key NS, Slungaard A. Platelet factor 4 binds to glycanated forms of thrombomodulin and to protein C. *J Biol Chem* 1997;272:31785-31792
  75. Kumagai K, Nishiwaki K, Sato K, Kitamura H, Yano K, Komatsu T, Shimada Y. Perioperative management of a patient with purpura fulminans syndrome due to protein C deficiency : [La démarche anesthésique périopératoire adoptée chez une patiente atteinte du syndrome de purpura fulminans causé

- par un déficit en protéine C]. *Can J Anesth*, Dec 2001; 48: 1070 – 1074
76. Prendes MJ, Bielek E, Zechmeister-Machhart M, Vanyek-Zavadil E, Carroll VA, Breuss J, Binder BR, Geiger M. Synthesis and Ultrastructural Localization of Protein C Inhibitor in Human Platelets and Megakaryocytes. *Blood* 1999;94:1300-1312
  77. Nishioka J, Nings M, Hayashi T, Suzuki K. Protein C inhibitor secreted from activated platelets efficiently inhibits activated protein C on phosphatidylethanolamine of platelet membrane and microvesicles. *J Biol Chem* 1998;273:11281-11287
  78. Rezaie AR, Cooper ST, Church FC, Esmon CT. Protein C Inhibitor Is a Potent Inhibitor of the Thrombin-Thrombomodulin Complex. *J Biol Chem* 1995; 270: 25336–25339
  79. Elisen MGLM, von dem Borne PAK, Bouma BN, Meijers JCM. Protein C inhibitor acts as a procoagulant by inhibiting the thrombomodulin-induced activation of protein C in human plasma. *Blood* 1998;91:1542-1547
  80. Dahlbäck B. Ultrastructure of human coagulation factor V. *J Biol Chem* 1985;260:1347-1349
  81. Le Flem L, Picard V, Emmerich J, Gandrille S, Fiesinger J-N, Aiach M, Alhene-Gelas M. Mutations in promoter region of thrombomodulin and venous thromboembolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1098-1104
  82. Freedman JE. Thrombin, Thrombomodulin, and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulating Cellular Proliferation. *Circ Res*. 2001;88:651-653
  83. Owen WG, Esmon CT: functional properties of an endothelial cell cofactor for the thrombin catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem*. 1981;256:5532-5535
  84. Henry M, Aubert H, Morange PE, Nanni I, Alessi M-C, Tiret L, Juhan-Vague I. Identification of polymorphisms in the promoter and the 39 region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. *Blood*. 2001;97:2053-2058
  85. Boffa MB, Wang W, Bajzar L, Nesheim ME. Plasma and Recombinant

- Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) and Activated TAFI Compared with Respect to Glycosylation, Thrombin/Thrombomodulin-dependent Activation, Thermal Stability, and Enzymatic Properties. *J Biol Chem* 1998;273:2127–2135,
86. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or Plasma Procarboxypeptidase B, Couples the Coagulation and Fibrinolytic Cascades through the Thrombin-Thrombomodulin Complex. *J Biol Chem* 1996;271:16603–16608
  87. Cote', HCF, Bajzar L, Stevens WK, Samis JA, Morser J, MacGillivray RTA, Nesheim ME. Functional characterization of recombinant human meizothrombin and meizothrombin(desfl). Thrombomodulin-dependent activation of protein C and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), platelet aggregation, antithrombin-III inhibition. *J Biol Chem* 1997;272:6194–6200
  88. Schneider M, Nagashima M, Knappe S, Zhao L, Morser J, Nesheim M. Amino Acid Residues in the P6-P<sub>3</sub> Region of Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) Do Not Determine the Thrombomodulin Dependence of TAFI Activation. *J Biol Chem* 2002;277:9944-9951
  89. Taylor FB, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 2001;97:1686-1688
  90. Liaw PCY, Mather T, Oganesyan N, Ferrell GL, Esmon CT. Identification of the protein C/Activated protein C binding sites on the endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* 2001;276:8364-8370
  91. Liaw PCY, Neuenschwander PF, Smirnov MD, Esmon CT. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem* 2000;275:5447-5452
  92. Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* 1996;271:17491-17498
  93. Simmonds RE, Lane DA. Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/major

- histocompatibility complex  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domains. *Blood* 1999;94:632-641
94. Fukudome K, Ye X, Tsuneyoshi N, Tokunaga O, Sugawara K, Mizokami H, Kimoto M. Activation mechanism of anticoagulant protein C in large blood vessels involving the endothelial cell protein C receptor. *J exp Med* 1998;187:1029-1035
  95. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994;269:26486-26491
  96. Fukudome K, Esmon CT. Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). *J Biol Chem* 1995;270:5571-5577
  97. Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica J, Fukudome K, Esmon T. The endothelial cell protein C receptor. *Biol Chem* 1996;271:17499-17503
  98. Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem* 1980; 255:5521-5524
  99. Dahlback B. Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J Biol Chem* 1986;261:12022-12027
  100. Lu D, Kalafatis M, Mann KG, Long GL. Comparison of activated protein C/protein S – mediated inactivation of human factor VIII and factor V. *Blood* 1996;87:4708-4717
  101. Shen L, Dahlbäck B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1994;269:18735-18738
  102. Norstrom EA, Steen M, Tran S, Dahlbäck B. Importance of protein S and phospholipid for activated protein C-mediated cleavages in factor Va. *J Biol Chem* 2003;278:24904-24911
  103. van't Veer C, Hackeng TM, Biesbroeck D, Sixma JJ, Bouma BN. Increased prothrombin activation in protein S-deficient plasma under flow conditions on endothelial cell matrix: an independent anticoagulant function of protein S in plasma. *Blood* 1995; 85: 1815 - 1821.
  104. Fujita T, Tamura N. Interaction of C4-binding protein with cell-bound C4b. A



- quantitative analysis of binding and the role of C4-binding protein in proteolysis of cell-bound C4b. *J Exp Med* 1983;157:1239-1251
105. Nishioka J, Suzuki K. Inhibition of cofactor activity of protein S by a complex of protein S and C4b-binding protein. Evidence for inactive ternary complex formation between protein S, C4b-binding protein, and activated protein C. *J Biol Chem* 1990;265:9072-9076
  106. Grabowski EF, Reininger AJ, Petteruti PG, Tsukurov O, Orkin RW. Shear Stress Decreases Endothelial Cell Tissue Factor Activity by Augmenting Secretion of Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:157-162
  107. Wun TC. Lipoprotein-associated coagulation inhibitor (LACI) is a cofactor for heparin: synergistic anticoagulant action between LACI and sulfated polysaccharides. *Blood* 1992;79:430-438
  108. Hamamoto T, Yamamoto M, Nordfang O, Petersen JGL, Foster DC, Kisiel W. Inhibitory Properties of Full-length and Truncated Recombinant Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). Evidence that the third kunitz-type domain of TFPI is not essential for the inhibition of factor VIIa-tissue factor complexes on cell Surfaces. *J Biol Chem* 1993;268:8704-8710
  109. Chandler WL, Alessi MC, Aillaud MF, Henderson P, Vague P, Juhan-Vague I. Clearance of Tissue Plasminogen Activator (TPA) and TPA/Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) Complex Relationship to Elevated TPA Antigen in Patients With High PAI-1 Activity Levels. *Circulation* 1997;96:761-768
  110. Hajjar KA. The molecular basis of fibrinolysis. In Nathan and Oski's *Hematology of Infancy and Childhood*, 5<sup>th</sup> edition (eds: David G Nathan, Stuart H Orkin) WB Saunders Company, Philadelphia, page:1557-1573
  111. Chandler WL, Alessi MC, Aillaud MF, Henderson P, Vague P, Juhan-Vague I. Clearance of Tissue Plasminogen Activator (TPA) and TPA/Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) Complex. Relationship to Elevated TPA Antigen in Patients With High PAI-1 Activity Levels. *Circulation* 1997;96:761-768

112. David A. Waltz, Lisa R. Natkin, Ross M. Fujita, Ying Wei, and Harold A. Chapman  
Plasmin and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Promote Cellular Motility by Regulating the Interaction between the Urokinase Receptor and Vitronectin. *J. Clin. Invest.*, Jul 1997; 100: 58 - 67
113. De Prada NA, Schroeck F, Sinner E-K, Muehlenweg B, Twellmeyer J, Sperl S, Wilhelm OG, Schmitt M, Magdolen V. Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin: Characterization of different PAI-1 mutants. *Eur J Biochem* 2002;269:184-192
114. Chandler WL, Trimble SL, Loo SC, Mornin D. Effect of PAI-1 levels on the molar concentrations of active tissue plasminogen activator (t-PA) and t-PA/PAI-1 complex in plasma. *Blood* 1990;76:930-937
115. Gombau L and Schleef RR. Processing of type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) into the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* 1994;269:3875-3880
116. Lijnen HR, Collen D. Fibrinolytic System and Its Disorders.. In Handin RI, Lux SE, Stossel TP (eds.): *Principles and Practice of Hematology*, second ed, 2003, Lippincott Williams & Wilkins, Chap 40, 17949-17966
117. Seligsohn U, Libertsy A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001; 344:1222-1231
118. Dunn ST, Trong S. Evaluation of role of factor V Leiden mutation in fatal pulmonary thromboembolism. *Thromb Res* 1998;91:7-14
119. Kuismanen K, Savontaus M-L, Kozlov A, Vuorio AF, Sajantila A. Coagulation factor V Leiden mutation in sudden fatal pulmonary embolism and in a general northern European population sample. *Forensic Science International* 1999;106:71-75
120. Hull RD, Hirsh J, Carter CJ, Jay RM, Dood PE, Ockelford PA et al. Pulmonary angiography, ventilation lung scanning and venography for clinically suspected pulmonary embolism with abnormal perfusion lung scan. *Ann Intern Med* 1983; 98:891-898
121. Metintaş S. Venöz trombüs ve pulmoner tromboemboli epidemiyolojisi. (ed: Metintaş M) ASD Toraks yayınları. Metin ofset matbaacılık, 2001; 3-15

122. Rosendaal FR. Risk Factors in Venous Thrombotic Disease. Medscape Conference Coverage, based on selected sessions at the: XVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Release Date: September 9, 1999; Valid for credit through September 9, 2000
123. Abramson N, Abramson S. Hypercoagulability: Clinical Assessment and Treatment. *South Med J* 2001;94(10):1013-1020.
124. Çağırğan Ç. Venöz tromboembolizmde etyolojik faktörler ve patogenezi. I. Ege Dahili Tıp Günleri 25-27 Nisan 2002, İzmir, sayfa 197-201
125. Florell SR, Rodgers GM. Inherited Thrombotic Disorders: An Update. *Am J Hematol.* 1997;54:53-60
126. Robertoye R, Rodgers GM. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. *Am J Hematol* 2001;68:256-268
127. Olds RJ, Lane DA, Thein SL. Thrombotic Disorders. In *Principles of Molecular Medicine*, (ed: Larry Jameson), Humana Press, Totowa-New Jersey, page:219-226
128. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67
129. Goodnight SS, Griffin JH. Hereditary thrombophilia. In *Williams Hematology Textbook*, Sixth edition (ed: Ernest Beutler) McGraw Hill Medical Publishing, 2001, page: 1697-1714
130. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. 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;88:3698-3703
131. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000;95:1527-1528
132. Yanada M, Kojima T, Ishiguro K, Nakayama Y, Yamamoto K, Matsushita T, Kadomatsu K, Nishimura M, Muramatsu T, Saito H. Impact of antithrombin deficiency in thrombogenesis: lipopolysaccharide and stress-induced thrombus formation in heterozygous antithrombin-deficient mice. *Blood.* 2002;99:2455-2458
133. Sanson B-J, Simioni P, Tormene D, Moia M, Friederich PW, Huisman MV,

- Prandoni P, Bura A, Rejto L, Wells P, Mannucci PM, Girolami A, Büller HR, Prins MH. The Incidence of Venous Thromboembolism in Asymptomatic Carriers of a Deficiency of Antithrombin, Protein C, or Protein S: A Prospective Cohort Study. *Blood* 1999;94:3702-3706
134. Pabinger I; Schneider B. Thrombotic Risk in Hereditary Antithrombin III, Protein C, or Protein S Deficiency  
A Cooperative, Retrospective Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:742-748
135. Bucciarelli P, Rosendaal FR, Tripodi A, Mannucci PM, De Stefano V, Palaretti G, Finazzi G, Baudo F, Quintavalla R. Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency, or activated protein C resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1026-1033
136. David D, Ribeiro S, Ferrao L, Gago T, Crespo F. Molecular Basis of Inherited Antithrombin Deficiency in Portuguese Families: Identification of Genetic Alterations and Screening for Additional Thrombotic Risk Factors. *Am J Hematol* 2004;76:163–171
137. Aiach M, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Amaud E, Amiral J, Guize L, Fiessinger J-N, Emmerich J. Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1573-1576
138. Simioni P, Kalafatis M, Millar DS, Henderson SC, Luni S, Cooper DN, Girolami A. Compound heterozygous protein C deficiency resulting in the presence of only the  $\beta$ -form of protein C in plasma. *Blood* 1996;88:2101-2108
139. Sugahara Y, Miura O, Yuen P, Aoki N. Protein C deficiency Hong Kong 1 and 2: hereditary protein C deficiency caused by two mutant alleles, a 5-nucleotide deletion and a missense mutation. *Blood*, Jul 1992; 80: 126 - 133
140. Spek CA, Greengard JS, Griffin JH, Bertina RM, Reitsma PH. Two Mutations in the Promoter Region of the Human Protein C Gene Both Cause Type I Protein C Deficiency by Disruption of Two HNF-3 Binding Sites. *J Biol*

Chem 1995;270:24216-24221

141. Spek CA, Lannoy VJ, Lemaigre FP, Rousseau GG, Bertina RM, Reitsma PH. Type I Protein C Deficiency Caused by Disruption of a Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)-6/HNF-1 Binding Site in the Human Protein C Gene Promoter. *J Biol Chem* 1998;273:10168-10173
142. Lind B, Johnsen AH, Thorsen S. Naturally Occurring Arg<sup>-1</sup> to His Mutation in Human Protein C Leads to Aberrant Propeptide Processing and Secretion of Dysfunctional Protein C. *Blood* 1997;89:2807-2816
143. Koster T, Rosendaal FR, Briët E, van der Meer FJM, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR, Reitsma PH, Vandenbroucke JP. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: An infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden thrombophilia study) *Blood* 1995;65:2756-2761
144. Conard J, Bauer KA, Gruber A, Griffin JH, Schwarz HP, Horellou M-H, Samama MM, Rosenberg RD. Normalization of Markers of Coagulation Activation With a Purified Protein C Concentrate in Adults With Homozygous Protein C Deficiency. *Blood* 1993;82:1159-1164
145. Bauer KA. Rare hereditary coagulation factor abnormalities. In Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood, 5th edition (eds: David G Nathan, Stuart H Orkin) WB Saunders Company, Philadelphia, page:1660-1675
146. Espinosa-Parrilla Y, Morell M, Souto JC, Borrell M, Heine-Suner D, Tirado I, Volpini V, Estivill X, Sala N. Absence of Linkage Between Type III Protein S Deficiency and the PROS1 and C4BP Genes in Families Carrying the Protein S Heerlen Allele. *Blood*, Vol 89, No 8 (April 15), 1997: pp 2799-2806
147. Rezende SM, Lane DA, Mille-Baker B, Samama MM, Conard J, Simmonds RE. Protein S Gla-domain mutations causing impaired Ca<sup>2+</sup>-induced phospholipid binding and severe functional protein S deficiency. *Blood* 2002;100:2812-2819
148. Li M, Long GL. Identification of Two Novel Point Mutations in the Human Protein S Gene Associated With Familial Protein S Deficiency and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1407-1415
149. Espinosa-Parrilia Y, Yamazaki T, Sala N, Dahlbäck B, de Frutos PG. Protein

- S secretion differences of missense mutants account for phenotype heterogeneity. *Blood* 2000;95:173-179
150. Leroy-Matheron C, Gouault-Heilmann M, Aiach M, Gandrille S. A Mutation of the Active Protein S Gene Leading to an EGF1-Lacking Protein in a Family With Qualitative (Type II) Deficiency. *Blood* 1998;91:4608-4615
  151. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F, Paciaroni K, Leone G, Faioni EM. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood*. 1998;92(7):2353-2358
  152. Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, Zoller B, de Frutos PG, Dahlback B. Clarification of the Risk for Venous Thrombosis Associated with Hereditary Protein S Deficiency by Investigation of a Large Kindred with a Characterized Gene Defect. *Ann Intern Med* 1998;128:8-14
  153. Zöller B, Berntsdotter A, de Frutos PG, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S. *Blood* 1995;85:3518-3523
  154. Simmonds RE, Ireland H, Kunz G, Lane DA, the Protein S Study Group. Identification of 19 Protein S Gene Mutations in Patients With Phenotypic Protein S Deficiency and Thrombosis. *Blood* 1996;88:4195-4204
  155. Shen M-C, Lin J-S, Tsay W. Protein C and protein S deficiencies are the most important risk factors associated with thrombosis in Chinese venous thrombophilic patients in Taiwan. *Thromb Res* 2000;99:447-452
  156. Kyrle PA, Mannhalter C, Béguin S, Stümpflen A, Hirschl M, Weltermann A, Stain M, Brenner B, Speiser W, Pabinger I, Lechner K, Eichinger S. Clinical Studies and Thrombin Generation in Patients Homozygous or Heterozygous for the G20210A Mutation in the Prothrombin Gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1287-1291
  157. Brodmann M, Renner W, Stark G, Ramschak H, Seinost G, Pilger E. Coinheritance of factor V Leiden and prothrombin 20210A in an Austrian family as cause for early onset of venous thromboembolism. *Thromb Res* 2001;101:421-422
  158. 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;107:13-15
159. Varela MLI, Adamczuk YP, Forastiero RR, Martinuzzo ME, Cerrato GS, Pombo G, Carreras LO. Major and potential prothrombotic genotypes in a cohort of patients with venous thromboembolism. *Thromb Res* 2001;104:317-324
160. Amitrano L, Brancaccio V, Guardascione MA, Margaglione M, Iannaccone L, D'Andrea G, Ames PRJ, Marmo R, Mosca S, Balzano A. High prevalence of thrombophilic genotypes in patients with acute mesenteric vein thrombosis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:146-149
161. Cattaneo M, Chantarangkul V, Taioli E, Santos JH, tagliabue L. The G20210A mutation of the prothrombin gene in patients with previous first episodes of deep-vein thrombosis: prevalence and association with factor V G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T and plasma prothrombin levels. *Thromb Res* 1999;93:1-8
162. Renner W, Köppel H, Hoffmann C, Schallmoser K, Stanger O, Toplak H, Wascher TC, Pilger E. Prothrombin G20210A, factor V Leiden, and factor XIII Val34Leu: common mutations of blood coagulation factors and deep vein thrombosis in Austria. *Thromb Res* 2000;99:35-39
163. Reznikoff-Etiévant MF, Cayol V, Carbonne B, Robert A, Coulet F, Milliez J. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 2001;108:1251-1254
164. Meyer G, Emmerich J, Helley D, Arnaud E, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, Aiach M, Fischer A-M, Sors H, Fiessinger JN. Factor V Leiden and II 20210A in patients with symptomatic pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Am J Med* 2001;110:12-15
165. Conroy JM, Trivedi G, Sovd T, Caggana M. The allele frequency of mutations in four genes that confer enhanced susceptibility to venous thromboembolism in an unselected group of NewYork State Newborns. *Thromb Res* 2000;99:317-324
166. Kapur RK, Mills LA, Spitzer SG, Hultin MB. A prothrombin gene mutation is significantly associated with venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc*

- Biol 1997;17:2875-2879
167. Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM. The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol* 2000;111:1223-1229
  168. Miles JS, Miletich JP, Goldhaber SZ, Hennekens CH, Ridker PM. G20210A mutation in the prothrombin gene and the risk of recurrent venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:215-218
  169. Reuner KH, Ruf A, Grau A, Rickmann H, Stolz E, Jüttler E, Druschky KF, Patscheke H. Prothrombin Gene G202103A Transition Is a Risk Factor for Cerebral Venous Thrombosis. *Stroke* 1998;29:1765-1769.
  170. Silingardi M, Salvarani C, Boiardi L, Accardo P, Iorio A, Olivieri I, Cantini F, Salvi F, La Corte R, Triolo G, Ciccia F, Ghirarduzzi A, Filippini D, Paolazzi G, Iori I. Factor V Leiden and Prothrombin Gene G20210A Mutations in Italian Patients With Behcet's Disease and Deep Vein Thrombosis. *Arthritis & Rheumatism* 2004;51:177-183
  171. Verspyck E, Le Cam-Duchez V, Gravier A, Descargues G, Marpeau L, Borg JY. Small for gestational age infant in association with maternal prothrombin gene variant (nt 20210A). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;83:143-144
  172. Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A Mutation in Prothrombin Gene and Risk of Myocardial Infarction, Stroke, and Venous Thrombosis in a Large Cohort of US Men. *Circulation* 1999;99:999-1004
  173. Reiner AP, Rosendaal FR, Reitsma PH, Lemaitre RN, Pearce RM, Friedlander Y, Raghunathan TE, Psaty BM, Siscovick DS. Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and risk of sudden coronary death in apparently health persons. *Am J Cardiol* 2002;90:66-68
  174. Doggen CJM, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors. *Circulation* 1998;97:1037-1041
  175. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Casorelli I, Rossi E, Molinari M, Servidei S, Tonali PA, Leone G. Prothrombin G20210A Mutant Genotype Is



- a Risk Factor for Cerebrovascular Ischemic Disease in Young Patients. *Blood* 1998;91: 3562-3565
176. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A Common Prothrombin Variant (20210 G to A) Increases the Risk of Myocardial Infarction in Young Women. *Blood* 1997;90:1747-1750
  177. Martinelli I, Taioli E, Bucciarelli P, Akhavan S, Mannucci PM. Interaction Between the G20210A Mutation of the Prothrombin Gene and Oral Contraceptive Use in Deep Vein Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:700-703
  178. De Stefano V, Madonna P, Giannino A, Coppola A, Cerbone AM, Pauciullo P, Di Minno G. Idiopathic Budd-Chiari syndrome in a patient with homozygous factor V Leiden and heterozygous factor II G20210A mutations. *Thromb Res* 2000;100:567-568
  179. Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M, Lunghi B, Tormene D, Gireli D. Combinations of 4 mutations (FVR506Q, FVH1299R, FVY1702C, PT20210G/A) affecting the protrombinase complex in a thrombophilic family. *Blood* 2000;96:1443-1448
  180. Gouin-Thibault I, Arkam R, Nassiri S, Tourette A, Conard J, Horellou MH, Elalamy I, Samama MM. Markers of activated coagulation in patients with factor V Leiden and/or G20210A prothrombin gene mutation. *Thromb Res* 2002;107:7-11
  181. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, Rossi E, Leone G. The Risk of Recurrent Deep Venous Thrombosis among Heterozygous Carriers of Both Factor V Leiden and the G20210A Prothrombin Mutation. *N Engl J Med*, 1999;34:801-806
  182. Prisco D, Gori AM, Pepe G, Marcucci R, Brunelli T, Giusti B, Gensini GF, Abbate R. Factor II 20210 G-A polymorphism associated to factor V Leiden: a report of two thrombophilic families. *Thromb Res* 1998;89:249-252
  183. Akar N, Yilmaz E, Akar E. Coexistence of Two Prothrombotic Mutations, Factor V 1691 G-A and Prothrombin 20210 G-A, and the Risk of Thrombosis in Turkish Population. *Turk J Haematol* 2003;20(1): 31-33
  184. Austin H, Hooper WC, Dilley A, Drews C, Renshaw M, Ellingsen D, Evatt B.

The prevalence of two genetic traits related to venous thrombosis in whites and African-Americans. *Thromb Res* 1997;86:409-415

185. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;325: 1202-1206
186. Ungvari Z, Sarkadi-Nagy E, Bagi Z, Szollár L, Koller A. Simultaneously Increased TxA<sub>2</sub> Activity in Isolated Arterioles and Platelets of Rats With Hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1203-1208
187. Payne DA, Chamoun AJ, Seifert SL, Stouffer GA. MTHFR 677 C-T mutation a predictor of early-onset coronary artery disease risk. *Thromb Res* 2001; 103:275-279
188. Madonna P, de Stefano V, Coppola A, Cirillo F, Cerbone AM, Orefice G, Di Minno G. Hyperhomocysteinemia and Other Inherited Prothrombotic Conditions in Young Adults With a History of Ischemic Stroke. *Stroke*. 2002;33:51-56
189. Lalouschek W, Aull S, Serles W, Schnider P, Mannhalter C, Pabinder-Fasching I, Deecke L, Zeiler K. C677T MTHFR mutation and factor V leiden mutation in patients with TIA/minor stroke: a case-control study. *Thromb Res* 1999;93:61-69
190. Hsu T-S, Hsu L-A, Chang C-J, Sun C-F, Ko Y-L, Kuo C-T, Chiang C-W, Lee Y-S. Importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolism in a Taiwanese population. A case-control study. *Thromb Res* 2001; 102: 387-395
191. Eskes TKAB. Clotting disorders and placental abruption: homocysteine – a new risk factor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:206-212
192. Cattaneo M, Tsai MY, Bucciarelli P, Taioli E, Zighetti ML, Bignell M, Mannucci PM. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T) increases the risk for deep-vein thrombosis in patients with mutant factor V (factor V:Q<sup>506</sup>). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1662-1666
193. Quéré I, Perneger TV, Zittoun J, Bellet H, Gris J-C, Daurés J-P, Schved J-F, Mercier E, Laroche J-P, Dautat M, Bounameaux H, Janbon C. Red blood cell methylfolate and plasma homocysteine as risk factors for venous

- thromboembolism: a matched case-control study. *Lancet* 2002; 359:747-752
194. Legnani C, Palareti G, Grauso F, Sassi S, Grossi G, Piazzini S, Bernardi F, Marchetti G, Ferraresi P, Coccheri S. Hyperhomocyst(e)inemia and a Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutation (Ala<sup>223</sup>Val MTHFR) in Patients With Inherited Thrombophilic Coagulation Defects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2924-2929
  195. Kamphuisen PW, Lensen R, Houwing-Duistermaat JJ, Eikenboom JCJ, HARvey M, Bertina RM, Rosendaal FR. Heritability of elevated factor VIII antigen levels in factor V Leiden families with thrombophilia. *Br J Haematol* 2000;109:519-522
  196. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B, Weltermann A, Speiser W, Lechner K, Eichinger S. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000;343:457-62
  197. Miles AM, Monga M. Factor V Leiden mutation: the most commonly inherited risk factor for thromboembolism. *Prim Care Update Ob/Gyns* 1999;6:141-146
  198. Camire RM, Pollak ES, Kaushansky K, Tracy PB. Secretable Human Platelet-Derived Factor V Originates From the Plasma Pool. *Blood* 1998;92:3035-3041
  199. Tracy PB, Peterson JM, Nesheim ME, McDuffie FC, Mann KG. Interaction of coagulation factor V and factor Va with platelets. *J Biol Chem* 1979;254:10354-10361
  200. Oliver JA, Monroe DM, Church FC, Roberts HR, Hoffman M. Activated protein C cleaves factor Va more efficiently on endothelium than on platelet surfaces. *Blood*, Jun 2002; 100: 539 – 546
  201. Zivelin A, Griffin JH, Xu Xiao, Pabinger I, Samama M, Conard J, Brenner B, Eldor A, Seligsohn U. A single genetic origin for a common caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 1997;89:397-402
  202. Mann KG, Lawler CM, Vehar GA, Church WR. Coagulation Factor V contains copper ion. *J Biol Chem* 1984;259:12949-12951
  203. Krishnaswamy S, Church WR, Nesheim ME, Mann KG. Activation of human

- prothrombin by human prothrombinase. Influence of factor Va on the reaction mechanism. *J Biol Chem* 1987;262:3291-3299
204. Ortel TL, Quinn-Allen MA, Keller FG, Peterson JA, Larocca D, Kane WH. Localization of functionally important epitopes within the second C- type domain of coagulation factor V using recombinant chimeras. *J Biol Chem* 1994;269:15898-15905
205. Kalafatis M, Haley PE, Lu D, Bertina RM, Long GL, Mann KG. Proteolytic events that regulate factor V activity in whole plasma from normal and activated protein C (APC)-resistant individuals during clotting: an insight into the APC-resistance assay. *Blood* 1996;87:4695-4707
206. Heeb MJ, Kojima Y, Greengard JS, Griffin JH. Activated protein C resistance: Molecular mechanisms based on studies using purified Gln<sup>506</sup> – factor V. *Blood* 1995;85:3405-3411
207. Dahlbäck B. Bovine coagulation factor V visualized with electron microscopy. *J Biol Chem* 1986;261:9495-9501
208. Sun X, Evatt B, Griffin JH .Blood coagulation factor Va abnormality associated with resistance to activated protein C in venous thrombophilia. *Blood* 1994;83:3120-3125
209. Zöller B , Bengt , Dahlbäck B, Bjorn. Linkage between inherited resistance to activated protein C and factor V gene mutation in venous thrombosis. *Lancet* 1994;343:1536-1538
210. Thorelli E, Kaufman RJ, Dahlbäck B. Cleavage of factor V at Arg 506 by activated protein C and the expression of anticoagulant activity of factor V. *Blood* 1999;93:2552-2558
211. Hille ETM, Westendorp JP, Rosendaal FR. Mortality and causes of death in families with the factor V Leiden mutation (Resistance to activated protein C). *Blood* 1997;89:1963-1967
212. Greengard JS, Eichinger S, Griffin JH, Bauer KA. Variability of Thrombosis among Homozygous Siblings with Resistance to Activated Protein C Due to an Arg-to-Gln Mutation in the Gene for Factor V. *N Engl J Med* 1994;331:1559-1562
213. Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R. A novel mutation of

- Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998;91:1135-1139
214. Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306→Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood* 1998;91:1140-1144
215. Yılmaz E, Akar E, Sözüöz A, Akar N. Frequency of FV 1299 His-Arg (A4070G) in Turkish Cypriots. *Turk J Haematol* 2001;18:243-244
216. Berber E, Kavaklı K, Akar N, Berber E, Çağlayan SH. R506Q (FV Leiden) and R485K Mutations in the Factor V Gene: Incidence in Deep Venous Thrombosis and Hemophilia A Patients. *Turk J Haematol* 2003;20(4): 221-225
217. Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Lunghi B, Castaman G, Sacchi E, Mannucci PM. A Factor V Genetic Component Differing From Factor V R506Q Contributes to the Activated Protein C Resistance Phenotype. *Blood* 1997;90: 1552-1557
218. Faioni EM, Franchi F, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Finazzi G, Mannucci PM. Coinheritance of the HR2 Haplotype in the Factor V Gene Confers an Increased Risk of Venous Thromboembolism to Carriers of Factor V R506Q (Factor V Leiden). *Blood* 1999;94:3062-3066
219. Ulu A, Yılmaz E, Akar E, Akar N. Homozygosity for the HR2 Haplotype: Is It a Risk Factor for Thrombosis? *Turk J Haematol* 2003;20(4): 213-215
220. Kalafatis M, Bernardi F, Simioni P, Lunghi B, Girolami A, Mann KG. Phenotype and genotype expression in pseudohomozygous factor V Leiden. The need for phenotype analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:336-342
221. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Buil A, Martinez-Sánchez E, Mateo J, Borrel M, Stone WH, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J. A new locus on chromosome 18 that influences normal variation in activated protein C resistance phenotype and factor VIII activity and its relation to thrombosis susceptibility. *Blood* 2003;101:163-167
222. Kamphuisen PW, Rosendaal FR, Eikenboom JCJ, Bos R, Bertina RM. Factor V antigen levels and venous thrombosis. Risk profile, interactin with factor V

- Leiden, and relation with factor VIII antigen levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1382-1386
223. Male C, Mitchell L, Julian J, Vegh P, Joshua P, Adams M, David M, Andrew ME. Acquired activated protein C resistance is associated with lupus anticoagulant and thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 2001;97:844-849
224. Kalafatis M, Simioni P, Tormene D, Beck DO, Luni S, Girolami A. Isolation and characterization of an antifactor V antibody causing activated protein C resistance from a patient with severe thrombotic manifestations. *Blood* 2002;99:3985-3992
225. Bozzo M, Carpani G, Leo L, Marozzi S, Sacchi E, Moroni G, Pardi G. HELLP syndrome and factor V Leiden. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:55-58
226. Von Tempelhoff G-F, Heilmann L, Spanuth E, Kunzmann E, Hommel G. Incidence of the factor V Leiden mutation, coagulation inhibitor deficiency, and elevated antiphospholipid-antibodies in patients with preeclampsia or HELLP-syndrome. *Thromb Res* 2000;100:363-365
227. Krauss T, Augustin HG, Osmers R, Meden H, Unterhalt M, Kuhn W. Activated protein C resistance and factor V Leiden in patients with hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets syndrome. *Obstet Gynecol* 1998;92:457-460
228. Andersen BS, Olsen J. Oral contraception and factor V Leiden mutation in relation to localization of deep vein thrombosis. *Thromb Res* 1998;90:191-194
229. Heinemann LAJ, Kluft C, Spannagl M, Maat MPM. The association between extrinsic activated protein C resistance and venous thromboembolism in women. *Contraception* 2002;66:297-304
230. Curvers J, Nienhuis SJ, Nap AW, Hamulyak K, Evers JLH, Rosing J. Activated protein C resistance during in vitro fertilization treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:222-224
231. Many A, Schreiber L, Rosner S, Lessing JB, Eldor A, Kupferminc MJ. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy

- complications and thrombophilia. *Obstet Gynecol* 2001;98:1041-1044
232. Haim N, Lanir N, Hoffman R, Haim A, Tsalik M, Brenner B. Acquired activated protein C resistance is common in cancer patients and is associated with venous thromboembolism. *Am J Med* 2001;110:91-96
233. Leroy-Matheron C, Duvoux C, Van Nhieu JT, Leroy K, Cherqui D, Gouault-Heilmann M. Activated protein C resistance acquired through liver transplantation and associated with recurrent venous thrombosis. *J Hepatol* 2003;38:866-869
234. Hambleton J, Leung LL, Levi M. Coagulation: consultative hemostasis. *Hematology* 2002;335-352
235. Ko Y-L, Hsu T-S, Wu S-M, Ko Y-S, Chang C-J, Wang S-M, Chen WJ, Cheng NJ, Kuo C-T, Chiang C-W, Lee Y-S. The G1691A mutation of the coagulation factor V gene (factor V Leiden) is rare in Chinese: an analysis of 618 individuals. *Hum Genet* 1996;98:176-177
236. Lucotte G, Mercier G. Population genetics of factor V Leiden in Europe. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2001;27(2):362-367
237. Herrmann FH, Koesling M, Schröder W, Altman R, Bonilla RJ, Lopaciuk S, Perez-Requejo JL, Singh JR. Prevalence of Factor V Leiden Mutation in Various Populations. *Genet Epidemiol* 1997;14:403-411
238. Koeleman BPC, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood* 1994;84:1031-1035
239. De Visser MCH, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 1999;93:1271-1276
240. Leroyer C, Mercier B, Escoffre M, Fere C, Mottier D. Factor V Leiden prevalence in venous thromboembolism patients. *Chest* 1997;111:1603-1606
241. Lensen RPM, Rosendaal FR, Koster T, Allaart CF, de Ronde H, Vandenbroucke JP, Reitsma PH, Bertina RM. Apparent different thrombotic tendency in patients with factor V Leiden and protein C deficiency due to selection of patients. *Blood* 1996;88:4205-4208
242. Middeldrop S, Henkens CMA, Kopman MMW, van Pampus ECM, Hamulyak

- K, van der Meer J, Prins MH, Buller HR. The incidence of venous thromboembolism in family members of patients with factor V Leiden mutation and venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1998;128:15-20
243. Rodeghiero F, Tosetto A. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 1999;130:643-650
244. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Gari M, Martinez E, Mateo J, Stone WH, Blangero J, Fontcuberta J. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation* 2000;101:1546-1551
245. Kohlmeier RE, Cho CG, Bux RC, Guerra L, Rulon JJ, Selby DM, Gulley ML. Prothrombin Gene Mutation Uncommon in Pulmonary Embolism. *South Med J* 2000;93(11):1073-1077.
246. Bounameaux H. Factor V Leiden paradox: risk of deep vein thrombosis but not of pulmonary embolism. *Lancet* 2000;356:182-183
247. Van Cott EM, Soderberg BL, Laposata M. Activated protein C resistance, the factor V Leiden mutation, and a laboratory testing algorithm. *Arch Pathol Lab Med* 2001;126:577-582
248. De Bruijn SFTM, Stam J, Kopman MMW, Vandenbroucke JP. Case-control study of risk of cerebral sinus thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of hereditary prothrombotic conditions. *BMJ* 1998;316:589-592
249. Weih M, Vetter B, Ziemer S, Mehraein S, Valdueza JM, Koscielny J, Kulozik AE, Einhüpl KM. Increased Rate of factor V Leiden mutation in patients with cerebral venous thrombosis. *J Neurol* 1998;245:149-152
250. Wilder-Smith E, Kothbauer-Margreiter I, Lämmle B, Sturzenegger M, Ozdoba C, Hauser SP. Dural puncture and activated protein C resistance: risk factors for cerebral venous sinus thrombosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;63:351-356
251. Janssen HLA, Meinardi JR, Vleggaar FP, van Uum SHM, Haagsma EB, van der Meer FJ M, van Hattum J, Chamuleau RAFM, Adang RP, Vandenbroucke JP, van Hoek B, Rosendaal FR. Factor V Leiden mutation, prothrombin gene mutation, and deficiencies in coagulation inhibitors associated with Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: results of a case-control study.



- Blood. 2000;96:2364-2368
252. Gürgey A, Büyükpamukcu M, Baskut C, Yalcin B, Göğüş. Portal Vein Thrombosis in Association With Factor V Leiden Mutation in a Patient With Hepatocellular Carcinoma. *Med. Pediatr. Oncol.* 1997;29:224–225
  253. Tunç B: Budd-Chiari syndrome associated with heterozygous factor V Leiden mutation in a boy. *THOD* 2002; 12(2): 103-106
  254. Minnema MC, Janssen HLA, Niermeijer P, de Man RA. Budd-Chiari syndrome: combination of genetic defects and the use of oral contraceptives leading to hypercoagulability. *J Hepatol* 2000;33:509-512
  255. Delarive J, Gonvers J-J. Budd-Chiari syndrome related to factor V Leiden mutation. *Am J Gastroenterol* 1998;93:651-652
  256. Şimsek S, Verheesen RV, Haagsma EB, Lourens J. Subacute Budd-Chiari syndrome associated with polycythemia vera and factor V Leiden mutation. *Netherland J Med* 2000;57:62-67
  257. Toso GM, Palumbo KS, Uchman S: Budd-Chiari syndrome in a patient who is heterozygous for factor V Leiden. *AJG* 2001 September, Suppl., s251
  258. Larsson J, Sellman A, Bauer B. Activated protein C resistance in patients with central retinal vein occlusion. *Br J Ophthalmol* 1997;81:832-834
  259. Visaria DS, Davis JD. Pelvic vein thrombosis as a cause of acute pelvic pain. *Obstet Gynecol* 2002;99:897-899
  260. Mitsiev I, Reinhold S, Ziemer S, Neumayer H-H. Hocher B. Combination of APC resistance acquired protein S deficiency in a haemodialysis patient with recurrent A-V shunt thrombosis. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:2474-2477
  261. Newman RS, Spear GS, Kirschbaum N. Postmortem DNA diagnosis of factor V Leiden in a neonate with systemic thrombosis and probable antithrombin deficiency. *Obstet Gynecol* 1998;92:702-705
  262. Kenner L, Schwarzl F, Moshhammer H, Haas F, Hoefler G, Pierer G. Venous thrombosis in a replanted finger with underlying factor V Leiden mutation. *Br J Plastic Surg* 1998;51:57-58
  263. Raife TJ, Lentz SR, Atkinson BS, Vesely SK, Hessner MJ. Factor V Leiden: a genetic risk factor for thrombotic microangiopathy in patients with normal vonWillebrand factor–cleaving protease activity. *Blood* 2002;99:437-442

264. Shin DD, Godwin JE. Takayasu's Arteritis Associated With Factor V Leiden. *Am J Hematol* 1999;60:237-238
265. Espinosa G, Font J, Tassies D, Vidaller A, Deulofeu R, Lopez-Soto A, Cervera R, Ordinas A, Ingelmo M, Reverter J-C. Vascular involvement in Behçet's disease: Relation with thrombophilic factors, coagulation activation, and thrombomodulin. *Am J Med* 2002;112:37-43
266. Gül A, Özbek U, Öztürk C, İnanç M, Koniçe M, Özçelik T. Coagulation factor V gene mutation increase the risk of venous thrombosis in Behçet's disease. *Br J Rheumatol* 1996;35:1178-1180
267. Tursen Ü, Kaya Tİ, Eskandari G, Gündüz Ö, Yazar M, İkizoğlu G, Atik U. Association of factor V Leiden and prothrombin gene mutation with Behçet's disease. *Arch Dermatol Res* 2001;293:537-539
268. Zarrinanbour H, Keser G, Dönmez A, Çağırğan S, Oksel F, Aksu K, Tombuloğlu M. Activated protein C resistance in Behçet's disease. *Turk J Haematol* 2000;17:73-76
269. Verity DH, Vaughan RW, Madanat W, Kondeatis E, Zureikat H, Fayyad F, Kanawati CA, Ayesh I, Stanford MR, Wallace GR. Factor V Leiden mutation is associated with ocular involvement in Behçet disease. *Am J Ophthalmol* 1999;128:352-356
270. Guedon C, Le Cam-Duchez V, Lalaude O, Ménard JF, Lerebours E, Borg JY. Prothrombotic inherited abnormalities other than factor V Leiden mutation do not play a role in venous thrombosis in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1448-1454
271. Koutroubakis IE, Sfiridaki A, Mouzas IA, Maladaki A, Kapsoritakis A, Roussomoustakaki M, Kouroumalis EA, Manousos ON. Resistance to activated protein C and low levels of free protein S in Greek patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:190-194
272. Avcu F, Akar E, Demirkılıç U, Yılmaz E, Akar N, Yalçın A. The role of prothrombotic mutations in patients with Buerger's disease. *Thromb Res* 2000;100:143-147
273. Brodmann M, Renner W, Stark G, Winkler M, Pabst E, Hofmann C, Pilger E. Prothrombotic risk factors in patients with thrombangitis obliterans. *Thromb*

Res 2000;99:483-486

274. Van 't Veer C, Golden NJ, Kalafatis M, Simioni P, Bertina RM, Mann KG. An in vitro analysis of the combination of hemophilia A and factor V<sup>Leiden</sup>. *Blood* 1997;90:3067-3072
275. Nichols WC, Amano K, Cacheris PM, Figueiredo MS, Michaelides K, Schwaab R, Hoyer L, Kaufman RJ, Ginsburg D. Moderation of hemophilia A phenotype by the factor V R506Q mutation. *Blood* 1996;88:1183-1187
276. Ruggeri M, Gisslinger H, Tosetto A, Rintelen C, Mannhalter C, Pabinger I, Heis N, Castaman G, Missiaglia E, Lechner K, Rodeghiero F. Factor V Leiden mutation carriership and venous thromboembolism in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol* 2002;71:1-6
277. Günay A, Öztürk A, Budak T, Özbek U, Üskent N. Activated protein C resistance in polycythemia vera. *Turk J Haematol* 2001;18:157-164
278. Greer IA. Thrombosis in pregnancy: maternal and fetal issues. *Lancet* 1999;353:1258-1265
279. Sarig G, Younis JS, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril* 2002;77:342-347
280. Bloemenkamp KWM, de Groot CJM, De Ronde H, Duvekot EJ, Helmerhorst FM, Bertina RM. The effect of factor V Leiden, oral contraceptive use, type of oral contraceptives and pregnancy on APC-r levels in women with or without a history of pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:225
281. Greer IA. Thrombophilia: implications for pregnancy outcome. *Thromb Res* 2003;109:73-81
282. Clark P, Walker ID, Greer I. Acquired activated protein-C resistance in pregnancy and association with increased thrombin generation and fetal weight. *Lancet* 1999;353:292-293
283. Alfirovic Z, Mousa HA, Martlew V, Briscoe L, Perez-Casal M, Toh CH. Postnatal screening for thrombophilia in women with severe pregnancy complications. *Obstet Gynecol* 2001;97:753-759
284. Alfirovic Z, Roberts D, Martlew V. How strong is the association between

- maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;101:6-14
285. Ridker PM, Miletich JP, Buring JE, Ariyo AA, Price DT, Manson JE, Hill JA. Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. *Ann Intern Med* 1998;128:1000-1003
286. Kutteh WH, Park VM, Deitcher SR. Hypercoagulable state mutation analysis in white patients with early first-trimester recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 1999;71(6):1048-1053
287. Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil Steril* 1999;72:765-774
288. Wramsby ML, Sten-Linder M, Bremme K. Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. *Fertil Steril* 2000;74:987-991
289. Finan RR, Tamim H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Prevalence of Factor V G1691A (Factor V-Leiden) and Prothrombin G20210A Gene Mutations in a Recurrent Miscarriage Population. *Am J Hematol* 2002;71:300-305
290. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T, Zournatzi V, Makris PE, Bontis J, Kotsis A. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Human Reprod* 2000;15:548-462
291. Many A, Elad R, Yaron Y, Eldor A, Lessing JB, Kupfermanc MJ. Third-trimester unexplained intrauterine fetal death is associated with inherited thrombophilia. *Obstet Gynecol* 2002;99:684-7
292. Glueck CJ, Kupfermanc MJ, Fontaine RN, Wang P, Weksler BB, Eldor A. Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies. *Obstet Gynecol* 2001;97:44-48
293. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 2003;361:901-08
294. Kupfermanc MJ, Many A, Bar-Am A, Lessing JB, Archer-Landsberg J. Mid-trimester severe intrauterine growth restriction is associated with a high

- prevalence of thrombophilia. *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109:1373-1376
295. Verspyck E, Le Cam-Duchez V, Goffinet F, Tron F, Marpeau L, Borg JY. *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109:28-33
296. Lindqvist PG, Gudmundsson S. Maternal carriership of factor V Leiden associated with pathological uterine artery doppler measurements during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 2001;108:1103-1105
297. Kahn SR. Severe preeclampsia associated with coinheritance of factor V Leiden mutation and protein S deficiency. *Obstet Gynecol* 1998;91:812-814
298. DJ, Steyn PS, MANSVELT EPG. Factor V Leiden mutation and the risk of thrombo-embolic disease in pregnancy: a case report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;91:197-198
299. Ament L. Factor V Leiden and Contraception. *J Midwifery Womens Health* 2004;49(1):51-52
300. Currie L, Peek M, McNiven M, Prosser I, Mansour J, Ridgway J. Is there an increased maternal-infant prevalence of factor V Leiden in association with severe pre-eclampsia? *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109:191-196
301. Clark P, Twaddle S, Walker ID, Scott L, Greer IA. Cost-effectiveness of screening for the factor V Leiden mutation pregnant women. *Lancet* 2002;359:1919-20
302. Lindqvist PG, Olofsson P, Dahlbäck B. Use of selective factor V Leiden screening in pregnancy to identify candidates for anticoagulants. *Obstet Gynecol* 2002;100:332-336
303. Inbal A, Freimark D, Modan B, Chetrit A, Matetzky S, Rosenberg N, Dardik R, Baron Z, Seligsohn U. Synergistic effects of prothrombotic polymorphisms and atherogenic factors on the risk of myocardial infarction in young males. *Blood* 1999;93:2186-2190
304. Kiechl S, Muigg A, Santer P, Mitterer M, Egger G, Oberhollenzer M, Oberhollenzer F, Mayr A, Gasperi A, Poewe W, Willeit J. Poor response to activated protein C as a prominent risk predictor of advanced atherosclerosis and arterial disease. *Circulation* 1999;99:614-619
305. Van de Water NS, French JK, Lund M, Hyde TA, White HD, Browett PJ. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin variant G20210A in patients

age <50 years with no significant stenoses at angiography three to four weeks after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:717-22

306. Baranovskaya S, Kudinov S, Fomicheva E, Vasina V, Solovieva D, Khavinson V, Schwartz E. Age as a Risk factor for Myocardial Infarction in Leiden Mutation Carriers. *Molecular Genetics And Metabolism* 1998;63:155–157
307. Redondo M, Watzke HH, Stucki B, Sulzer I, Demarmels Biasiutti F, Binder BR, Furlan M, Lämmle B, Wuillemin WA. Coagulation Factors II, V, VII, and X, Prothrombin Gene 20210G3A Transition, and Factor V Leiden in Coronary Artery Disease. High Factor V Clotting Activity Is an Independent Risk Factor for Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1020-1025
308. Garg UC, Arnett DK, Evans G, Eckfeldt JH. No association between factor V Leiden mutation and coronary heart disease or carotid intima media thickness: the NHLBI family heart study. *Thromb Res* 1998;89:289-293
309. Juul K, Tybjærg-Hansen A, Steffensen R, Kofoed S, Jensen G, Nordestgaard BG. Factor V Leiden: the copenhagen city heart study and 2 meta-analyses. *Blood* 2002;100:3-10
310. Dunn ST, Roberts CR, Schechter E, Moore WE, Lee ET, Eichner JE. Role of factor V Leiden mutation in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Thromb Res* 1998;91:91-99
311. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner KL, 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;332:912-917
312. Feinberg WM, Pearce LA, Hart RG, Cushman M, Cornelli ES, Lip GYH, Bovill EG. Markers of thrombin and platelet activity in patients with atrial fibrillation. *Stroke* 1999;30:2547-2553
313. 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;176:122-125
314. Sampram ESK, Lindblad B. The impact of factor V mutation on the risk for

- occlusion in patients undergoing peripheral vascular reconstructions. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;22:134-138
315. Foley PWX, Irvine CD, Standent GR, Morset C, Smith FT, McGrath C, Baird RN, Lamont PM. Activated protein C resistance, factor V Leiden and peripheral vascular disease. *Cardiovascular Surgery* 1997;5:157-160
  316. Bushnell CD, Goldstein LB. Diagnostic testing for coagulopathies in patients with ischemic stroke. *Stroke* 2000;31:3067-3078
  317. Chaturvedi S, Dzieczkowski J. Multiple hemostatic abnormalities in young adults with activated protein C resistance and cerebral ischemia. *J Neurol Sci* 1998;159:209-212
  318. Longstreth WT, Rosendaal FR, Siscovick DS, Vos HL, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: Factor V Leiden and prothrombin gene variant(G20210A). *Stroke* 1998;29:577-580
  319. Margaglione M, D'Andrea G, Giuliani N, Brancaccio V, De Lucia D, Grandone E, De Stefano V, Tonali PA, Di Minno G. Inherited Prothrombotic Conditions and Premature Ischemic Stroke. Sex Difference in the Association With Factor V Leiden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1751-1756
  320. Fisher M, Fernandez JA, Ameriso SF, Xie D, Gruber A, Paganini-Hill A, Griffin JH. Activated protein C resistance in ischemic stroke not due to factor V Arginine<sup>506</sup> Glutamine mutation. *Stroke* 1996;27:1163-1166
  321. Chaturvedi S, Joshi N, Dzieczkowski J. Activated protein C resistance young American patients with ischemic stroke. *J Neurol Sci* 1999;163:137-139
  322. Haan J, Kappelle LJ, de Ronde H, Ferrari MD, Bertina RM. The factor V Leiden mutation (R506Q) is not a major risk for migrainous cerebral infarction. *Cephalalgia* 1997;17:605-607
  323. Dori D, Beiran I, Gelfand Y, Lanir N, Scharf J, Miller B, Brenner B. Multiple retinal arteriolar occlusions associated with coexisting primary antiphospholipid syndrome and factor V Leiden mutation. *Am J Ophthalmol* 2000;129:106-108
  324. Larsson J. Central retinal artery occlusion in a patient homozygous for factor V Leiden. *Am J Ophthalmol* 2000;129:816-817

325. Ng T, Brown JRI, Edmonson RA, Tillyer ML. Catastrophic arterial thromboembolism associated with factor V Leiden. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19:551-553
326. Verdu A, Cazorla MR, Granados MA, Alonso JA, Casado LF. Basilar artery thrombosis in a child heterozygous for factor V Leiden mutation. *Pediatr Neurol* 2001;24:69-71
327. Verdu A, Cazorla MR, Granados MA, Alonso JA, Casado LF. Basilar artery thrombosis in a child heterozygous for factor V Leiden mutation. *Pediatr Neurol* 2001;24:69-71
328. Eller AW, Bontempo FA, Faruki H, Hassett AC. Peripheral retinal neovascularization (Eales disease) associated with the factor V Leiden mutation. *Am J Ophthalmol* 1998;126:146-149
329. Srinivasan S, Fern A, Watson WH, McColl MD. Reversal of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy associated with coexisting primary antiphospholipid syndrome and factor V Leiden mutation. *Am J Ophthalmol* 2001;131:671-673
330. Cardon C, Diemont F, Julia P, Chemla E, Fabiani JN. Bilateral carotid dissection and factor V mutation: a second case. *Ann Vasc Surg* 2000;14:503-506
331. Gandrille S, Greengard JS, Alhenc-Gelas M, Juhan-Vague I, Abgrall JF, Jude B, Griffin JH, Aiach M. Incidence of Activated Protein C Resistance Caused by the ARG 506 GLN Mutation in Factor V in 113 Unrelated Symptomatic Protein C-Deficient Patients. *Blood* 1995;86:219-224
332. Giri TK, Yamazaki T, Sala N, Dahlbäck B, de Frutos PG. Deficient APC-cofactor activity of protein S Heerlen in degradation of factor Va Leiden: a possible mechanism of synergism between thrombophilic risk factors. *Blood* 2000;96:523-531
333. Beauchamp NJ, Daly ME, Cooper PC, Makris M, Preston FE, Peake IR. Molecular Basis of Protein S Deficiency in Three Families Also Showing Independent Inheritance of Factor V Leiden. *Blood* 1996;88:1700-1707
334. Kayıran SM, Ataç B, Verdi H, Özbek N. Faktör V Leiden ve protrombin G20210A mutasyonlarını birlikte taşıyan bir hastada ağır purpura fulminans.



- Turk J Haematol 2002;19(suppl):106, P90
335. Liu X-Y, Gabig TG, Bang NU. Combined Heterozygosity of Factor V Leiden and the G20210A Prothrombin Gene Mutation in a Patient With Cerebral Cortical Vein Thrombosis. *Am J Hematol* 2000; 64:226–228
  336. Lopez FF, Sweeney JD, Blair AJ, Sikov WM. Spontaneous Venous Thrombosis in a Young Patient With Combined Factor V Leiden and Lupus Anticoagulant. *Am J Hematol* 1999;62:58–60
  337. Endrikat J, Noah M, Gerlinger C, Bannemerschult R, Junge W, Ruebig A, Schmidt W, Düsterberg B. Impact of oral contraceptive use on APC-resistance: a prospective, randomized clinical trial with three low-dose preparations. *Contraception* 2001;64:217-222
  338. Glueck CJ, Wang P, Fontaine RN, Tracy T, Sieve-Smith L, Lang JE. Effect of exogenous estrogen on atherothrombotic vascular disease risk related to the presence or absence of the factor V Leiden mutation (Resistance to activated protein C). *Am J Cardiol* 1999;84:549-554
  339. Van 't Veer C, Kalafatis M, Bertina RM, Simioni P, Mann KG. Increased tissue factor-initiated prothrombin activation as a result of the Arg<sup>506</sup>→Gln mutation in factor V<sup>Leiden</sup>. *J Biol Chem* 1997;272:20721-20729
  340. Morange PE, Henry M, Tregouet D, Granel B, Aillaud MF, Alessi MC, Juhan-Vague I. The A 2844G Polymorphism in the PAI-1 Gene Is Associated With a Higher Risk of Venous Thrombosis in Factor V Leiden Carriers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1387-1391
  341. Genoud V, Castanon M, Annichino-Bizzacchi J, Korin J, Kordich L. Prevalence of three protrombotic polymorphisms: Factor V G1691A, Factor II G20210A, Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C 677T in Argentina. *Thromb Res* 2000;100:127-131
  342. Gurgey A, Haznedaroglu IC, Egesel T, Buyukasik Y, Ozcebe OI, Sayinalp N, Dundar SV, Bayraktar Y.: Two common genetic thrombotic risk factors: factor V Leiden and prothrombin G20210A in adult Turkish patients with thrombosis. *Am J Hematol.* 2001;67:107-11.
  343. Castaman G, Ruggeri M, Tosetto A, Rodeghiero F. Low Risk of Venous Thrombosis in Two Families With Combined Type I Plasminogen Deficiency

- and Factor V R506Q Mutation. *Am J Hematol* 1998;57:344–347
344. Mann DE, Kessel ER, Mullins DL, Lottenberg R. Ischemic colitis and acquired resistance to activated protein C in a woman using oral contraceptives. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1960-1962
345. Mannucci PM. Venous thromboembolism and hormone replacement therapy. *Eur J Intern Med* 2001;12:478-483
346. Rosendaal FR, Vessey M, Rumley A, Daly E, Woodward M, Helmerhorst FM, Lowe GDO. Hormonal replacement therapy, prothrombotic mutations and the risk of venous thrombosis. *Br J Haematol* 2002;116:851-854
347. Weitz IC, Israel VK, Liebman HA. Tamoxifen-Associated Venous Thrombosis and Activated Protein C Resistance Due to Factor V Leiden. *Cancer* 1997;79:2024–2027
348. Palareti G, Legnani C, Frascaro M, Flamigni C, Gammi L, Gola G, Fuschini G, coccheri S. Screening for activated protein C resistance before oral contraceptive treatment : a pilot study. *Contraception* 1999;59:293-299
349. Dulitzky M, Cohen SB, Inbal A, Seidman DS, Soriano D, Lidor A, Mashiach S, Rabinovici J. Increased prevalence of thrombophilia among women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2002;77:463-467
350. Ellis MH, Nun IB, Rathaus V, Werner M, Shenkman L. Internal jugular vein thrombosis in patients with ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1998;69:140-142
351. Tsanadis G, Vartholomatos G, Korkontzelos I, Avgoustatos F, kakosimos G, Sotiriadis A, Tatsioni A, Eleftheriou A, Lolis D. Polycytic ovarian syndrome and thrombophilia. *Human Reprod* 2002;17:314-319
352. Ağdaş Ş, Türken O, Öztürk A, Küçükardalı Y, Kandemir EG, Yaylacı M. Solid tümörlü hastalarda hiperkoagülabilité, doğal antikoagülan düzeyleri ve APC. *Turk J Haematol* 2002;19(suppl):102, P78
353. Tiftik N, Polat G, Yazar A, Pata C, Akbay E, Ulu O, Sezer K, Altıntaş E, Kıyıkım A, Konca K, Atik U. Diabetes mellitus edinsel APC dierncine yolaçar mı?. *Turk J Haematol* 2002;19(suppl):100, P72
354. Küçükkaya R. Trombofilide tanı yöntemleri. XXVII Ulusal Hematoloji Kongresi IV. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, 11-13 Kasım 1999, İstanbul,

sayfa 27-34

355. Akman N, Aktuđlu G, Demir M, Kūçūkkaya R, Haznedarođlu İ, Özcan M. Trombozlu olgularda etyolojiye yönelik testlerin incelenmesi. XXVII Ulusal Hematoloji Kongresi IV. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, 11-13 Kasım 1999, İstanbul, sayfa 90-98
356. Beyan C. Venöz tromboembolizm: Etyolojiyi nasıl aamalıyız? XXIX. Ulusal Hematoloji Kongresi, II. Hematoloji ilk basamak kursu. 25 Ekim 2002, Kemer-Antalya, sayfa 21-29
357. Segel GB, Francis CW. Anticoagulant proteins in childhood venous and arterial thrombosis: a review. Blood Cells, Molecules and Disease 2000;26:540-560
358. Preda L, Erba N, Figini S, Carniti GC, Rossi E. An improved test to identify APC resistant factor V Leiden. Thromb Res 1997;86:461-468
359. Heinemann LAJ, Assmann A, Spannagl M, Schramm W, Dick A, Klufft C, Maat MPM. Normalized activated protein C ratio itself not association with increased risk of venous thromboembolism. Contraception 1998;58:321-322
360. Ronde H, Bertina RM. Laboratory diagnosis of APC-resistance: a critical evaluation of the test and the development of diagnostic criteria. Thromb Haemost 1994;72:880-886
361. Bolaman Z. Aktive Protein C direnci. XXIX. Ulusal Hematoloji Kongresi Mezuniyet sonrası eğitim kursu 26 Ekim 2002 Kemer, Antalya, sayfa:59-67
362. Gouault-Heilmann M, Leroy-Matheron C. Evaluation of a new chrometric assay for factor V Leiden-dependent APC resistance. Thromb Res 1997;85:357-362
363. Quehenberger P, Handler S, Mannhalter C, Kyrle PA, Speiser W. The factor V (Leiden) test: evaluation of an assay based on dilute russell viper venom time for the detection of the factor V Leiden mutation. Thromb Res 1999;96:125-133
364. Quehenberger P, Handler S, Mannhalter C, Pabinger-Fasching I, Speiser W. Evaluation of a highly spesific functional test for the detection of factor V Leiden. Int J Clin Lab Res 2000;30:113-117
365. Aksu S, Koçođlu H, Sayınalp N, Büyūkaşık Y, Göker H, Haznedarođlu İC,

- Özcebe Oİ, Dündar SV, Kirazlı Ş, Gürgey A. Pıhtılaşma esasına dayanan APC-R ölçümünün moleküler biyolojik testlerle karşılaştırılması. *Turk J Haematol* 2002;19(suppl):109, P96
366. Russeva MG, Janakiev PJ, Kirov SA, Paskaleva ID, Kremensky IM, Penner JA, Hassouna HS, Ganev VS. A simple method for detection of factor V R506Q (Leiden) mutation in dried blood spots. *Clinica Chimica Acta* 1999;284:89-92
367. Lengyel T, Sasvari-Szekely M, Guttman A. High-throughput genotyping of factor V Leiden mutation by ultrathin-layer agarose gel electrophoresis. *J Chromatography* 1999; 853:519-525
368. Lutz CT, Foster PA, Noll WW, Voelkerding KV, Press RD, McGlennen RC, Kirschbaum NE. Multicenter evaluation of PCR methods for the detection factor V Leiden (R506Q) genotypes. *Clin Chem* 1998;44:1356-1358
369. Hézard N, Cornillet P, Droullé C, Gillot L, Porton G, Nguyen P. Factor V Leiden: detection in whole blood by ASA PCR using an additional mismatch in antepenultimate position. *Thromb Res* 1997;88:59-66
370. Ørum H, Jakobsen MH, Koch T, Vuust J, Borre MB. Detection of the factor V Leiden mutation by direct allele-specific hybridization of PCR amplicons to photoimmobilized locked nucleic acids. *Clin Chem* 1999;45:1898-1905
371. Patrushev LI, Zykova ES, Kayushin AL, Korosteleva MD, Miroshnikov AI, Bokarew IN, Leont'ev SG, Koshkin VM, Severin ES. New DNA diagnostic system for detection factor V Leiden. *Thromb Res* 1998;92:251-259
372. Zehnder J, Atta RV, Jones C, Sussman H, Wood M. Cross-linking hybridization assay for direct detection of factor V Leiden mutation. *Clin Chem* 1997;43:1703-1708
373. Klingler KR, Junold T, Wielckens K. Activated protein C resistance: automated detection of the factor V Leiden mutation by mismatch hybridization. *Clin Chem* 1999;45:1925-1931
374. Von Ahsen N, Oellerich M, Schütz E. A method for homogeneous color-compensated genotyping of factor V (G1691A) and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) mutations using real-time multiplex fluorescence PCR. *Clin Biochem* 2000;33:535-539

375. Benson JM, Ellingsen D, Renshaw MA, Resler AG, Evatt BL, Hooper WC. Multiplex analysis of mutations in four genes using fluorescence scanning technology. *Thromb Res* 1999;96:57-64
376. Raoul M, Mathonnet F, Peltier J-Y, Collet C, Boucly C, Van Amerongen G, Mathieu B, Jaouen E, de Mazancourt P. An improved method for the detection of the G20210A transition in the prothrombin gene. *1997;88:441-443*
377. Murphy KM, Eshleman JR. Simultaneous Sequencing of Multiple Polymerase Chain Reaction Products and Combined Polymerase Chain Reaction with Cycle Sequencing in Single Reactions. *Am J Pathol* 2002, 161:27-33
378. Bowen DJ, Granville S, Bowley S, Wood N, Bidwell J. Genetic diagnosis of factor V Leiden using heteroduplex technology. *Thromb Haemost* 1997;77:119-22
379. Sevall JS. Factor V Leiden genotyping using real-time fluorescent polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 2000;14:249-253
380. Erali M, Schmidt B, Lyon E, Wittwer C. Evaluation of electronic microarrays for genotyping factor V, factor II and MTHFR. *Clin Chem* 2003;49:732-739
381. Crockett AO, Wittwer CT. Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time PCR: Using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Anal Biochem* 2001;290:89-97
382. Nauck M, März W, Wieland H. Evaluation of the Roche diagnostic LightCycler-factor V Leiden mutation detection kit and the LightCycler-prothrombin mutation detection kit. *Clin Biochem* 2000;33:213-216
383. Lay MJ, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem* 1997;43:2262-2267
384. Van den Bergh FAJTM, van Oeveren-Dybicz AM, Bon MAM. Rapid single-tube genotyping of the factor V Leiden and prothrombin mutation by real-time PCR using dual-color detection. *Clin Chem* 2000;46:1191-1195
385. Evans JG, Lee-Tataseo C. Determination of the factor V Leiden single-nucleotide polymorphism in a commercial clinic laboratory by use of nanochip microelectronic array technology. *Clin Chem* 2002;48:1406-1411
386. Hessner MJ, Budish MA, Friedman KD. Genotyping of factor V G1691A

- (Leiden) without the use of PCR by invasive cleavage of oligonucleotide probes. Clin Chem 2000;46:1051-1056
387. Tsongalis GJ, Rainey B-J, Hodges KA. A novel technology used in the interrogation of nucleic acid sequences for single-nucleotide polymorphisms. Experimental and Molecular Pathology 2001;71: 222-225
388. Bauer KA: Hypercoagulability-anew cofactor in the protein C anticoagulant pathway. New Eng J Med 1994;330:566-567
389. Bilenoğlu O., Molecular analysis of  $\beta$ -thalassemia and hemoglobins by the  $\beta$  globin strip assay: A novel diagnostic approach, Yüksek lisans tezi, Boğaziçi Üniversitesi (1996)
390. Başak A N: Moleküler Tanı Yöntemleri: Hemoglobinopati ve talasemi önlem-tanı-tedavi Arcasoy A, Canatan D, Köse M F, Üstündağ M (ed) İkinci baskı, Antalya, Siyah Grafik Matbaacılık, Nisan 2003, 47-59
391. Hepner M, Roldan A, PieroniG, Frontroth JP, Serviddi RM, Torres AF, Sciuccati G, Bonduel M. Factor V Leiden mutation in the Argentinian population. Thromb Haematol 1999;81:989
392. Rees DC :The Population Genetics of Factor V Leiden (Arg 506 Gln). Br J Hematol 1996; 95:579-586
393. Gregg JP, Yamane AJ, Grody WW. Prevalence of the Factor V-Leiden Mutation in Four Distinct American Ethnic Populations. Am J Med Genet 1997;73:334-336
394. Angchaisuksiri P, Pingsuthiwong S, Aryuchai K, Busabaratana M, Sura T, Atichartakarn V, Sritara P. 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; 65:119-122
395. Irani-Hakime N, Tamim H, Kreidy R, Almawi WY. The Prevalence of Factor V R506Q Mutation-Leiden Among Apparently Healthy Lebanese. Am J Hematol 2000; 65:45-49
396. Hira B, Pegoraro RJ, Rom L, Govender T, Moodley J. Polymorphisms in various coagulation genes in black South African women with placental abruption. Br J Obstet Gynaecol 2002;109: 574-575
397. Avcu F: Genç Trombozlu Olgularda Faktör V Leiden'in Araştırılması.

Hematoloji Uzmanlık Tezi, Ankara 1997

398. Demir M: Genç Trombozlu Hastalarda Aktive Protein C Direnci Ve Doğal İnhibitörler. Hematoloji Uzmanlık Tezi, Edirne 1997
399. Vurkun M, Vural Ö, Demir M, Turgut B, Gürgey A, Parlak H, Duran N. The prevalence of activated protein C resistance and F V Leiden in healthy population of Edirne, Turkey. Turk J Haematol 2002;19(2):287-291



## EK-1 : FV LEİDENİN DÜNYA ÜZERİNDEKİ DAĞILIMI

Ülke-Bölge	Orijin	N	Heterozigot		Homozigot		% Prevalans
			N	%	N	%	
AVRUPA ALMANYA	Kuzeydoğu	814	56	6.9	1	7.0	Schröder ve ark.
		196	8	4.3		4.3	März ve ark.
		117	10	8.5		8.5	Aschka ve ark.
HOLLANDA	Bavyera	222	14	6.3		6.3	Heinrich ve ark.
		49	2	4.0		4.0	Rees ve ark.
		474	14	4.7		2.9	Rosendaal ve ark.
301	14	4.7		4.7	Rosendaal ve ark.		
İZLANDA		96	3	3.1	1	4.1	Rees ve ark.
FINLANDIYA		303	12	4.0	1	0.3	Hakala ve ark.
		148				6.0	Syrjälä ve ark.
FRANSA Toulouse Lille Strasbourg Normandiya		104	1	0.9		0.9	Gandrille ve ark.
		207	6	2.9		2.9	Emmerich ve ark.
		148	1	0.7		0.7	Emmerich ve ark.
		193	16	8.2	1	0.5	Emmerich ve ark.
300					2.7	Querrec ve ark.	
YUNANİSTAN		187	24		1	0.5	Rees ve ark.
POLONYA		200	10	5.0		5.0	
PORTEKİZ	Kafkas Afrika/Angola Afrika/St. Thome	203	0			1.6	Ferrer-antunes ve ark.
		46	0			0	Ferrer-antunes ve ark.
		62	0			0	Ferrer-antunes ve ark.
İTALYA Genova		80	6	7.5		7.5	Caprino ve ark.
		49	0			0	Rees ve ark.
Vicenza		4703	124	2.6	4	0.09	Tosetto ve ark.
İSVEÇ	Gibney					15	Dahlback ve ark.
Greenland	Inuits	133	0			0	De Maat ve ark.



Ülke-Bölge	Orijin	N	Heterozigot		Homozigot		% Prevalans	
			N	%	N	%		
<b>AVRUPA</b> İNGİLTERE Londra		208	13	6.3			6.3	Catto ve ark.
		39	1	2.6			2.6	Catto ve ark.
		247	14	5.6			5.6	Catto ve ark.
		144					3.5	Beauchamp ve ark.
		237	21	8.8			8.8	Rees ve ark.
		178	10	5.6			5.6	Emmerich ve ark.
	Belfast							
<b>AMERİKA</b>								
ARJANTİN		215	10	4.65	1	0.47	5.1	
KANADA		229	13	5.7			5.7	Lee ve ark.
Vancouver adası	Hintliler	36	0				0	Rees ve ark.
PERU	Hintliler	19	0				0	Rees ve ark.
COSTA RİCA		196	4	2.0			2.0	
BREZİLYA	Hindli/Amazon	83	83	0			0	Arruda ve ark.
	Afrikan	137	1				0.7	Arruda ve ark.
	Hindli	118		0			0	Bandinelli ve ark.
	Afrikan	148		0			0	Bandinelli ve ark.
	Kafkas	96					2	Bandinelli ve ark.
JAMAİKA		91	0				0	Rees ve ark.
A.B.D.	Kafkas	130					1.6	Pottinger ve ark.
	Afrikan/Amerikan	214	3	1.4			1.4	Pottinger ve ark.
	Afrikan/Amerikan	93	1	1.1			1.1	Dilley ve ark.
	Erkek kafkas	704	42	6.0			6.0	Ridker ve ark.
Venezuela		126	2	1.6			1.6	

Ülke-Bölge	Orjin	N	Heterozigot		Homozigot		
			N	%	N	%	% Prevalans
<b>AVUSTRALYA</b>							
Perth		126	5	4			4 Boeckmeer ve ark.
	Aborjinler	73	0				0 Rees ve ark.
Papua Yeni Gine		95	0				0 Rees ve ark.
<b>ASYA</b>							
<b>HINDİSTAN</b>							
Pencap		150	2	1.3			1.3 Rees ve ark.
Pencap		36	0				0 Rees ve ark.
Sikh		29	1				3.4 Rees ve ark.
<b>GUJARATI</b>		32	1				3.2 Rees ve ark.
<b>SRI LANKA</b>		47	0				0 Rees ve ark.
<b>PAKİSTAN</b>		36	0				0 Rees ve ark.
<b>JAPONYA</b>		192	0				0 Takamiya ve ark.
		270	0				0 Kodaira ve ark.
<b>ÇİN</b>		113	0				0 Kodaira ve ark.
<b>KORE</b>		93	0				0 Kodaira ve ark.
<b>ENDONEZYA</b>	Sumatra	105	0				0 Rees ve ark.
<b>TAYVAN</b>	Aborjinler	83	0				0 Rees ve ark.
<b>MOĞOLİSTAN</b>		36	0				0 Rees ve ark.
<b>HONG KONG</b>	Çinli	45	0				0 Lee CK ve ark.
	Çinli	48	0				0 Rees ve ark.
<b>SUUDI ARABİSTAN</b>		55	0				2.5 Rees ve ark.
		200	5				
<b>AFRİKA</b>							
<b>KENYA LUO</b>		60	0				0 Rees ve ark.
<b>ZAMBİA</b>		95	0				0 Rees ve ark.
<b>SENEGAL</b>		96	0				0 Rees ve ark.
	<b>Heterozigot</b>				<b>Homozigot</b>		

Ülke-Bölge	Orijin	N		% Prevalans		
		N	%	N	%	
<b>TÜRKİYE</b>						
DENİZLİ		1030	76	11	8.4	Bizim Çalışmamız
ANKARA		99	12		12.1	Akar ve ark.
ANKARA		55	2		3.6	Ayçu ve ark.
İSTANBUL		120	11	2	9.16	Özbek ve ark.
EDİRNE		467	18		4.28	Vurkun ve ark.
EDİRNE		49	1		2.04	Demir ve ark.
MERSİN		95	5		5.2	Tursen ve ark.

## EK-II

Adı-Soyadı:..... Yaş :..... Cinsiyet :.....  
Telefon (ev).....(İş).....(Cep).....  
Adres:.....

### Sizden alınacak olan bu kan örneklerinde:

Ülkemizde kendini sağlıklı bilen her 100 kişiden 5 ila 10 ' unda görülen **Faktör 5 Leiden** Hastalığı araştırılacaktır. Bu hastalık; ailesel ( irsi ) olarak geçen, genlerimizde oluşan bir bozukluk nedeniyle ortaya çıkan bir hastalıktır.

Hastalık görülen kişilerin kanlarında kolay pıhtılaşma nedeniyle "Kalp Krizi", "Felç", "Bacak Damarlarında Pıhtı Oluşumu" ve "Akciğerlere Pıhtı Atmasıyla Nefes Darlığı" gibi ciddi hastalıklarla karşılaşma riski 5 ila 80 kat daha fazladır. Ayrıca doğum kontrol hapı kullanırken oluşan damar tıkanıklığının ve tekrarlayan düşük veya ölü doğumların önemli bir kısmından da bu hastalık sorumlu tutulmaktadır. Mesela; felç geçirenlerin %10-20'sinde, akciğerlere pıhtı atan hastaların %5-10'unda, kalp krizi geçirenlerin %2'sinde sebebin Faktör 5 Leiden Hastalığı olduğu görülmüştür. Böyle önemli bir hastalığın erken tespiti halinde tedavisi oldukça kolaydır.

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi tarafından ücretsiz olarak yapılacak, herhangi bir problem tespit edildiği takdirde yukarıya yazacağınız adres ve telefon bilgilerinizden size ulaşılarak gerekli bilgiler verilecektir. Bu nedenle aşağıda yer alan formda gerekli yerleri doldurmanız, ücretsiz olarak yapılacak bu araştırmayı kabul ettiğinize dair imza vermeniz gerekmektedir. Ayrıca hastalık hakkında daha kolay tanımlama yapabilmemiz için aşağıda yer alan soruları da titizlikle cevaplamanızı rica ederiz.

Unutmayın ki; şimdi bize ayıracağınız birkaç dakika, kolay bir tedavi ile önüne geçilebilen bir hastalığın tespitini sağlayacak ve böylece yaşamınızın bundan sonraki döneminde üzücü damar pıhtılaşmalarıyla karşılaşma riskinizi azaltacaksınız.

Bu araştırmanın yapılmasını kabul ediyorum.

İmza:

**Aşağıdaki hastalıklardan herhangi birini geçirdiyseniz karşısına işaretleyiniz:**

Bacaklarınızda toplar damarlarda tıkanma oldu mu? (varis hariç)	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır
Akciğerlerinize pıhtı atması nedeniyle hastanede yattınız mı?	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır
Beyin damarlarına pıhtı atması nedeniyle hastanede yattınız mı? (felç)	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır
Kalp damarlarınızda tıkanıklık olduğu söylendi mi?(Kalp krizi geçirdiniz mi?)	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır
Pıhtılaşmayı önlemek amacıyla kan sulandırıcı bir ilaç kullanıyor musunuz?	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır
Bilddiğiniz başka bir hastalığınız varsa belirtiniz:		
Kan sulandırıcı bir ilaç kullanıyorsanız hangisini kullanıyorsunuz? <input type="checkbox"/> Aspirin <input type="checkbox"/> Coraspin <input type="checkbox"/> Coumadin		

**Akrabalarınız (anne, baba, kardeş, amca, hala, teyze, dayı, anneanne, babaanne, dede) aşağıdaki hastalıklardan herhangi birini geçirdiyse karşısına işaretleyiniz:**

	Eğer varsa kimde var?		
Bacaklarında toplar damarlarda tıkanma olan var mı? (varis hariç)	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Akciğerlerine pıhtı atması nedeniyle hastanede yatan oldu mu?	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Beyin damarlarına pıhtı atması nedeniyle hastanede yatan oldu mu? (felç)	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Kalp krizi geçiren var mı?	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	

EK-III

DENİZLİ İL MERKEZİNDE SAĞLIKLI KİŞİLERDE AKTİVE PROTEİN C  
DİRENCİ VE FV LEIDEN SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

HASTA BİLGİ FORMU

HASTANIN;

TARİH:

1.Adı Soyadı:		2. Kodu:
3.Doğum yılı:	4.Cinsiyeti E <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	5.Memleket:

ÖZGEÇMİŞ:

DVT:	Abortus:
Pulmoner Emboli:	Ölü doğum:
Diğer venlerde tromboz:	
KAH:	Stroke:
Ek Hastalıklar:	
Kullandığı ilaçlar: (OK, OAK)	
Alışkanlıkları:	

SOYGEÇMİŞ:

--

DEĞERLENDİRME:

--

## DENİZLİ İL MERKEZİNDE SAĞLIKLI KİŞİLERDE AKTİVE PROTEİN C DİRENCİ VE FV LEIDEN SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

### BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

- ☞ Aktive protein C direnci ve Faktör V Leiden Hastalığı cinsiyete bağlı olmaksızın toplumda kendini sağlıklı bilen her 100 kişiden 5 ila 10'unda görülen ve ailesel (irsi) olarak geçen genlerimizde oluşan bir bozukluk sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır.
- ☞ Bu araştırma ile Aktive Protein C direnci ve Faktör 5 Leiden Hastalığı saptanan bireylerin bilgilendirilmesi, olası bir pıhtılaşma bozukluğuna karşı alınması gereken önlemlerin belirlenmesi ve genetik danışmanlık hizmetleri gibi bireylere ve ailelerine yönelik sağlık hizmetlerinin verilmesi amaçlanmaktadır.
- ☞ İki aşamalı olan bu projenin birinci aşamasında Aktive protein C direnci saptadığımız bireylerde yani sizlerde ikinci aşama olarak Aktive protein C direncinin % 95 sebebi olan Faktör 5 Leiden Hastalığı tespiti için gen analizi yapılacaktır. Faktör 5 Leiden Hastalığı pıhtılaşmayı sağlayan faktör 5'in gen bölgesinde bir bozukluk sonucu oluşan anormal bir pıhtılaşma faktörüdür ve bunun anormal olması nedeniyle bazı durumlarda erimesi gereken pıhtı erimemekte ve damar tıkanıklıkları oluşmaktadır. Bu durumda; bacak toplar damarlarında tıkanıklık, akciğerlere pıhtı atması, kalp krizi, felç, tekrarlayan düşük, ölü doğum gibi hadiseleri beraberinde getirebilmektedir.
- ☞ Bu araştırma için sizden yaklaşık 2 ml kan alınacaktır. Kan alınması sırasında çok ender olmakla birlikte baş dönmesi, baygınlık hissi ve ağrı gibi istenmeyen etkiler ortaya çıkabilir. Ancak bunlar geçici niteliktedir.
- ☞ Sizden alınacak kandan DNA saflaştırılacaktır. Çalışma gizlilik içinde yürütülecek, örnekleriniz gizlilik çerçevesinde isimsiz olarak saklanacaktır.
- ☞ Çalışma bittiğinde sonuç tarafınıza bildirilecektir.

#### Açıklamaları yapan araştırmacının:

Adı Soyadı:..... İmzası:

#### Tanık:

Adı Soyadı:..... İmzası:

Çalışma hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar ayrıntılı olarak yapılmıştır. Bu koşullarla söz konusu laboratuvar tetkiklerinin yapılmasını kabul ediyorum.

Adres:.....

Telefon:.....

Tarih:

Ad-Soyad:

İmza: