



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KANSERLİ HASTALARDA, TROMBOZ GELİŞMESİNDE
FAKTÖR-V LEİDEN, METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ, PROTROMBİN VE PLAZMİNOJEN
AKTİVATÖR İNHİBİTÖR TİP 1
POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. İsmail KOÇYİĞİT

KAYSERİ – 2008



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KANSERLİ HASTALARDA, TROMBOZ GELİŞMESİNDE
FAKTÖR-V LEİDEN, METİLENTETRAHİDROFOLAT
REDÜKTAZ, PROTROMBİN VE PLAZMİNOJEN
AKTİVATÖR İNHİBİTÖR TİP 1
POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. İsmail KOÇYİĞİT

**Danışman
Prof. Dr. Ali ÜNAL**

KAYSERİ – 2008

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında katkıları olan hocalarım Prof.Dr. Ali Ünal, Prof. Dr. Yusuf Özkul, Doç. Dr. Metin Özkan, Elif F. Emiroğulları'na ve yardımlarından dolayı EÜTF Tıbbi Onkoloji ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalıőanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca bana hayatta her konuda destek olan eőime ve aileme teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	v
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HEMOSTAZ	3
2.1.1. Pıhtılaşma Fizyolojisi	3
2.2. PIHTILAŞMANIN KONTROLÜ	4
2.2.1. Doğal Antikoagülanlar	4
2.2.1.1. Heparan Sülfat-Antitrombin Mekanizması	5
2.2.1.2. Protein C-Trombomodulin-Protein S Mekanizması.....	5
2.2.1.2.1. Protein C (PC)	5
2.2.1.2.2. Trombomodulin (TM)	6
2.2.1.2.3. Protein S (PS)	6
2.2.1.3. Doku Faktörü Yolu İnhibitörü (Tissue factor pathway inhibitor: TFPI).....	7
2.2.2. Fibrinolitik Sistem	7
2.3. TROMBOZ	8
2.4. TROMBOZA EĞİLİM (TROMBOFİLİ)	8
2.4.1. Antitrombin III Eksikliği	11
2.4.2. Protrombin Gen Polimorfizmi (PT G20210A).....	11
2.4.3 MetilenTetraHidroFolat Redüktaz (MTHFR) Gen Polimorfizmi	12
2.4.4 Faktör V Leiden Mutasyonu.....	14
2.4.5. Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip 1(PAI-1) Gen Polimorfizmi	17

2.5.KANSER VE TROMBOZ	18
2.5.1. Kanserde Tromboz Patofizyoloji.....	19
2.5.1.1. Kan akım değişiklikleri	19
2.5.1.2. Kan bileşimindeki anormallikler:	19
2.5.1.2.1.Tümör hücre prokoagülanları	19
2.5.1.2.2. Tümöre cevap olarak normal konak dokuları tarafından oluşturulan prokoagülan aktiviteler	20
2.5.1.3. Damar duvarındaki anormallikler	20
2.5.2.Kanser ve Fibrinolitik Sistem.....	21
2.5.3.Kanserde Antifosfolipid Antikorlar	22
2.5.4.Kanserde İnflamasyon ve Anjiogenesis	22
2.5.5.Kanserde Trombofilik Durumun Laboratuvar Tanısı	23
2.5.5.1.Klasik Kan Koagülasyon Testlerinin Anomalileri	23
2.5.5.2.Hiperkoagülasyon Markırları	24
2.5.6.Kanser ve Doğal Antikoagülanlar	24
2.5.7.Kanserde Venöz Tromboemboli Kliniği	26
2.6. KANSER VE GEN POLİMORFİZMLERİ İLİŐKİŐİ	28
2.7. KANSERDE TROMBOZ TEDAVİŐİ.....	29
2.7.1. Kemoterapi ve profilaksi	30
2.7.2. Santral venöz kateter ve profilaksi	31
2.7.3. VTE tedavisi ve sekonder profilaksi	31
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	32
3.1. GEREÇLER	34
3.1.1. Demirbaş Malzemeler	34
3.1.2. Sarf Malzemeler	34
3.2. YÖNTEMLER	35
3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması	35
3.2.2. Kandan DNA İzolasyonu Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması	35

3.2.3. Metod.....	36
3.2.4. Moleküler Çalışma Basamakları	36
3.2.5. Elektroforez Sonrası Yapılan İşlemler	40
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	43
5. BULGULAR	44
5.1. PCR BULGULARI	45
5.2. RFLP ANALİZİ	46
5.2.1. MTHFR C677T Polimorfizmi.....	46
5.2.2. Protrombin G20210A Polimorfizmi.....	47
5.2.3. Faktör-V Leiden G1691A Polimorfizmi	49
5.2.4. PAI-1 4G/5G Polimorfizmi	50
6. TARTIŞMA	52
7. SONUÇLAR.....	60
KAYNAKÇA	62
KABUL ONAY SAYFASI.....	74

KISALTMALAR

APC	: Aktive Protein C
APL	: Antifosfolipid
APTT	: Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı
AT	: Antitrombin
Bp	: Baz çifti
BHMT	: Betain-homosistein transferaz
DF	: Doku Faktörü
DFYİ	: Doku Faktörü Yolu İnhibitörü
DMAH	: Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin
DVT	: Derin ven trombozu
FVa	: Aktif Faktör V
FVIIIa	: Aktif Faktör VIII
MTHFR	: Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz
MI	: Myokard Infaktüsü
OKS	: Oral Kontraseptif
PAI-1	: Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip 1
PC	: ProteinC
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PE	: Pulmoner Emboli
PS	: Protein S
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
TAFI	: Trombinle Aktive Edilebilen Fibrinolizis İnhibitörü

Tpa : Doku plazminojen aktivatorü
uPAR : Doku plazminojen aktivatorü reseptörü
VT : Venöz Tromboz
VTE : Venöz Tromboemboli

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 2.1. Trombofili için risk faktörleri.....	9
Tablo 2.2. Kalıtsal trombotik bozukluklar	9
Tablo 2.3. Kalıtsal trombofili görülme sıklığı.....	10
Tablo 3.1. MTHFR C677T, MTHFR A1298C, Protrombin G20210A, Faktör-V Leiden G1631A ve PAI-1 4G/5G primerlerinin listesi	37
Tablo 3.2. Polimorfizmlerin enzim ile kesim ürünlerinin gösterimi.	42
Tablo 5.1. Hasta ve kontrol grubu tanıları.....	45
Tablo 5.2. MTHFR C677T genotiplerinin dağılımı	47
Tablo 5.3. Alt grub analizinde MTHFR C677T genotiplerinin dağılımı	47
Tablo 5.4. Protrombin G20210A genotiplerinin dağılımı	48
Tablo 5.5. Alt grub analizinde Protrombin G20210A genotiplerinin dağılımı	48
Tablo 5.6. Faktör-V Leiden G1691A genotiplerinin dağılımı.....	49
Tablo 5.7. Alt grub analizinde Faktör-V Leiden G1691A genotiplerinin dağılımı.....	49
Tablo 5.8. PAI-1 4G/5G genotiplerinin dağılımı.....	50
Tablo 5.9. Alt grub analizinde PAI-1 4G/5G genotiplerinin dağılımı.....	50
Şekil 1. FV Leiden varlığında ortalama trombotik olay görülme yaşları	16
Şekil 2. HinfI enzimi ile kesilen C677T PCR ürünlerinin %3'lik agaroz jel görüntüleri. 23 bp'lik fragment jelde görünmemektedir.....	46
Şekil 3. Bsl enzimi ile kesilen 4G/5G PCR ürünlerinin %4'lük agaroz jel görüntüleri.....	50

ÖZET

Tromboemboli, kanser hastalarında sık karşılaşılan, önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Edinsel birçok faktörün bu duruma katkısı olduğu bilinmekle birlikte genetik yatkınlığın rolü halen tartışmalıdır. Bu çalışmada tromboz gelişiminde rol alan ve sık görülen genetik polimorfizmler trombozu olan ve olmayan kanserli hastalarda değerlendirildi. Bu çalışmaya 2004–2008 yılları arasında kliniğimizde kanser tanısı ile takip edilen, hastalığının herhangi bir döneminde klinik ve görüntüleme ile tromboz tanısı alan 158 hasta ile benzer yaş grubunda ve kanser tanısı olup trombozu bulunmayan 134 hasta alınmıştır. Çalışmaya alınan hastaların Faktör V Leiden G1691A, Protrombin G20210A, Metilen Tetra Hidrofolat Redüktaz (MTHFR) C677T ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör (PAI-1) 4G/5G polimorfizmleri bakılmıştır. Yapılan analiz sonucunda hasta grubunda bakılan Faktör V Leiden G1691A polimorfizmi 48 kişide heterozigot ve 1 kişide homozigot saptandı. Kontrol grubunda ise 32 kişide heterozigot ve 1 kişide homozigot olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,462$). Protrombin G20210A polimorfizmi ise hasta grubunda 11 kişide heterozigot ve 1 kişide homozigot idi. Kontrol grubunda 4 kişide heterozigot bulunup homozigot olguya rastlanmadı ve hasta grubu ile aralarında anlamlı fark bulunamadı ($p=0,198$). MTHFR C677T polimorfizmi ise hasta grubunda 48 kişide heterozigot ve 15 kişide homozigot bulundu. Kontrol grubunda ise 24 kişide heterozigot ve 12 kişide homozigot bulunup bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,04$). PAI-1 4G/5G polimorfizmi hasta grubunda 56 kişide heterozigot ve 11 kişide homozigot iken kontrol grubunda ise 57 kişide heterozigot ve 11 kişide homozigot bulunup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,362$). Alt grup analizinde ise belirtilen üç polimorfizmde yine anlamlı fark saptanamazken MTHFR C677T gastrointestinal kanserlerde trombozu olan grupta 22 hastada heterozigot ve 4 hastada homozigot, kontrol grubunda ise 8 hastada heterozigot ve 6 hastada homozigot olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,028$). Kanser ve tromboz birlikteliği ile ilgili yapılan genetik çalışmalarda birçok farklı sonuç elde edilmiş olup bizim çalışmamızda ise sözü geçen polimorfizmlerden sadece MTHFR C677T’de anlamlı fark saptanmıştır.

Kanser hastalarında tromboza yatkınlık oluşturan edinsel ve genetik faktörlerin ayrıntılı biçimde ortaya konması ve bu çalışmadaki sonuçların başka çalışmalarla desteklenmesi halinde genetik yatkınlığın kanser hastalarında tromboz gelişmesinde rolü olabileceğini ortaya koyacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Tromboz, PCR-RFLP, MTHFR C677T, Faktör V Leiden G1691A, Protrombin G20210A, PAI-1 4G/5G

**THE EFFECT OF FACTOR-V LEIDEN, METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE,
PROTHROMBIN AND PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR TYPE 1 IN THE
DEVELOPMENT OF THROMBOSIS IN CANCER PATIENTS**

ABSTRACT

Thromboembolism is frequent in patients with cancer and is a major cause of morbidity and mortality. Although it is known that several acquired factors take place in this process the role of the genetic factors is controversial. In this study we analysed the most common genetic polymorphisms which have a role in the development of thrombosis in cancer patients with or without thrombosis. Study population consist of 292 (158 patients with thrombosis and 134 patients without thrombosis) patients treated in medical oncology department between 2004 and 2008 , having thrombosis diagnosed by clinically and radiological measures in any time during course of disease. Faktör V Leiden G1691A, Prothrombin G20210A, Methlene Tetra Hydrofolate Reduktase (MTHFR) C677T and Plazminogen Activator Inhibitor (PAI-1) 4G/5G were analysed. In the study group 48 and 1 patient had heterozygot and homozygot polymorphism for Faktör V Leiden G1691A respectively. In the control group 32 heterozygot and 1 homozygot polymorphism and there was no statistically significant differents between study and control group($p=0,462$).For Protrombin G20210A 11 and 4 heterozygot polymorphism were observed in control and study group respectively.While there was 1 homozygot polymorphism in study group there was no in control group and the difference between two groups was not statistically significant ($p=0,198$). For MTHFR C677T 48 and 24 heterozygot polymorphism, 15 and 12 homozygot polymorphism were observed in study and control group respectively.The difference between two groups were statistically significant ($p=0,04$). There was no statistically significant difference between two groups for PAI-1 4G/5G polymorphisms ($p=0,362$). In subgroup analyses, statistically significant difference was found only in MTHFR C677T polymorphism in patients with GI cancer and with and without thrombosis ($p=0,028$).The studies investigating relationship between genetic factors and thrombosis revealed controversial results.However, we found no genetic factor relevant to thrombosis other than MTHFR

C677T polymorphism. Further studies investigating genetic and acquired factors in the development of the thrombosis in detail are warranted for documenting clearly the role of genetic polymorphisms.

Key words: Cancer, Thrombosis, PCR-RFLP, MTHFR C677T, Faktör V Leiden G1691A, Protrombin G20210A, PAI-1 4G/5G

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Venöz tromboembolizm (VTE) ve kanser arasında ilişki olduğu yüzyılı aşkın bir süreden beri bilinmektedir. Bununla birlikte kanser hastalarında VTE kanserle ilişkili morbidite ve mortaliteyi belirgin olarak artırmasına karşın etkin bir şekilde teşhis ve tedavi edilememektedir. VTE çok nedenli bir hastalıktır ve bu olaya katkıda bulunan mekanizmalar klasik Virchow triadının bileşenlerini içermektedir (Venöz staz, hiperkoagulabilite ve endotel hasarı). İyi bilinen edinilmiş risk faktörlerine ilave olarak son birkaç dekat içerisinde trombotik riski etkileyen esas olarak hemostatik sistemle ilişkili genetik faktörlerin rolü konusunda elde edilen veriler artmıştır. Bugün için VTE için major risk faktörü olduğu bilinen çeşitli genetik anomaliler tanımlanmıştır. Antitrombin, protein C ve protein S' de kalıtsal olarak aktarılan eksiklikler iyi bilinen risk faktörleridir. İlave olarak, faktör V Leiden polimorfizmine bağlı aktive protein C direnci ve faktör II genindeki G20210A polimorfizmi de venöz trombozun sık görülen sebeplerindendir. Hiperhomosisteineminin de VTE için bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir ancak trombofili ve azalmış enzim aktivitesi, termolabil bir fenotip oluşumu ve hafif hiperhomosisteinemiye neden olan metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR C677T) genindeki polimorfizm arasındaki ilişki henüz tam olarak anlaşılabilmemiştir. F XIII A altbirim geninde 34. aminoasit pozisyonunda lözinin valinle yer değiştirmesi ise bazı popülasyonlarda trombozun ortaya çıkışına karşı koruyucu bulunmuştur. Önceden mevcut olan bu risk faktörlerinin tromboz gelişimine olan katkısı şu ana kadar sınırlı sayıda çalışma ile değerlendirilmiş olmakla birlikte genetik faktörlerin kanser hastalarındaki tromboz

gelişimine etkisi tam olarak ortaya konamamıştır. Bu bilgiler ışığında trombozu olan ve olmayan solid tümörlü hastalardan periferal EDTA'lı kan örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapıp PCR-RFLP yöntemi kullanılarak yukarıda bahsedilen MTHFR C677T, FAKTÖR V LEİDEN, PROTROMBİN ve PAI-1 4G/5G polimorfizmleri kanser ve trombozu bulunan hastalarda araştırılmıştır. Sonuçlar benzer solid tümörü bulunup trombozu olmayan ve çalışma grubu ile benzer demografik özellikler taşıyan kontrol grubuyla karşılaştırılarak sözü geçen genetik faktörlerin tromboz gelişimine katkısını ve bu anomalilerin kanser hastalarındaki sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

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 (1). Damar endotel hücreleri, trombositler, pıhtılaşma proteinleri, fibrinolitik sistem ve antikoagülan proteinler normal hemostazın devamını sağlayan elemanlardır (1,2).

2.1.1. Pıhtılaşma Fizyolojisi

Bin dokuz yüz altmışdört 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 (1). 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. Seksenli

yıllarda doku faktörü yolu inhibitörünün (Tissue Factor Pathway inhibitor:TFPI) pıhtılaşma reaksiyonlarındaki öneminin anlaşılmasını takiben pıhtılaşma fizyolojisi daha iyi anlaşılmıştır (1).

Günümüzde pıhtılaşmanın aktivasyonunun endotel zedelenmesi sonucu kanla temas eden subendotelial 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. 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 (intrensek yol) üzerinden olur. FIXa, FVIIIa, fosfolipid ve kalsiyum "Tenaz" kompleksini meydana getirerek FX'u aktive eder (2). FXa, FVa kofaktörlüğünde kalsiyum, magnezyum ve fosfolipid varlığında (protrombinaz kompleks) protrombini trombine dönüştürür. Trombin pıhtılaşma sisteminin en önemli enzimidir. Trombositlerin aktivasyonunu, fibrinojenin fibrine çevrilmesi, FVII, FV, FXI ve FXIII aktivasyonu gibi bir çok görevi vardır. 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 (1-3).

2.2. PIHTILAŞMANIN KONTROLÜ

Koagülasyon sistemi aktivatör ve inhibitörleri ile çok sıkı denetlenen bir sistemdir. 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 (1,2).

2.2.1. Doğal Antikoagülanlar

Bilinen doğal antikoagülanlar etki mekanizmalarına göre 3 gruba ayrılırlar; (4) Heparan Sülfat-Antitrombin mekanizması, Protein C-Trombomodulin-Protein S mekanizması ve Doku faktörü yolu inhibitörüdür.

2.2.1.1. Heparan Sülfat-Antitrombin Mekanizması

Heparin karaciğerde sentezlenen 64 kilodalton (kD) ağırlığında vücudun önemli fizyolojik antikoagülan maddesidir. Tek başına antikoagülan etkisi yok denecek kadar azdır. AT 58 kD ağırlığında, 432 aminoasitten oluşmuş bir glikoproteindir. Karaciğerde sentezlenir. Plazma konsantrasyonu yaklaşık 125 µg/ml ve plazma yarı ömrü 65 saattir. (3,4). AT üzerinde biri heparini, diğeri trombini bağlayan iki majör bölge bulunmaktadır. Heparin ve diğeri 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 (3).

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 (4).

Protein C'nin en önemli aktivatörü trombindir (1). 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 (5). APC endotelial hücre yüzeyindeki protein S ile devamlı etkileşim halindedir. Bu etkileşim, APC'nin trombosit ve diğeri endotelial hücre yüzeyine bağlanmasını kolaylaştırır. Hücre yüzeyine bağlı olarak bulunan APC FVa ve FVIIIa'yı inaktive edebilme özelliğindedir (1,4). APC'nin inhibitör etkisi FXa tarafından modüle edilir, FXa fosfolipid yüzeylerde FVa'ya bağlanarak APC'nin proteolitik etkisinden korur (6). Ayrıca FXa protein S (PS)'in yıkımı ile de prokoagülan etki gösterir (4). En önemli PC aktivatörü trombin olmakla birlikte bunun dışında FXa da trombomodulin varlığında PC'yi aktive edebilmektedir (1). Aynı zamanda APC, plazminojen aktivatör inhibitör (PAI) ile kompleks oluşturarak PAI'nün fibrinolizi düzenleyici etkisini ortadan kaldırıp fibrinolizi uyarmaktadır (2).

APC; protein C inhibitörü (PCI: PAI-3), α_1 antitripsin, α_2 makroglobulin, α_2 antiplazmin, elastase ve katepsin G gibi proteaz inhibitörleri tarafından nötralize edilir (1,2). PCI; platelet ve megakaryositlerde sentezlenir, platelet membranlarından ve mikroveziküllerinden fosfotidil-etanolamin salgılatarak PC'yi inhibe eder. Trombin-trombomodulin (T-TM) kompleksini inhibe ederek prokoagülan aktivite göstermektedir (5).

2.2.1.2.2. Trombomodulin (TM)

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 (2,7). TM, PC'nin trombin ile aktivasyonunda kofaktör rolü oynamakta ve PC aktivasyon hızını 1000-2000 kat arttırmaktadır (7).

2.2.1.2.3. Protein S (PS)

İlk kez 1977 yılında bulunan PS, K vitaminine bağımlı bir protein olup, karaciğerde ve endotelde yapılır; endotel yüzeyinde ve trombositlerin alfa granüllerinde bulunur (7). PS, plazmada %60 oranında klasik kompleman aktivasyonunda düzenleyici bir protein olan C4b bağlayıcı protein (C4-binding protein, prolinden zengin lipoprotein)'e bağılı olarak bulunur. PS'in sadece %40'lık serbest olan formu FVa ve FVIIIa yıkımında kofaktör olarak görev yapar (8). 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 . FVa inaktivasyonu PS varlığında 5-20 kat artmaktadır. Ayrıca FVIIIa'nın parçalanmasında da PS ve FV sinerjik etki göstermektedir (7)

2.2.1.3. Doku Faktörü Yolu İnhibitörü (DFYI)

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 DFYİ adı kullanılmaktadır.

DFYİ yoluyla inhibisyonda, DFYİ 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/ DFYİ /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 (1,3).

2.2.2. Fibrinolitik Sistem

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. Fibrinolizin fibrinin olduğu bölge dışına yayılmasının önlenmesi hayati önem taşımaktadır. Bu da plazminojen aktivatör inhibitörleri (PAI) aracılığı ile sağlanır (1).

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 (9).

Tromboz patogenezinde rol oynayan üç önemli faktör 1800'lü yıllarda Alman patolog Rudolp 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 patogenezi için daha iyi anlamamızda katkıları olmasına karşın, Virchow'un triadı tromboz patogenezinin tartışılmasında hala temel olma özelliğini sürdürmektedir (10). "Hiperkoagülabilité" kanın pıhtılaşmaya eğiliminin artışı yani hemostatik dengenin tromboza kayan değişiklikler göstermesi olarak tanımlanabilir. Kanda pıhtılaşma faktörlerinin konsantrasyonlarının artması (FVII,FVIII, FIX) ya da doğal inhibitörlerin eksikliği (ATIII,PC,PS), fibrinolitik aktivitede azalma gibi değişiklikler hiperkoagülabilité nedenlerindedir (9,10).

2.4. TROMBOZA EĞİLİM (TROMBOFİLİ)

Trombofili (thrombo-philia: trombozu sevmek) 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, kalıtsal yada edinsel veya her ikisinin sonucu olan predispozan faktörlerin neticesinde tromboz gelişimine meyil olarak tarif edilmiştir. Bu tanım, doğrudan hemostatik sisteme bağlı olmayan durumlar da dahil edildiğinden daha kullanışlı bir tanımdır (10).

Tromboz multifaktöriyel bir sürecin sonucudur. Çok sayıda edinsel ve herediter faktörler ayrı ayrı veya bir arada tromboz gelişimine neden olurlar. Bu faktörler aşağıda özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Trombofilik için risk faktörleri.(11)

Edinsel risk faktörleri	Genetik risk faktörleri
<ul style="list-style-type: none">• İleri yaş• Hareketsizlik ve paralizi• Geçirilmiş venöz tromboz, varis varlığı• Kanser-Kemoterapi• Majör operasyon (karın,pelvik, alt ekstr.)• Obezite• Konjestif kalp yetmezliği, kalp krizi• Pelvis, kalça, bacak kırıkları• Oral kontraseptif ve östrojen kullanımı• Gebelik, puerperium• KOAH, sigara içimi• Santral venöz katater• Crohn hastalığı• Nefrotik sendrom• Lupus antikoagülanı	<ul style="list-style-type: none">• Antitrombin III eksikliği• Protein C/S eksikliği• Faktör V Leiden mutasyonu(aktive protein C rezistansı)• Protrombin G20210A mutasyonu• PAI-1 aktivitesinde artma• Hiperhomosisteinemi• Faktör VII eksikliği,• Faktör VIII yüksekliği• Disfibrinojenemi• Plazminojen ve plazminojen aktivasyon eksiklikleri• Heparin kaynaklı trombositopeni• Miyeloproliferatif hastalıklar (polisitemia vera, hiperviskozite sendromları)

Tablo 2.2. Kalıtsal trombotik bozukluklar (11)

Genetik risk	Kalıtım şekli	Klinik
ATIII eksik.	Otozomal dominant	VTE, heparin rezistansı
PC eksikliği	Otozomal dominant	VTE
PS eksikliği	Otozomal dominant	VTE, arteriyel emboli
FVL mutasyonu	Otozomal dominant	VTE, arteriyel emboli
PG20210A	Otozomal dominant	VTE
MTHFR	Otozomal resesif	Arteriyal ve venöz tromboz

Tablo 2.3. Kalıtsal trombofili nedenlerinin görülme sıklığı. (11)

Bozukluk	Toplumda sıklık	Trombozlu hastalarda sıklık
ATIII eksikliği	% 0.02	% 1
PC eksikliği	% 0.2	% 3
PS eksikliği	% 0.1	% 1-2
APC direnci	% 3-6	% 20
Hiperhomosisteinemi	% 5-10	% 10-25
Protrombin G20210A	% 1-2	% 6
FVIII yüksekliği	% 11	% 25

Kalıtsal trombofili; bilinen etyolojik faktörler olmaksızın genellikle genç bir yaşta oluşan (<45) ve tekrarlama eğilimi gösteren venöz tromboemboliye herediter olarak belirlenmiş yatkınlık olarak tanımlanmaktadır. Pıhtılaşma sistemine ait bilgilerin gün geçtikçe artmasıyla yirminci yüzyılın ikinci yarısında kalıtsal trombofililer de aydınlatılmaya başlanmıştır. İlk kez 1965’de AT eksikliğinin tromboza eğilim yarattığı gösterilmiştir. Ardından 1981’de PC ve 1984’de PS eksiklikleri tanımlanmıştır. Bu 3 eksiklik kalıtsal trombofili nedenlerinin sadece %15’ini oluşturur (12). 1993 yılında Dahlback ve arkadaşları kalıtsal trombofilisi olan bazı hastalardan alınan plazma örneklerinin aktif PC’nin antikoagülan etkisine karşı dirençli olduğunu göstermişler (13), 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 (14). 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 (15), 1996’da protrombin geninde bir mutasyonun (protrombin G20210A mutasyonu) kalıtsal trombofiliye neden olduğu gösterilmiştir (16). Artık kalıtsal trombofilinin %63’ünden FV Leiden ve protrombin gen mutasyonunun sorumlu olduğu düşünülmektedir (17).

2.4.1. Antitrombin III Eksikliği

ATIII eksikliği otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. Heterozigot ve homozigot şekli tanımlanmıştır. Homozigot şekli hayatla bağdaşmaz (15). Genel populusyonda 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 (12). ATIII aktivitesinde yetersizlik, venöz tromboz için artmış risk oluşturur, arteryel 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'larının saptanması tipiktir. Eşlik eden kalıtsal veya edinsel protrombotik risk faktörlerinin varlığında tromboz riski 5-20 kat artar (18). 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 (19).

2.4.2. Protrombin Gen Polimorfizmi (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' translyona 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 (16). Bu mutasyon; genin transkripsiyonunu etkilememekte ancak translyonunu arttırmaktadır. Bu da karaciğerden protrombin üretimi ve salınımında artışa neden olur. Protrombin artışı trombin artışı, bu da tromboz riskinde artışı beraberinde getirir (16,20). Bu mutasyonun varlığında tromboz riskinin arttığını gösteren bir çok çalışma mevcuttur (21-25). Venöz tromboembolide bu mutasyon %4-8 oranında saptanırken, rekürren trombozlu veya ailede tromboz öyküsü olanlarda %15-18 oranında görülmektedir (26-28). Bu mutasyonun varlığında tromboz riski 2-5.5 kat artmaktadır (16,21). Diğer kalıtsal trombofili nedenlerinde olduğu gibi spontan ve alışılmadık bölgelerde ven trombozları siktir. Hepatik ven trombozu , mezenterik ven trombozu ve portal ven trombozu ile ilişkisini bildiren yayımlar mevcuttur(15). Heterozigot

mutasyonun serebral iskemide riskini 3.8 kat arttırdığı, homozigot mutasyonun ise 208 kat arttırdığı bildirilmiştir (29). Bu mutasyonun varlığında, hiperlipidemi, sigara ve OKS kullanımı; DVT, miyokard infarktüsü (MI) ve spinal kord infarktüsü için belirgin artmış risk oluşturur (14). Özellikle Akdeniz bölgesinde İspanya (%6,5), İtalya (%4,6), Türkiye (%6,2), Yunanistan (%4) gibi Akdeniz ülkelerinde prevalans rölatif olarak yüksektir (30). PT G20210A mutasyonu ile FV Leiden mutasyonu birlikteliği olabilmektedir. İki mutasyonun birlikte bulunduğu durumda spontan venöz tromboemboli, tromboz rekürrensi ve beklenmedik bölgelerde tromboz belirgin oranda artmaktadır (30,31).

2.4.3 MetilenTetraHidroFolat Redüktaz (MTHFR) Gen Polimorfizmi

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), folat metabolizmasında önemli bir enzimdir. İnsan MTHFR geni, kromozom 1p36.3'de lokalize olmuştur ve 656 aminoasitten oluşan MTHFR erizimini kodlar (32,33). MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilen THF) geri dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür. 5-metil THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. 5,10-metilen THF ise deoksiüridilatim timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF'a okside olmaktadır (34). MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon (en yaygın olanı C677T polimorfizmi) enzim aktivitesini azaltmaktadır (35). Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5- metil THF düzeyi azalmakta, 5,10-metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır (32, 34,35).

MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, enzimin inaktivasyona neden olarak, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (36). MTHFR eriziminin eksikliği durumunda klinik semptomların geniş bir dağılım gösterdiği açıklanmıştır. Hiperhomosisteinemi ve homosisteinürinin ortaya çıktığı ciddi MTHFR eksikliğinde, periferik nöropati, gelişme geriliği, hipotoni, strok, tromboz gibi klinik özellikler görülür. MTHFR eksikliğinin hafif olduğu durumlarda popülasyon genelinde oldukça sık rastlanmakta olup, Özellikle arteriyel hastalıkların oluşumunda bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (37).

İnsan MTHFR geni, kromozom 1p36.3'de yer alır ve bu genin N-terminal ucunun yapısı tamamen açıklanamamıştır (37). Bu gen bölgesinde alternatif kaynaşma (splicing) olayları meydana gelmekte ve bunun sonucunda, değişik dokularda, farklı MTHFR transkriptleri (3 transkript) oluşmaktadır (38). C677T polimorfizmi MTHFR proteinin N terminal katalitik bölgesini etkileyen 4. ekzonda meydana gelir (38). MTHFR C677T polimorfizminde, MTHFR enzimini kodlayan gende 677. nükleotid olan C (Sitozin)'in →T (Timin)'e dönüşmesi sonucu ortaya çıkan bir nokta mutasyonu vardır. Bu mutasyon, genin ürünü olan proteinin 226. pozisyonunda Alanin aminoasitinin yerine Valin aminoasitinin geçmesine neden olur. Bunun sonucu olarak MTHFR aktivitesi azalır. Azalan MTHFR aktivitesi, 5-metil tetrahidrofolat seviyesinde azalmaya ve homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olur (39).

MTHFR'nin C677T mutasyonunda, CC (Alanin/Alanin) homozigot normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler görülmektedir (36). C677T mutasyonunda, MTHFR aktivitesi, homozigot mutant TT genotipinde, heterozigot CT ve homozigot normal CC genotiplerine göre azalırken, homosistein seviyesi önemli oranda yükselir. MTHFR eksikliğinde, homosisteinden metiyonin oluşumundaki bir bozukluk, organizmayı hem metiyonin (ve S-adenozilmetiyonin) azalmasına hem de homosistein birikiminden doğan toksik etkilere maruz bırakır (34). MTHFR geninde belirlenen diğer bir mutasyon da, enzimi kodlayan gende 1298. nükleotid olan A (Adenin)'in → C (Sitozin)'e değişimi sonucu oluşan nokta mutasyonudur. Bu mutasyon sonucu MTHFR proteinin C terminal bölgesinde glutamat alanine dönüşmektedir (40). Bu mutasyonda da diğer mutasyon tipinde olduğu gibi MTHFR aktivitesi azalır. A1298C polimorfizminin plazma homosistein konsantrasyonundaki artışı, C677T polimorfizmi kadar etkilemediği ileri sürülse de, bu polimorfizmin önemi henüz tam olarak açıklanamamıştır (41).

Lievers ve arkadaşları, 1298A→C mutasyonunda MTHFR enzim aktivitesinde azalma olduğunu ancak bu durumun homosistein düzeyinde önemli bir etki yapmadığını göstermişlerdir. Homosisteinin kardiyovasküler hastalıkların

gelişimindeki öneminin yanı sıra 1298A→ C mutasyonunun da kardiovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir (42).

MTHFR enzim etkinliğinin düşük olduğu iki ayrı genetik polimorfizm saptanmıştır. 1995 yılında Frosst ve arkadaşları MTHFR geninin 4. ekzonunda, enzimin folat bağlanma yerini kodlayan dizide mutasyon tespit edilmiştir (C677T). Homozigot bireylerde etkinlik normalin % 35'ine gerilemektedir. Aynı düzeyde olmasa da, heterozigot bireylerde de enzim etkinliği azalmakta, dolayısıyla homosistein düzeyi yükselmektedir (43). MTHFR C677T sıklığının etnik ve coğrafi değişimi oldukça fazladır. MTHFR C677T mutasyonunun toplumda görülme sıklığı % 12 olarak bildirilmektedir. T677T oranı Amerika'daki siyah populasyonda ve Güney Amerika'da %1 iken Avrupa'daki beyaz toplumda, Kuzey Amerika'da ve Avustralya'da %6-20'dir. Avrupa'da kuzeyden güneye doğru görülme sıklığı artmaya meyillidir. Japonların ise %12'si homozigot (T677T)'tur (44). Türkiye'de yapılan çalışmalarda sağlıklı bireylerde homozigot mutant oranı % 5, heterozigot mutasyon oranı ise % 35 olarak bildirilmiştir (45). MTHFR A1298C için, Kuzey Amerika çalışmalarında C1298C prevalansı %7-12 arasındadır. Avrupa'daki çalışmaların çoğunluğunda C1298C dağılım sıklığı %4-12 arasındadır. Çin, Japonya ve Hawaii toplumlarında C1298C genotipli bireyler %1-4 arasındadır. Brezilya, Morocco, Güney Afrika, Türkiye ve İsrail'de yapılan bir çalışmada C1298C sıklığı sırasıyla %6, %3, %4, %6 ve %13 olarak tespit edilmiştir (44).

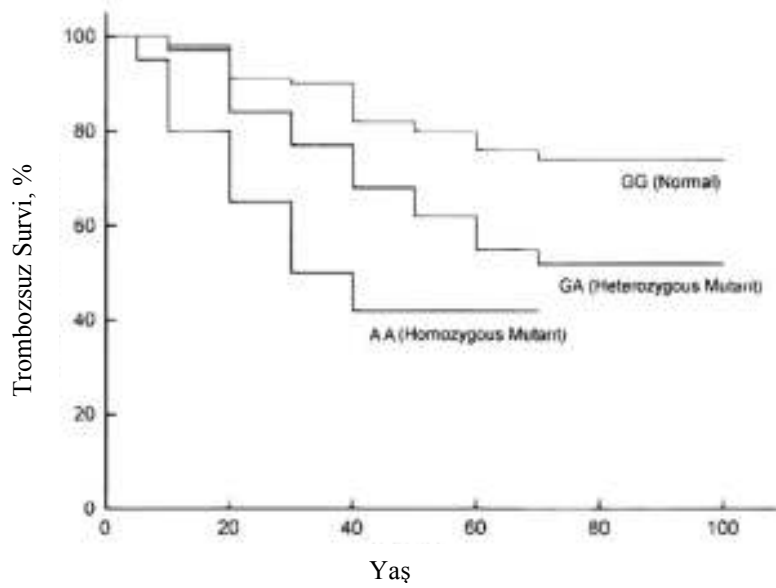
2.4.4 Faktör V Leiden Mutasyonu

Faktör V, protrombinin trombine dönüşmesini sağlayan ve böylece hemostazda yer alan önemli bir kofaktördür. Aktive protein C (APC) ise, Faktör V'i inaktive edip antikoagülant etki göstererek bu süreçte rol oynar (46). Aktive protein C rezistansı (APCR) bir plazma örneğinin APC'ye azalmış antikoagülasyon cevap göstermesiyle tanımlanır ve protein C yolundaki pek çok anomaliye bağlı olabilir. Bu anomaliler defektif APC kofaktörleri, defektif APC substratları veya normal bir protein C yoluna karşı oluşmuş antikor veya diğer ajanlardan kaynaklanabilir. APC'ye karşı dirençle ilgili kalıtımın otozomal dominant olduğu belirtilmiştir (47).

F Va ilk olarak 506. pozisyonundan kesildiğinde F Vaa oluşur. Bu form, %70 oranında prokoagülan aktiviteye sahiptir. F Va'nın tam inaktivasyonu için 306. pozisyonundan da kesilmesi gerekir. Bu reaksiyon protein S tarafından 20 kat hızlandırılır, ayrıca HDL (high density lipoprotein) de bu reaksiyonu arttırıcı etkiye sahiptir. (47). Faktör V geninde var olan 1691. (G->A) pozisyonundaki nokta mutasyonu (Faktör V Leiden mutasyonu) neticesinde 506. pozisyonundaki arjinin aminoasidi yerine glutamin aminoasidi gelmektedir. Mutant faktör V, normaline göre on kat daha yavaş inaktive olmakta, dolaşımında daha uzun süre kalmaktadır. Bu da daha fazla trombin üretilmesine ve protrombin fragmanlarından faktör XII nin ve aktive olmuş koagülasyon faktörlerinin artışıını yansıtan hafif hiperkoagülasyona neden olmaktadır. Bu durum, faktör V molekülüne, APC'nin proteolitik inaktivasyonuna karşı direnç kazandırmakta ve bunun neticesinde bu mutasyonu taşıyan bireyler venöz tromboza eğilimli hale gelmektedir (48).

Faktör V Leiden mutasyonu insidansı toplumlar ve ırklar arasında farklılık göstermektedir. Avrupa popülasyonunda % 4-5 oranında mutasyon saptanmaktadır. Ülkemiz ise mutasyonun sık görüldüğü yerler arasındadır ve insidans % 9.1 civarındadır (49). FV mutasyonunun neden olduğu APC direnci tromboz için önemli bir risk faktörüdür (13,50) ve APC direnci varlığında en yaygın klinik prezantasyon derin ve yüzeysel ven trombozudur (24,51,52). Pulmoner emboli ve alışılmadık bölgelerdeki trombozlar PC, PS ve ATIII eksikliğine göre daha azdır (18,51,53). Yapılan klinik çalışmalarda ilk venöz tromboz epizodu geçiren bireylerin %15-40'ında APC direnci tanımlanmıştır, bu oran diğer kalıtsal anormalliklerden oldukça yüksektir (20,52). Seçilmiş olgularda bu oran %60'lara ulaşmaktadır (11, 26,53). 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 (54). Bir diğer çalışmada DVT geçirenlerde FV Leiden prevalansı %40.1 olarak bulunurken (20), başka bir çalışmada %21.1 (55) ve bir diğerinde %7,8 olarak tespit edilmiştir (56). Normal bireylere göre heterozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda venöz tromboz riski 5-10 kat, homozigotlarda ise 30-140 kat artmıştır (12,26,54). Homozigot FV Leiden mutasyonu tromboz için belirgin risk artışına rağmen, homozigot PC veya PS eksikliğine göre daha zayıf bir protrombotik durum yaratmaktadır (51). 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 (18). Rosendaal ve arkadaşları homozigot mutasyonun daha sık olarak kadınlarda izlendiğini bildirmişler (54) ancak bu bilgi daha sonraki çalışmalarda desteklenmemiştir. Heterozigot FV Leiden mutasyonuna sahip kişilerde ilk trombotik olay ortalama olarak 45 yaşlarında görülmekte iken (57), homozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda ilk VTE epizodu daha genç yaşlarda (31-44 yaş) ortaya çıkmaktadır (54). (Şekil 2.1)



Şekil 2.2. FV Leiden varlığında ortalama trombotik olay görülme yaşları (58).

Heterozigot FV Leiden mutasyonu taşıyanlarda VTE riski yaşla birlikte artar ve taşıyıcı olmayanlara göre anlamlı yükseklik gösterir (18). 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 (53). 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 (59).

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 (21).

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 (15). 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 (18). Buna karşılık bazı çalışmalarda da FV Leiden mutasyonu olan ailelerde yıllık tromboemboli riskinin düşük olduğu ve sürekli profilaksinin gerekli olmadığı görüşü bildirilmektedir (60).

2.4.5. Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip 1(PAI-1) Gen Polimorfizmi

Fibrinolitik sistemde homeostazın düzenlenmesinde iki enzim sistemi önemli rol oynamaktadır. Bu enzim sistemlerinden birincisinde, plazminojen aktivatörleri, ikincisinde ise plazminojen aktivatör inhibitörleri yer almaktadır. Plazminojen aktivatörleri arasında doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve plazminojen aktivatör inhibitörleri arasında ise plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) vardır. Fibrinolitik sistemde PAI-1 aktivasyonu fibrin tarafından gerçekleştirilmekte ve aktive olan PAI-1 ise t-PA'yı bağlayarak onun litik etkisini inhibe etmektedir (61).

PAI-1 379 aminoasitten oluşan ve 48.000 D moleküler ağırlıkta olan lineer bir glikoproteindir. Asıl görevi fibrinolizisi azaltmaktır. İnsan PAI-1 geni 7. kromozomun uzun kolunda (7q21.3-q22) lokalize olmuştur, 9 ekzon ve 8 intron içerir. Birçok polimorfizmin tanımlanmış olmasının yanında, tek bir baz değişimini içeren 4G/5G polimorfizmi promotör bölgesinde yer alır (62). 4G/4G (homozigot mutant) genotipli bireylerdeki plazma PAI-1 seviyesi 5G/5G (homozigot normal) genotipli bireylerdekinden yaklaşık olarak %25 daha fazladır. Yapılan in vitro çalışmalar ile bu bölgede transkripsiyon regülatör proteinlerinin farklı bağlanma

özellikleri belirlenmiştir. Artan gen transkripsiyonu 4G alleli ile ilişkilidir ve yalnızca transkripsiyon aktivatörün bağlanması ile sonuçlanır. 5G alleli ise, represör proteine bağlanarak aktivatörün bağlanma özelliğini azaltır (63). 4G alleli yüksek plazma PAI-1 seviyesinden sorumludur (64).

Yüksek 4G alleli ile plazma PAI-1 seviyeleri ile açık bir şekilde gösterilememesine rağmen hem arteriyel hem de venöz tromboz riskinde artış görülebilmektedir. Bu gen polimorfizimi bulunan hastalarda tromboz riski birçok farklı organda ortaya çıkabilir (65).Yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar tesbit edilmiştir. Derin ven trombozu olan hastalarda 4G/5G polimorfizmi ve PAI-1 seviyeleri anlamlı şekilde yüksek bulunurken(66,67), bazı çalışmalarda ise sağlıklı grup ile aralarında fark bulunamamıştır (68,69). 22 farklı çalışmanın bir araya getirilmesiyle yapılan bir metaanalizde ise 4G alleli ile diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak artmış venöz tromboemboli riski bulunmuştur (65).

2.5. KANSER VE TROMBOZ

Kanserli hastalarda tromboembolik komplikasyonlar morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden birisi olup malignitenin hemostatik sisteme etkisine bağlıdır. Kanserle hiperkoagülabilitate durumunun birlikteliği 140 yıl önce tanımlanmıştır. Armand Trousseau 1865’de kanserli hastalarda tromboz sıklığının artmış olduğunu bildirmiştir. Billroth 1878’de tromboz içinde bulunan tümör hücreleri sıklığının artmış olduğunu bildirmiş ve patolojik sürecin metastaz oluşumu ile ilgili olabileceğini düşünmüştür. Sproule 1938’de pankreas gövde ve kuyruk kanseri nedeniyle ölen hastaların otopsilerinde venöz ve arteriyel tromboz sıklığının arttığını bildirmiştir. Konu ile ilgili ilk gözlemler Trousseau ile başlamış olmakla birlikte 1952 yılında Wright ile yeniden değerlendirilip gizli malignitelerin ilk ortaya çıkış biçiminin tromboembolik hastalık olabileceğini bildirmiştir (70). Venöz tromboemboli (VTE) sonrası ilk yılda yeni malignite teşhisi yüksektir. Prevalans %2 ve %6 arasındadır. Gezici tromboflebit tümörler için rölatif olup, özellikle pankreatik tümörlerde spesifik işarettir (71).

Tromboz 1865’de Trousseau tarafından kanserin bir komplikasyonu olarak tanımlanmıştır (72). Bu iki durumun kombinasyonu hali hazırda sıklıkla

“Trousseau’s Sendromu” olarak adlandırılır. “Trousseau’s Sendromu”; göğüs duvarı ve kollar gibi olağan olmayan yerlerde yüzeysel venlerin rekürren, migratuar trombozisi ile karakterize VTE’nin nadir bir varyantı olarak tanımlanır. Arteriel ve daha yaygın olarak VTE kanserin sıklıkla komplikasyonudur ve bazen de gizli bir kanserin habercisidir. Bu sendrom özellikle pankreas ve akciğer kanseri ile ilgilidir (73,74). Tümör hücreleri, metastatik süreçlere eşlik eden, tümör hücrelerini immün sistemin etkilerinden, kemoterapötiklerin etkisine karşı koruyan ve tümör hücrelerinin damar duvarına tutunmasını kolaylaştıran çevreleyici fibrin/trombosit agregatlan oluşturmaktadır. Ayrıca, tümörler yüzey bağımlı olarak ya da ürokinaz benzeri plazminojen aktivatörü ile fibrinolitik aktiviteyi ciddi biçimde arttırabilirler. Bu aktivite tümörlerin bağ dokusu bariyerlerini aşarak metastaz oluşturmalarının en azından bir bölümünden sorumludur. Hayvan modeli çalışmalarında fibrinolizis, koagülasyon ve trombosit aktivitesinin, patolojik tümör büyümesinden sorumlu olduğu, bu yolların farmakolojik inhibisyonu ile kanser yayılımının belirgin gerilediği gösterilmiştir (70).

2.5.1. Kanserde Tromboz Patofizyoloji

Maligniteye bağlı hiperkoagülabilitenin patogenezi karmaşık olup birçok değişkene bağlıdır. “Virchow’a” göre bu durumu oluşturan faktörler: Kan akım değişiklikleri, kan bileşimindeki anormallikler ve kan damar duvarındaki anormalliklerdir (70,72).

2.5.1.1. Kan akım değişiklikleri

Hareketsizlik, yatak istirahati veya büyük tümör kitlesinin damar basısına bağlı venöz staz kanser hastalarında çok sık görülür. Yavaş kan akımı; aktive pıhtılaşma faktörlerinin geç temizlenmesi, endotel hasarı ve hipoksisi oluşturarak tromboembolik olayların oluşumunu kolaylaştırır (70).

2.5.1.2. Kan bileşimindeki anormallikler:

2.5.1.2.1. Tümör hücre prokoagülanları

Kanserdeki bu prokoagülasyon durum, tümör hücrelerinin trombin üretimini sağlayan prokoagülan aktiviteyi (kansere prokoagülan faktörleri ve doku faktörleri)

kodlama ve ortama vermelerinin sonucudur (70,72). Tümör prokoagülanları 2 ana başlıkta değerlendirilebilir, doku faktörü ve kanser prokoagülanı (70).

Doku faktörü (DF); 45000 dalton molekül ağırlığında tek zincir transmembran glikoproteindir (75). Faktör VIIa ile kompleks yapı oluşturur ve bu kompleks (DF-FVIIa), faktör IX ile faktör X'u aktive eder (74). Normal insan parankimal, bağ doku hücreleri ve onların malign halleri olan sarkomlar, adenokarsinomlar, melanoma ve nöroblastomlarda ayrıca değişik tipte lösemi ve lenfomalarda da bulunabilir. Benzer şekilde bu hücrelerin malign formlarında tümör hücre doku faktörü sitokinler tarafından düzenlenebilir. DF veya benzer tromboplastinler, faktör VIIa ile etkileşimleri yoluyla ekstrinsik yolu uyarabilirler (70,75). Koagülasyon proteinleri, özellikle doku faktörünün tümör büyümesi ve metastatik yayılımında rol oynadığı gösterilmiştir (76).

Kanser prokoagülanı (KP); malign ya da fetal dokular tarafından yapılan, karbonhidrat içermeyen, tek zincir, molekül ağırlığı 68000 dalton bir sistein proteazdır (77). Faktör X'u, doku faktör/faktör VIIa kompleksinden bağımsız olarak aktive eder ve insanda kolon, meme, akciğer, böbrek, melanoma gibi birçok malign dokuda bulunur, öte yandan aynı dokunun benign durumlarında bulunmaz (70).

2.5.1.2.2. Tümöre cevap olarak normal konak dokuları tarafından oluşturulan prokoagülan aktiviteler

Tümör hücreleri, mononükleer hücrelerde doku faktörü, faktör X aktivatörleri gibi prokoagülan maddelerin sentezi ve salınmasını arttırarak sistemik koagülasyonu uyarabilir (72).

2.5.1.3. Damar duvarındaki anormallikler

Tümör hücreleri damar geçirgenlik faktörü denilen bir peptidi üretebilir. Damar geçirgenlik faktörü ve monosit aktivasyonu, kollajen membranlar etrafındaki ve endotel hücre tabakasındaki kemotaksisi de uyarır. Bu nedenle pıhtılaşmanın sistemik aktivasyonu aynı zamanda solid tümör büyümesi ile ekstravasküler pıhtılaşma faktörlerinin plazmaya diffüzyonunu da yansıtır (72). Tümör proliferasyonu sırasında koagülasyonun aktivasyonu, koagülasyon ve inflamasyon

arasındaki etkileşim ve doku faktör inhibitörünün artışına bağlıdır. Trombofilik durumun laboratuvar tanısı; pıhtılaşma faktörlerinin, fibrinojen/fibrin yıkım ürünlerinin, koagülasyon aktivasyonunun özel belirteçlerin (fibrinopeptid A, fragment 1+2, trombin-antitrombin kompleksi ve D-dimer) artması, hiperfibrinojenemi ve trombositozu içerir. Bununla birlikte bu testlerden hiçbirisi, aday hastalarda trombotik durumların ortaya çıkıp çıkmayacağını önceden belirleyemez (78).

Doku Faktör Yolu İnhibitörü: Doku faktör yolu inhibitörü (DFYİ); doku faktörü (DF) bağımlı koagülasyonun fizyolojik inhibitörü olup, 2 basamaklı bir reaksiyonla koagülasyon faktörlerinden Xa, VIIa ve TF ile bir kompleks oluşturmaktadır (79).DFYİ düzeyleri kanser hastalarında yüksektir ve artmış düzeyleri ileri evre malignitelerde bulunmuştur. DFYİ'nin bu yüksek düzeylerinin nedeni bilinmemektedir. Bu durum kanser hastalarındaki hiperkoagülabilitenin bir sonucu olabilir. Çünkü trombin DFYİ'nin akut salınımı ve yeniden dağılımını *invivo* ve *invitro* ortamlarda arttırmaktadır. Oysa; İversen ve arkadaşları solid tümörlü hastalarda aktive koagülasyon markırları ile DFYİ arasında bir ilişki gösterememişlerdir (78).

2.5.2. Kanser ve Fibrinolitik Sistem

Fibrinoliz ve tümör hücreleri arasındaki etkileşimler karışıktır. Fibrinolizis arttığı zaman kanama ve fibrinolizis bozulduğu zaman tromboz ortaya çıkabilir. Fibrinolizisin farklı aktörleri arasında olan; ürokinaz, doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve reseptörleri (uPA ve uPAR) yaygın olarak çalışılmıştır. Pek çok çalışma uPAR ve uPAR'nın hücre invazyonu ve yayılımı üzerindeki önemi üzerinde hem fikir iken tPA'nın rolü bunun tersidir. UPA'nın tümör hücrelerinden yoğun olarak salınımı, bazı tümörlerin agresifliği, histolojik derecesi ve çeşitli karsinomların klinik progresyonu ile bağlantılıdır. UPAR tümör hücrelerini oluşturan pek çok hücre tiplerinden salınmaktadır .Kanserde fibrinoliz aktivatörünün artmış üretimi, fibrinoliz dengesini hiperfibrinolize doğru kaydırır ve bazı lösemili hastalarda kanama semptomlarının patogeneğinde önemli bir rol oynar. Tümör hücreleri, plazminojen aktivatör inhibitörü 1 (PAI-1)'i üretirler. PAI-1 artımı hiperkoagülabiliteye ve trombotik olaylara katkıda bulunur (78).

Trombinle Aktive Edilebilen Fibrinolizis İnhibitörü: Trombinle aktive edilebilen fibrinolizis inhibitörü (TAFI) karboksipeptidaz B-benzeri proenzim olup fibrinolizisten sonra aktivasyonu azalmaktadır. Fibrinin C-terminal lizin artıklarının temizlenmesini katalizleyerek fibrinolizisi inhibe etmekte ve böylece kısmen oluşmuş trombin üzerine plazminojen bağlanmasını azaltmaktadır. TAFI aktivasyonu plazmin, tripsin ve trombin tarafından katalizlenmektedir (80).Kanserli hastalarda, trombin oluşumu artmıştır. Bu nedenle yüksek TAFI konsantrasyonlarının fibrinolizisi azalttığı ve bunun sonucu olarak da bu hastalarda hiperkoagülabilitte durumunun oluştuğu düşünülebilir (81).

2.5.3. Kanserde Antifosfolipid Antikorlar

Antifosfolipid antikorların (APL) bulunması kazanılmış hiperkoagülabilitte durumun önemli nedenlerinden biri olduğu bilinmektedir. APL, lupus antikoagülanını içerir ve sıklıkla kardiyolipin ile veya fosfotidilinositol, fosfotidiletanolamin ve fosfotidilserin gibi diğer fosfolipidlerle etkileşime girer. Antifosfolipidler kanser hastalarında sık bulunur ve bir çalışmada prevalansı %22 bulunmuştur. Solid tümörlerdeki trombotik olaylar, trombositopeni ya da hemolitik anemi gibi nadir hematolojik komplikasyonlar APL ile ilişkili başlıca klinik durumlardır (82).

APL'nin klinik ortaya çıkışındaki varyasyonlar ve heterojenite bu dolaşan antikorların tam ve doğru identifikasyonunun olmadığını düşündürmektedir. %100 sensitif ve spesifik bir test olmadığından testlerin değişik tiplerinin kombinasyonu tavsiye edilmektedir (78).

2.5.4. Kanserde İnflamasyon ve Anjiogenesis

Tümörün mikro ortamındaki inflamatuvar sitokinlerle koagülasyon faktörlerinin etkileşimi tümör proliferasyonunda önemli bir rol oynar. Tümörler veya tümörle ilişkili lökosit ya da trombositler enflamatuvar sitokin, kemokin üretimi yaparak malignitenin progresyonuna ve damar endotelinin normal antikoagülan etkisinin bozulmasına neden olabilirler. TNF-alfa ve IL-1 gibi sitokinler DF ve PAI-I'in kodlanmasını uyarabilir ve endotel hücrelerinden trombomodulin salgılanmasının azalmasına neden olabilirler. DF ve PAI-I'in artması ve trombomodulin

salgılanmasının azalması endotelin antitrombotik özelliklerinin kaybı, ekstrinsik yolun uyarılması, kan koagülasyon inhibisyonunun azalması ve azalmış fibrinolizis gibi kan koagülasyonunun farklı fazlarına etki ile hiperkoagülabilitenin ortaya çıkmasına neden olabilir (78).

Anjiogenesis tümörlerin büyümesi ve yayılımında etkili olan bir faktördür. Tümör hücrelerince üretilen tümörle ilişkili makrofajlar, TNF, IL-1 ve IL-6, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) gibi anjiogenetik faktörlerin üretimini uyarır. Fibrin ve fibronektinin persistan ekstravazasyonu ve ekstrasellüler matriksin sürekli üretimine yol açar. Bu bilgiler kanser ve enflamasyon durumunda kan koagülasyon faktörleri arasında birden çok önemli etkileşimler olduğunu düşündürmektedir (78).

2.5.5. Kanserde Trombofilik Durumun Laboratuvar Tanısı

Koagülasyon sistemi birçok yolla baskılandığından, tümör histolojisi, tümörün yayılımı, tedavinin etkileri gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Bugüne kadar maligniteye eşlik eden koagülopatinin laboratuvar tanısı konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır. Dahası, kanserli hastalarda tromboembolik olay riskini öngörmede kullanılacak test konusunda da fikir birliği bulunmamaktadır (70).

2.5.5.1. Klasik Kan Koagülasyon Testlerinin Anomalileri

Artmış trombin üretimi ve endotel hücrelerinin düzenleyici etkisinin bozulması, protrombotik durumun oluşmasına neden olur. Bu durum sıklıkla kronik ve iyi kompanse edilmiş, silik laboratuvar bulguları ile karakterize olan yaygın damar içi pıhtılaşması (YDP) ile sonuçlanır. Protrombin zamanı, APTT gibi rutin laboratuvar testlerinin süresi dolaşan pıhtılaşma faktörlerinin düzeyinin artışına bağlı olarak kısalmıştır. Fibrinojen ve trombosit düzeyi normal veya hafif yükselmiş olarak bulunur. Fibrinopeptid A (FPA), protrombin fragmanı 1,2 (F 1.2) ve trombin-antitrombin III kompleksi gibi ek testler hiperkoagülabilitenin durumunun tanısında yararlı olabilir (72).

2.5.5.2. Hiperkoagülasyon Markırları

Fibrinopeptid A (FPA); bir peptid olup trombinin plazma fibrinojeni üzerindeki proteolitik etkisiyle oluşur. Trombin üretiminin bir işareti ve fibrin formasyonunun belirleyicisidir. FPA için ticari olarak bulunabilen radioimmunoassay ve immunoenzimatik assay yöntemleri vardır. İki prospektif çalışmada, hastaların %67 ve %75'inde başvuru anında FPA'nın plazma konsantrasyonları yüksek bulunmuş ve hastalığın ilerlemesi ile FPA plazma konsantrasyonları artmıştır. (70,72,78).

Protrombin fragment (F 1.2); protrombinin faktör Xa aracılığıyla trombine dönüşümünden sonra salınan bir peptiddir. Protrombinaz aktivitesi, trombin oluşumu, trombin-antitrombin kompleks (TAT) ile ilişkili trombin oluşumu ve inhibisyonu ile fibrin yıkım ürünleri, D-dimerler, hem koagülasyon hem de fibrinoliziste hiperkoagülabilite durumlarını yansıtır. Kanserli hastalarda tromboembolik hastalık olsun ya da olmasın F1.2, TAT ve D-dimerlerin tedaviye başlanmadan önce yüksek olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır.

2.5.6. Kanser ve Doğal Antikoagülanlar

Kanser hücreleri pıhtılaşma sistemini doğrudan aktive ederek ya da mononükleer hücre sentezini uyararak veya diğer bazı prokoagülanları uyararak dolaylı yolla trombin oluşumunu sağlayabilirler. Artmış trombin üretimi klinik olarak karaciğerde AT III ve protein C sentezi gibi endotel hücrelerinin pıhtılaşmayı önleyen mekanizmalarının azalması şeklinde görülür (72).

Koagülasyon inhibitörlerinin düzeyinin azalması, antifosfolipid antikorlarının varlığı ve kazanılmış aktive protein C rezistansı hiperkoagülabil duruma katkıda bulunur. Birkaç çalışmada antitrombin, protein C, protein S gibi koagülasyon inhibitörlerinin düzeylerinin kanser hastalarının plazmalarında azaldığı gösterilmiştir. Bu inhibitörlerin düzeylerindeki azalma, defektif hepatik sentezden ya da koagülasyon aktivasyon zincirinde aksama veya bu iki mekanizmanın birlikteliğinden kaynaklanabilir (78). Kanserli hastalarda hepatik disfonksiyon normal karaciğer dokusunun kanserli hücrelerce kaplanmasından ya da kullanılan kemoterapötik ilaçların hepatotoksik yan etkilerinden dolayı sık görülmekte ve bunun sonucunda

hemostatik sistemde büyük etkilenmeler olabilmektedir. Hepatik disfonksiyon, pıhtılaşma faktörlerinin klirensinin azalması ve doğal antikoagülanların yapımının azalması nedeniyle tromboza eğilimi arttırmaktadır (70).

Kemoterapi ve hormonal tedavi, doğal antikoagülanlarda kazanılmış eksiklik nedeni olabilir. Siklofosfamid, metotrexate ve fluorourasil alan meme kanserli hastalarda protein C ve protein S düzeyleri tedavinin başlangıcından hemen sonra düşük bulunurken, plazminöjen aktivatör inhibitörleri yüksek bulunmuştur. Ancak bu tedavi ile ilgili çalışmalarda doğal antikoagülanların ve hiperkoagülabilitenin markırlarının seviyeleri ile trombotik olaylar arasında ilişkinin olmadığı bulunmuştur. Protein C, protein S ve AT III' ün düşük dereceleri tamoksifen ve L-asparaginase ile tedavi sırasında da rapor edilmiştir (78).

Malignite ve Aktive Protein C Rezistansı (APCR): APCR; herediter venöz trombozlu hastalarda en sık görülen koagülasyon anomalisidir (78). APCR; ya faktör V "leiden" (FVL) genotipinden ya da protein C sistemindeki kazanılmış defektlerden dolayı venöz tromboembolizm için risk faktörüdür (83).

APCR fenotipi; hastaların çoğunda, FV geninde nükleotid 1691'de arginin yerine glutaminin geçmesiyle oluşan tek nokta mutasyonu açısından heterozigosite veya homozigosite ile birlikte. Bu mutasyon; APC'nin 3 ayrışma alanının birinde değişiklik oluşturur. APC tarafından gerçekleştirilen bu mutasyonlu aktive faktör V'in yavaş yıkımı, yüksek trombin oluşumu oranı ve hiperkoagülabilite durumu ile birlikte (78).

Edinsel APCR; FVL mutasyonunun yokluğunda oluşan bir fenotipik direnç olarak tanımlanır. Yakın zamanlardaki bir çalışmada kanserli hastalarda kalıtsal ve edinsel dirençli VTE'ye sahip olan veya olmayan olgular ile kontrol grupları karşılaştırılmıştır. APC'ye edinsel direnç; kanserli ve tromboembolili olgularda, tromboembolili ve kansersiz olgulara göre çok daha fazlaydı (%54'e karşı %19). FVL'e bağlı APCR ise; kanserlilere göre, kansersiz ve trombofilik hastalarda daha sık bulunmuştu. Bu sonuçlar; kanserdeki hiperkoagülabilite durumunda, FVL majör bir rol oynamazken, edinsel APC rezistansının bu hastalarda trombotik rezistansa katkıda bulunduğunu göstermektedir (78). De Lucia D ve arkadaşları da; ilerlemiş

kanserli hastalarda yaptıkları çalışmalarında APCR'nı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlar ancak APCR olan hastaların sadece birinde FV leiden mutasyon saptamışlardı (84).

Bu edinsel APCR'nin nedeni; kanser hastalarında bulunan yüksek FVIII ve fibrinojen düzeylerine bağlı olabileceği ve APC sensitivite oranı ile FVIII düzeyleri veya fibrinojen konsantrasyonları arasında ters ilişki olabilir. Diğer olası faktörler kanserli hastalarda tanımlanmış APL varlığında plazma protein S düzeylerinde azalmadır. Ek olarak, kanser prokoagulanı ve doku faktör ekspresyonunun artması gibi diğer prokoagulan mekanizmaların etkileşimi kazanılmış APCR dan ekspresyonu için sorumlu olabilir (78,83).

Malignitede kazanılmış APCR; VTE'nin bağımsız bir göstergesidir ve profilaktik antikoagulan tedavi için yüksek riskli hastaların seçiminde klasik olarak yararlıdır (83).

2.5.7. Kanserde Venöz Tromboemboli Kliniği

Hemostatik anomaliler kanser hastalarının %90'dan fazlasında bulunur ve VTE ya da YDP gibi klinikle kendini gösterir. Otopsilerde DVT ya da pulmoner embolinin (PE) insidansı %1-15 rapor edilmiştir (70,78). Solid tümürlü 1041 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada hastaların 81'inde (%7,8) DVT/PE teşhis edilmiştir (85). Histopatolojik karakteristiklerine bakılmaksızın ileri evre kanserlerde hematolojik bozukluklar artar. Kanser dokusunun komplet rezeksiyonu sonrası hematolojik bozuklukların normale döndüğü gösterilmiştir (86).

Agresif antitümör tedavisinde yaygın kullanılan platin bileşikleri, yüksek doz flurourasil, mitomisin, tamoksifen gibi ajanlar ve büyüme faktörleri (granülosit koloni stimulan faktör, granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör ve eritropoietin) tromboz riskini artırır. Bu tromboz riski ile ilgili altta yatan mekanizmalar anlaşılammıştır. Ancak birçok kemoterapötik ajan vasküler hasar meydana getirir (73). Tümör tipi, evresi veya tümör boyutundan başka, immobilizasyon ya da kan akımı obstrüksiyonu nedeniyle staz, cerrahi operasyonlar, infeksiyonlar, kemoterapötik ajanlar nedeniyle endotel hasarı gibi kanserle ilişkili spesifik durumlar

ve kan koagülasyonunun anomalileri kanser hastalarındaki hiperkoagülabilité ve trombofilik duruma katkıda bulunur. (72,78). Cerrahi operasyonlar; hasta immobilizasyonu ve hemostatik sistemin aktivasyonundan dolayı tromboembolik hastalık için majör etkili faktördür. Kanser hastalarında postoperatif tromboz riski; kanser olmayan hastalara göre en azından 2-3 kat artmıştır (70). Bir onkoloji servisine referé edilen 7987 hastada VTE, PE ve DVT insidansları sırasıyla 13.1/1000, 5.5/1000 ve 7.6/1000 olarak bulunmuştú. Risk faktörleri önceki VTE %8, tümör kompresyonu %7, VTE teşhis zamanında hospitalizasyon %23, kemoterapi %25, radyoterapi %21, hormonal tedavi %10, cerrahi %8 olarak belirlenmişti (87).

Kemoterapi için sıklıkla yerleştirilen santral venöz kataterler ve hiperalemtasyon aynı zamanda tromboz ve embolizm riski ile birlikte dir. Kataterlerin trombojenik yüzeyleri faktör XII ve X gibi serin proteazlar ve trombositleri aktive edebilir. Ayrıca santral venöz kataterleri infekte eden gram negatif mikroorganizmalar endotoksin ve gram pozitif mikroorganizmalar bakteriyel mukopolisakkaridazları salgılayabilir. Bu bakteriyel mukopolisakkaridazlar faktör X'u aktive edebilir, endotel hücrelerinin değişim olayına ve trombosit salınması reaksiyonuna neden olabilir. Bu aktivitelerin her biri tromboz riskini artırır (73). Ayrıca yapılan bir çalışmada ilerlemiş evre meme kanserli hastalarda faktör V leiden mutasyonu olan hastalarda kateter ilişkili tromboz riskinin arttığı gösterilmiştir (88). Klinik olarak VTE, kanser tanısı konulmadan önce de görülebildiğinden açıklanamayan VTE tanısı olan tüm hastalarda malignensi araştırılmalıdır. İdiopatik VTE tanılı hastalarda kanser görülme riski 3-19 kat artmıştır. VTE gelişen hastalarda gizli kanser prevalansının %4 ile %10 arasında olduğu bildirilmiştir. Tekrarlayan VTE tanısı konulduktan sonraki ilk 6-12 ayda yeni bir kanser gelişme riski, genel popülasyona göre artmıştır. Risk bir yıldan sonra hızla azalmakta ve genel popülasyon oranına ulaşmaktadır VTE ile kanser arasındaki ilişki, özellikle mide, pankreas, over, beyin kanseri ve Hodgkin lenfomada daha yüksektir. Bir çalışmada 26653 hasta incelenmiş ve DVT veya PE tanısı konulduktan sonraki ilk 6 aylık sürede kanser gelişme riskinin önemli bir şekilde arttığı daha sonradan ise hızla azaldığı ve tanıdan bir yıl sonra kanser riskinin çok düşük olduğu gösterilmiştir. Başlangıç klinik bulgusu VTE olan kanserli hastaların prognozları daha kötü olup yaşam süreleri daha kısadır. Özellikle DVT veya PE tanısı konulan 50 yaş ve üzeri hastalarda gizli bir kanserin araştırılması için anamnez,

fizik muayene ve rutin laboratuvar testlerinin yapılması, akciğer grafisinin çekilmesi, dikkatli ve yakın takip önerilmektedir (89).

2.6. KANSER VE GEN POLİMORFİZMLERİ İLİŞKİSİ

Polimorfizmler, tüm insan genetik araştırmalarında anahtar niteliindeki elementlerdir. Polimorfizmler genin farklı kalıtsal formlarını veya genomun farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır. Genetik belirleyiciler tıbbi genetikte kullanım için pratiklik sunar. Bağlantı analiz yolu ile kromozomların belirli bölgelerindeki genlerinin haritalanması, genetik hastalıkta doğum öncesi tam, genetik hastalıklarda heterozigot taşıyıcıların belirlenmesi, koroner kalp hastalığı, kanser ve diyabet gibi yaygın yetişkin hastalıklara yatkın kişilerin yüksek ve düşük risklerin değerlendirilmesi adli tıpta ve babalık testinde kullanım ve organ transplantasyonu için doku tiplemesi tıbbi genetik kapsamı içindedir (88).

Kanserli hastalarda trombozun oluşumu multifaktöriyel olup klinik, genetik ve çevresel faktörlerin arasındaki etkileşim tromboz gelişimine katkıda bulunur (90-92). Bu hastalarda tromboz gelişimine katkısı olduğu düşünülen bir kaç polimorfizm farklı çalışmada araştırılmıştır. Bunlardan en sık faktör V leiden ve protrombin G20210A polimorfizmleri daha kapsamlı şekilde irdelenmiş, bununla birlikte daha az sayıda PAI-1 4G/4G ve MTHFR ile ilgili araştırma yapılmıştır(92). Kanserli hastalarda tromboza neden olduğu düşünülen potansiyel gen polimorfizmlerinden FVL ile ilgili yapılmış çalışmalarda farklı sonuçlara varılmıştır. APC direncine neden olan FVL mutasyonunun kanserli hastalarda tromboz gelişimine katkısı bulunduğu bazı çalışmalarda gösterilirken (92-95) bazı çalışmalarda da gösterilememiştir (90,91,96,97). Trombin seviyesinde artışa neden olarak tromboz oluşumuna katkıda bulunan protrombin G20210A polimorfizmi ile ilgili yapılan kanserli hastalardaki çalışmaların bir kısmında risk faktörü olabileceği gösterilmiş iken (91,93,95), bir kısmında da ilişki gösterilememiştir (90,91,98). Hiperhomosisteinemiye neden olarak tromboz riskinde artışa neden olan MTHFR C677T polimorfizmi ile ilgili yapılan çalışmalarda tromboz ile arasında anlamlı ilişki gösterilememiştir (90,95). Fibrinolitik aktivitede azalma ile etki gösteren PAI-1 polimorfizmi ise, tromboz tespit edilmiş kanserli hastalarda yapılmış az sayıda çalışmada aralarında anlamlı ilişki gösterilememiştir (99,100).

2.7. KANSERDE TROMBOZ TEDAVİSİ

Klinik çalışmalara göre VTE'nin primer profilaksisinin herhangi bir yararı gösterilememiştir. Bununla birlikte özellikle uzun süre immobilize olan, cerrahi veya invaziv girişim uygulanan, kemoterapi alan veya santral venöz kateteri olan hastalara rutin tromboproflaksi yapılması önerilmektedir (73,101) .

Kanserli hastalarda tromboembolik olayların önlenmesinde düşük moleküler ağırlıklı heparin (DMAH), unfraksiyone heparin (uFH) kadar etkili ve güvenilirdir. Hemen hemen aynı etkinliğe sahip olmakla birlikte DMAH'in osteoporoz veya heparin ile ilişkili trombositopeni riskinin daha az olması ve kolay kullanımının olması gibi ek avantajları da vardır. Akut VTE'nin tedavisinde standart uFH'nin yerini DMAH almıştır. DMAH, hastanede yatan hastalarda akut proksimal DVT'un tedavisinde sürekli standart uFH kadar etkili ve güvenilir bir tedavidir. DMAH laboratuvar monitorizasyonuna gerek yoktur Hastalar, hastaneye yatmadan cilt altı olarak DMAH güvenilir bir şekilde kullanılabilir (102). Heparin ve özellikle de DMAH' nin antitümör etki mekanizmaları şu şekilde sıralanabilir;

1. Tümör hücreleri etrafında oluşan mikrotrombüsler ve fibrin depozitleri, kemoterapotik ajanların tümör hücrelerine karşı etkinliklerini kısıtlamaktadır. Aynı zamanda trombin, büyüme faktörü olarak rol almaktadır. Heparin, potent bir antitrombotik etkiye sahiptir.
2. Heparinin direkt büyüme faktörü karşıtı etkisi vardır.
3. Heparin, antikoagülan etkisinden bağımsız olarak antianjiogenez etkisi ile yeni damar oluşumu ve tümör beslenme ve büyümesini önleyici etkiye sahiptir.
4. Heparinin muhtemel diğer bir etkisi ise, kan doku bariyerine olan etki ile başarılı bir KT ile daha belirgin hale gelen, antimetastatik etkisidir.

DMAH' lerin ortalama molekül ağırlıkları 3.5-8 kD arasındadır ve Antifaktör Xa birlikte esas etkilerini FXa üzerinden yapmaktadırlar. Bundan dolayı ilaç etkinliğini ölçmek için plazma antifaktör Xa aktivitesi ölçülmelidir. DMAH' ler içerisinde

antifaktör Xa etkisi en yüksek olanları deltaparin sodyum ve enoxaparin sodyumdur. DMAH' lerin standart heparinlere üstünlükleri şöyle sıralanabilir:

1. Osteoporotik etkileri yoktur.
2. Lipolitik aktiviteleri çok düşüktür.
3. Kanama komplikasyonu riski çok düşüktür.
4. Kolay uygulanabilir. Bu özelliği ile hastanın yataklı kurumda takibi gerekmediğinden fiyat avantajı sağlamaktadır.
5. Standart heparine göre biyoyararlanımı daha yüksek ve plazma yarılanma ömrünün daha uzun olması, fiyat avantajı ve kullanım kolaylığı sağlamaktadır (103).

2.7.1. Kemoterapi ve proflaksi

Kemoterapi verilen kanserli hastalarda hem venöz hem de arterial tromboz gelişme riski daha yüksektir. Gerek KT gerekse RT vasküler endotele karşı toksik etki göstererek ve sitokin salınımını artırarak tromboz riskini artırır. Kemoterapik ajanlar aynı zamanda kanserde düşük olan antikoagülan sistem proteinlerinin karaciğer toksisitesinden dolayı antitrombin, protein S ve protein C gibi bazı doğal antikoagülanların sentezini kısıtlar. KT endotel hücresinin ve tümör hücresinin apoptozunu indükler ve sitokinler açığa çıkar. Trombosit aktivasyonu ve agregasyonunu, doku faktörü salınımını artırırlar (104). İleri evre, postmenopozal ve tedavi rejimlerine tamoksifen eklenen hastalarda tromboz gelişme riski daha fazladır. Tromboz gelişme riski, tamoksifen almakta olan evre I veya II meme kanserli hastalarda %1 iken kemoterapi almakta olan evre II meme kanserli hastalarda %5-13'e artmaktadır. Ayrıca kemoterapi ile birlikte tamoksifen verilen meme kanserli hastalarda ise tromboz gelişme riski daha da artmaktadır. Tek başına tamoksifen verilen meme kanserli hastalarla kemoterapiyle birlikte tamoksifen verilen meme kanserli hastalar karşılaştırıldığında tamoksifen kullanan grupta tromboembolik olaylar daha yüksek oranda bulunmuştur (sırasıyla%1.4 ve %9,6) (89).

Kemoterapi alan hastalarda rutin antikoagülan profilaksi konusu tartışmalıdır. Levine ve arkadaşlarının çalışmasında metastatik meme kanserli hastalara kemoterapi tamamlandıktan sonraki bir hafta süresince bir gruba plasebo diğer gruba ise günde 1 mg varfarin verilmiş ve VTE, varfarin verilen grupta daha az oranda gözlenmiş fakat sağkalım avantajı görülmemiştir (105).

2.7.2. Santral venöz kateter ve profilaksi

Üst ekstremitede venöz portu bulunan kanserli hastalarda subklavian tromboz insidansı aynı portu olan fakat kanser olmayan hastalardan çok daha yüksek orandadır. Tromboprofilaksi yapılmayan santral venöz kateteri olan hastalarda üst ekstremitede venöz trombozu venografik olarak gösterilmiştir (101).

Santral venöz kateteri olan kanserli hastaların tromboproflaksisinde hem varfarin hem de DMAH kullanılabilir. Bir çalışmada bu grup hastalar randomize edilerek bir gruba 1 mg varfarin verilmiş diğer gruba ise tedavi verilmemiş. Tüm hastalara üst ekstremitede trombozu geliştiğinde veya 90 gün sonra üst ekstremitede venografisi yapılmış. Varfarin alan grupta venöz tromboz %9.5 oranında iken kontrol grubunda %37.5 oranında saptanmıştır. Santral venöz kateteri olan hematolojik malignansili hastalarda Heaton ve ark.'nın yaptıkları çalışmaya göre trombozu önlemek amacıyla mini doz (1 mg) varfarin profilaksisinin yararı bulunamamıştır. Rutinde bu hastalara varfarin profilaksisi önerilmemektedir (89).

2.7.3. VTE tedavisi ve sekonder profilaksi

Kanserli hastalarda akut VTE'nin başlangıç tedavisi diğer hastalardan farklı değildir. Unfraksiyon heparine alternatif olarak DMAH tedavi edici dozlarda kullanılabilir. Genel kabul edilen heparin veya DMAH en az 5 gün verilmeli daha sonradan heparin kademeli olarak kesilirken oral antikoagülanlar (varfarin veya analogları) ile tedaviye devam edilmelidir. Uzun dönem tedavide varfarin, INR 2-3 arasında olacak şekilde aktif kanser olduğu sürece veya kemoterapi devam ettiği sürece verilir. Beyin metastazı veya primer beyin tümörlerinde tedavi bireyselleştirilmelidir. Bu hastaların çoğunda antikoagülanlar güvenilir bir şekilde

kullanılabilir. Fakat hemorajik beyin metastazı olan hastalarda antikoagulan tedavi verilmemelidir (89).

Oral antikoagulan tedavi sırasında tekrarlayan VTE gelişen hastaların antikoagulan tedavisi standardize edilmemiştir. Önerilen tedavi şekli tam doz uFH veya DMAH ile tekrardan tedaviye başlanması ve INR 3,5-4 arasında olacak şekilde yüksek dozlarda varfarin ile antikoagülasyona devam edilmesidir. Yüksek dozlarda Varfarine direnç durumunda subkutan heparin önerilmektedir. Heparin tedavisine cevap alınamazsa vena kavaya filtre takılması tek seçenektir (89). Trombolitik ilaçlar, yaygın PE, antikoagulan tedaviye rağmen ilerleyen VTE gibi nadir karşılaşılan durumlarda kullanılabilir. Fakat trombolitik tedavi, beyin veya spinal kord tümörlerinde ve göğüs, abdomen veya pelvik büyük kitlesi olan kanserli hastalarda kontraendikedir (72).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya M.K.Dedeman Onkoloji hastanesinde yatarak ve ayaktan takip edilen klinik olarak tromboz saptanan solid tümörlü 158 hasta ve trombozu bulunmayan 134 kanser hastası alındı. Tüm hastalarda venöz tromboemboli radyolojik olarak doğrulandı (Doppler US veya Spiral BT) ve laboratuvar testleri ile desteklendi (DIC paneli, trombosit sayısı, antikardiyolipin antikor, lupus antikoagülanı vb.). Trombozu bulunan kanserli hastalarda ve trombozu olmayan kanserli hastalardan periferik yoldan alınan kanlardan DNA izolasyonu yapıldı. MTHFR C677T, PROTROMBİN 20210A, FAKTÖR V ve PAI-1 gen bölgeleri ayrı ayrı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Daha sonra MTHFR C677T PCR ürünü *HinfI*, Protrombin PCR ürünü *HindIII*, Faktör V PCR *MnII* ürünü ve PAI-1 PCR ürünü *Bsl I* restriksiyon enzimi ile muamele edildi. Enzimle kesilmiş PCR ürünleri %3 lük agaroz jelde koşturuldu ve jel görüntüsünde bantlar değerlendirilerek işleme son verildi. Bu çalışmada kontrol grubunu ise klinik ve radyolojik tromboz bulgusu ve geçirilmiş tromboz öyküsü olmayan kanser hastalarından oluşturuldu. Kontrol kolu belirlenirken hasta koluna benzer özellikteki hastaların alınmasına dikkat edildi.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

1. PCR cihazı
2. pH metre
3. Vorteks
4. Santrifüj
5. Hassas terazi
6. Derin dondurucu
7. Buzdolabı
8. Otomatik Pipet
9. Saf su cihazı
10. Elektroforez sistemi
11. UV transilliminatör
12. Real Time PCR cihazı
13. Etüv

3.1.2. Sarf Malzemeler

1. Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA)
2. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
3. Amonyum Klorür
4. Potasyum Hidrojen Karbonat
5. Amonyum Asetat
6. Etanol
7. İzo-propanol
8. Ependorf Tüpler
9. Buzluk
10. DistileSu
11. Tüplük
12. Falkon tüpleri
13. PCR tüpleri
14. Tris

15. Borik asit
16. Etidiyum Bromid
17. dNTP set 18. MgCl₂
19. Tag DNA Polimeraz Enzimi
20. 10xPCR Tamponu
21. *Hind III* Restriksiyon Enzimi
22. *Hinfl* Restriksiyon Enzimi
23. *Mnll* Restriksiyon Enzimi
24. *BslI*/Restriksiyon Enzimi 25.100 baz çiftlik DNA ladder

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Her iki gruptaki periferel kan örnekleri (0.3 ml EDTA üzerine 2ml kan) alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.2. Kandan DNA İzolasyonu Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

1. Red Cell Lizis Solüsyonu

155 mM Amonyum Klorür

10 mM Potasyum Hidrojen Karbonat

1mM EDTA

2. Cell Lizis Solüsyonu

25mM EDTA

%2 SDS

3. Protein Presipitasyon Solüsyonu

10 M Amonyum Asetat

4. %70'lik Etanol

70 ml Etanol

30 ml distile su

3.2.3. Metod

1. 1 hacim kan üzerine 3 hacim soğuk Red Cell Lizis solüsyonu eklendi, alt üst edildi ve 20 dakika oda ısısında bekletildi.
2. 2500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı.
3. Dipte kalan lökosit pelleti iyice karıştırıldı ve üzerine 1 hacim celi lizis solüsyonu eklendi. Yeniden karıştırıldıktan sonra 37°C'de homojenize olana kadar bekletildi (örnekler homojenize olduktan sonra oda sıcaklığında 18 ay kalabilir).
4. Homojenize olduktan sonra üzerine 1/3 hacim protein presipitasyon solüsyonu eklendi. İyice karıştırıldı. 4000 rpm'de 18 dk. santrifüj edildi.
5. Süpernatant kısmı temiz bir tüpteki 8 ml izopropanol üzerine alındı. Alt üst edildi, DNA görüldü. 4000 rpm'de 8dk. santrifüj edildi.
6. Süpernatant kısmı atıldı, alttaki DNA pelleti %70'lik etanol ile yıkandı. 4000 rpm'de 8 dk. santrifüj edildi ve daha sonra etanol atıldı.
7. DNA oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra üzerine 200 ul distile su eklendi.

3.2.4. Moleküler Çalışma Basamakları

1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonları (PCR)'nda çoğaltılması için her bir polimorfizm ile ilgili PCR programı ve protokolleri hazırlandı. Bu protokollerin hazırlanmasında değişen sadece primer çiftleri ve kullanılan malzemenin miktarıdır.

Tablo 3.1. MTHFR C677T, MTHFR A1298C, Protrombin G20210A, Faktör-V Leiden G1631A ve PAI-1 4G/5G primerlerinin listesi

C677T forward	5'- TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'
C677T reverse	5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'
G20210A forward	5'- TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3'
G20210A reverse	5'- ATAGCACTGGGAGCATTGAAGC-3'
G1631A forward	5'- ACCCACAGAAAATGATGCCCA-3'
G1631A reverse	5'- TGCCCCATTATTTAGCCAGGA-3'
4G/5G forward	5'- CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3'
4G/5G reverse	5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'

a) MTHFR C677T Polimorfizmleri için PCR Protokolünün

Hazırlanması

- DNA —► 5 µl
- Primer-1 (10pm) —► 3 µl
- Primer-2 (10pm) —► 3 µl
- 10xPCR tamponu —► 5 µl
- dNTP(2,5mM) —► 3 µl
- MgCl₂ (1,5mM) —► 3 µl
- Taq DNA polimeraz (IU/ml) —► 0,5 µl

Eklendi ve distile su ile toplam hacim 50µl'ye tamamlandı.

b) Protrombin (G20210A) ve Faktör-V Leiden (G1691A) Polimorfizmleri için PCR

Protokolünün Hazırlanması:

- DNA —► 5 µl
- Primer-1 (10pm) —► 5 µl
- Primer-2 (10pm) —► 5 µl
- 10xPCR tamponu —► 5 µl

- dNTP(2,5mM) —► 3 µl
- MgCl₂ (1,5mM) —► 3 µl
- Taq DNA polimeraz (1U/ml) —► 0,5 µl

Eklendi ve distile su ile toplam hacim 50µl'ye tamamlandı.

c) PAI-1 4G/5G Polimorfizmi için PCR Protokolünün Hazırlanması:

- DNA —► 5 µl
- Primer-1 —► 2µl
- Primer-2 —► 2µl
- 10xPCR tamponu —► 5µl
- dNTP(2,5mM) —► 3 µl
- Taq DNA polimeraz (1U/ml) —► 0,5 µl

Eklendi ve distile su ile toplam hacim 50µl'ye tamamlandı.

d) MTHFR C677T Polimorfizmi için PCR Programı

94°C 2dk. Denatürasyon periyodu

94°C	30 sn.	↕	40 siklus
62°C	30sn.		
72°C	30 sn.		
72°C	7dk.ekstens		

e) Protrombin ve Faktör-V Leiden Polimorfizmleri için PCR Programı

94°C 5dk. Denatürasyon periyodu

94°C	1dk.	↕	35 siklus
56°C	1dk.		
72°C	1dk.		
72°C	1 dk. ekstensiyon		

f) PAI-1 4G/5G Polimorfizmi İçin PCR Programı

94°C	3 dk. Denatürasyon periyodu		
94°C	30 sn.	↑	
60°C	30 sn.		30 siklus
72°C	30 sn.	↓	
72°C	1 dk. ekstensiyon		

2) PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR işleminden sonra hedef DNA bölgesinin amplifikasyonunun doğru gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilmesi için PCR ürünleri agaroz jelde koşturuldu.

a) Agaroz Jel Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

1. TBE Tamponu (10 X)

- 108 gr. Tris
- 55 gr. Borik Asit
- 7,31 gr. EDTA tartılarak distile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

2. Etidyum Bromür (%1'lik)

- 0,2 gr. Etidyum bromür tartılarak distile su ile 20 ml'ye tamamlandı.

3. Yükleme tamponu

- 3 gr. FicoU 400
- 50 mg Xylene Cyanole FF
- 2 gr. Bromofenol Blue tartılarak distile su ile 20 ml'ye tamamlandı.

% 2 Agaroz Jel Hazırlanması

2 gr. agaroz tartıldı, TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı, kaynatılarak eritildi. Soğutulur, jel kalıbına dökmeden önce 4,5 µl etidyum bromür eklendi ve kalıba döküldü. Kuyucukların oluşması için tarak konur ve donmaya bırakıldı.

% 3 Agaroz Jel Hazırlanması

3 gr. agaroz tartıldı, TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı, kaynatılarak eritildi. Soğutulur, jel kalıbına dökmeden önce 4,5 µl etidyum bromür eklendi ve kalıba döküldü. Kuyucukların oluşması için tarak kondu ve donmaya bırakıldı.

% 4 Agaroz Jel Hazırlanması

4 gr. agaroz tartıldı, TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı, kaynatılarak eritildi. Soğutuldu, jel kalıbına dökmeden önce 4,5 µl etidyum bromür eklendi ve kalıba döküldü. Kuyucukların oluşması için tarak kondu ve donmaya bırakıldı.

PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi

PCR ürününden 15 µl alındı, üzerine 3 µl yükleme tamponu eklendi. Mikropipetle karıştırıldı ve sırasıyla kuyucuklara yüklendi. Jeldeki ilk ve son kuyucuğa ürünün bant boyutunu belirleyebilmek için DNA boyut markırı yüklendi. %2 agaroz jelde 75V 30 dk. elektroforez yapıldı. MTHFR C677T 198 bp'de, MTHFR A1298C 163 bp'de, protrombin G20210A 345 bp'de, faktör-V leiden G1691A 223 bp'de, PAI-1 98 bp'de PCR ürünü alındı.

3.2.5. Elektroforez Sonrası Yapılan İşlemler

1. RFLP Analizi (Enzimle Muamele)

a) MTHFR C677T Polimorfizm Analizi Enzimle Muamelesi: PCR ürünlerinden C677T polimorfizmini saptamak için *Hinf I* enzimi kullanıldı. Bu enzim G—► ANTC restriksiyon bölgesi oluşturur. 0.5 ml ependorf tüplere;

- 15 µl PCR ürünü
- 2,5 µl Buffer
- 0,5 µl (2,5U) *Hinf I* enzimi eklendi ve 25 µl'ye distile su ile tamamlandı.

37°C'de 1 gece inkübe edildi.

b) Protrombin G20210A Polimorfizm Analizi Enzimle Muamelesi: G20210A polimorfizm analizinde G→A baz çiftinin değişimi *Hind III* enzimi ile belirlendi. 0.5 ml ependorf tüplere;

- 15 µl PCR ürünü
- 2,5 µl Buffer
- 0,5 µl (2,5U) *HindIII* enzimi eklendi ve 25 µl'ye distile su ile tamamlandı. 37°C'de 1 gece inkübe edildi.

c) Faktör-V Leiden G1631A Polimorfizm Analizi Enzimle Muamelesi : G1631A polimorfizm analizinde G→A baz çiftinin değişimi *Mnl I* enzimi ile belirlendi. 0,5 ml ependorf tüplere;

- 15 µl PCR ürünü
- 2,5 µl Buffer
- 0,5 µl (2,5U) *Mnl I* enzimi eklendi ve 25 µl'ye distile su ile tamamlandı.

37°C'de 1 gece inkübe edildi.

d) PAI-1 4G/5G Polimorfizm Analizi Enzimle Muamelesi: 4G/5G polimorfizmi *BsII* enzimi ile belirlendi. 0.5 ml ependorf tüplere;

- 10 µl PCR ürünü
- 2 µl Buffer
- 0,5 µl *BsII*/enzimi eklendi ve 25 µl'ye distile su ile tamamlandı.

37°C'de 1 gece inkübe edildi.

2. Enzimle Kesim Sonrası Elektroforez İşlemi

a) MTHFR C677T Polimorfizm Analizi İçin Elektroforez: Enzimle kesilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde koşturuldu. Yabani tip (C677C) 198 bp'de tek bant, heterozigotlar (C677T) 198, 175 ve 23 bp'de üç bant ve homozigot mutantlar

(T677T) 175 ve 23 bp iki bant gösterdi.

b) Protrombin G20210A Polimorfizm Analizi İçin Elektroforez: Enzimle kesilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde koşturuldu. Yabanıl tip (A20210A), 345 bp'de tek bant, heterozigotlar (G20210A) 345 ve 322 bp'de iki bant ve homozigot mutantlar (G20210G) 322 bp'de tek bant gösterdiler.

c) Faktör-V Leiden G1691A Polimorfizm Analizi İçin Elektroforez: Enzimle kesilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde koşturuldu. Yabanıl tip (G1691G) 104 ve 82 bp'de iki bant, heterozigotlar (G1691A) 141, 104 ve 82 bp'de üç bant ve homozigot mutantlar (A1 691 A) 141 ve 82 bp'de iki bant gösterdiler.

d) PAI-1 4G/5G Polimorfizm Analizi İçin Elektroforez: Enzimle kesilen PCR ürünleri %4'lük agaroz jelde koşturuldu. Yabanıl tip 98 bp'de tek bant, heterozigotlar (4G/5G) 98, 77 ve 22 bp'de üç bant ve homozigot mutantlar 77 ve 22 bp'de iki bant gösterdiler.

Tablo 3.2. Polimorfizmlerin enzim ile kesim ürünlerinin gösterimi.

Çalışılan polimorfizm	Kullanılan Restriksiyon Enzimi	PCR Ürünü	Normal Genotip Enzim Kesim Ürünleri	Heterozigot Genotip Enzim Kesim Ürünleri	Homozigot Genotip Enzim Kesim Ürünleri
MTHFR C677T	<i>Hinfl</i>	198 bp	198 bp	198 bp 175 bp 23 bp	175 bp 23 bp
Protrombin G20210A	<i>HindIII</i>	345 bp	345 bp	345 bp 322 bp	322 bp
Faktör V G1691A	<i>MnII</i>	223 bp	104 bp 82 bp	141 bp 104 bp 82 bp	141 bp 82 bp
PAI-1 4G/5G	<i>BsII</i>	98 bp	98 bp	98 bp 77 bp 22 bp	77 bp 22 bp

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 15.0 istatistik paket programı kullanıldı. Nitel değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-Kare analizi kullanıldı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Bu çalışmaya 2004-2008 yılları arasında M.K.Dedeman Onkoloji hastanesinde yatarak tedavi edilen veya ayaktan poliklinik muayenesine gelen solid tümörü olan hastalardan radyolojik olarak gösterilmiş (Doppler US veya Spiral BT) ve laboratuvar testleri ile desteklenmiş trombozu bulunan 158 hasta ve solid tümörü olup trombozu bulunmayan benzer yaş grubu ve tanısı olan 134 hasta kontrol grubu alınmıştır. Tromboz tespit edilmiş olan 158 hastanın 71'i(%44,9) erkek, 87'si (%55,1) kadın ve ortalanca yaşı 55 (aralık=21-89) idi. Kontrol grubundaki hastaların 63' (%47) erkek, 71'i (%53) kadın ve ortalanca yaşı 57 (aralık=20-87) idi. Hasta ve kontrol grubunun tanılarına göre dağılımı Tablo 5.1.de verilmiştir.

Tablo 5.1.Hasta ve kontrol grubu tanıları

TANI	HASTA	KONTROL	TOPLAM
Akciğer kanseri	19	19	38
Kolon kanseri	23	25	48
Meme kanseri	18	21	39
Mide Kanseri	23	22	45
Sarkom	12	12	24
Mesane kanseri	5	6	11
Over Kanseri	7	5	12
Nazofarinks Kanseri	3	5	8
Larinks kanseri	4	4	8
Pankreas kanseri	11	4	15
Böbrek kanseri	7	4	11
Primeri bilinmeyen	4	1	5
Diğer	22	6	28
TOPLAM	158	134	292

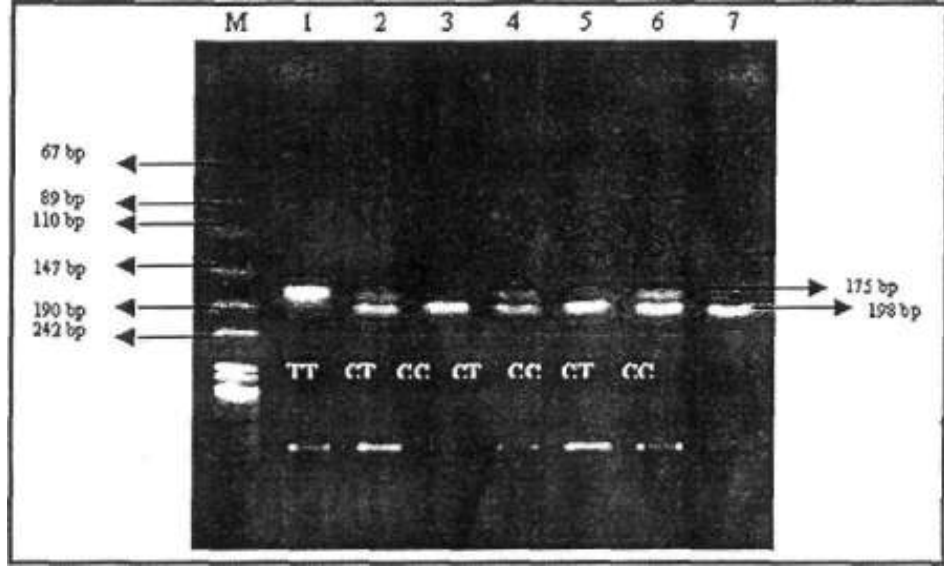
5.1. PCR ANALİZİ

Hasta ve kontrol gruplarından alınan kan örneklerinden DNA elde edildi. Daha sonra PCR'da amplifiye edilen ürünler %2'lik agaroz jelde görüntülendi. Hasta ve kontrol örneklerinde MTHFR C677T 198 bp'de, Protrombin G20210A 345 bp'de, Faktör-V leiden G1691A 223 bp'de, PAI-1 98 bp'de PCR ürünü sağlandı.

5.2. RFLP ANALİZİ

5.2.1. MTHFR C677T Polimorfizmi

C677C genotipi 198 bp'de tek bant, C677T genotipi 198, 175 ve 23 bp'de üç bant ve T677T genotipi de 175 ve 23 bp'de olmak üzere iki bant gösterir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *Hinfl* enzimi ile kesilen C677T PCR ürünlerinin %3'lük agaroz jel görüntüleri. 23 bp'lik fragment jelde görünmemektedir.

CC; homozigot normal (3,5,7)

CT; heterozigot (2,4,6),

TT; homozigot mutant (1)

M: Markır

Analiz sonucunda trombozu bulunan hasta grubunda normal genotipli kişi sayısı 95 (%60,1), heterozigot genotipli kişi sayısı 48 (%30,4) ve homozigot genotipli kişi sayısı 15 (%9,5) iken kontrol grubunda ise sırasıyla normal genotip 98 (%73,1), heterozigot genotip 24 (%17,9) ve homozigot genotip 12 (%9) kişide bulundu. Trombozu olan hasta grubunda bu polimorfizmler daha yüksek bulunurken bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo5.2.). Alt grup analizinde ise trombozu olan ve olmayan grup karşılaştırılmış gastrointestinal kanserlerde bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur.

Tablo 5.2. MTHFR C677T genotiplerinin dağılımı

MTHFR	Hasta (%)	Kontrol (%)	P
C677C (Normal)	95 (60,1)	98 (73,1)	0,04
C677T (Heterozigot)	48 (30,4)	24 (17,9)	
T677T (Homozigot)	15 (9,5)	12 (9)	

Tablo 5.3. Alt grub analizinde MTHFR C677T genotiplerinin dağılımı

TANI	Genotip			P
	Normal(%)	Heterozigot (%)	Homozigot(%)	
Akciğer Kanseri				
Hasta	7 (36,8)	10 (52,6)	2 (10,5)	0.092
Kontrol	14 (66,7)	7 (33,3)	-	
GİS Kanseri				
Hasta	32 (55,2)	22 (37,9)	4 (6,9)	0,028
Kontrol	38 (73,1)	8 (15,4)	6 (11,5)	
Meme kanseri				
Hasta	10 (58,8)	4 (23,5)	3 (17,6)	0,674
Kontrol	15 (71,4)	4 (19,0)	2 (9,5)	
GÜS kanseri				
Hasta	20 (71,4)	5 (17,9)	3 (10,7)	0,912
Kontrol	11 (73,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	
Sarkom				
Hasta	8 (66,7)	4 (33,3)	-	0,065
Kontrol	11 (91,7)	-	1 (8,3)	
Başboyun kanseri				
Hasta	7 (77,8)	-	2 (22,2)	0,059
Kontrol	4(57,1)	3 (42,9)	-	

5.2.2. Protrombin G20210A Polimorfizmi

Protrombin normal tip (G20210G), heterozigot (G20210A) ve homozigot mutant (A20210A) genotipleri tespit edebilmek için öncelikle örnekler PCR ile amplifiye edildi, analiz sonuçlarına göre trombozu bulunan hasta grubunda 146 (%92,4) kişide normal genotip, 11(%7) kişide heterozigot genotip ve 1(%0,6) kişide ise homozigot genotip saptandı. Kontrol grubunda ise 130 (%97) kişide normal genotip, 4 (%3) kişide heterozigot genotip saptanırken hiçbirinde homozigot genotip gözlenmedi. Her

iki grub arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo5.4.). Alt grup analizinde de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Tablo5.5).

Tablo 5.4. Protrombin G20210A genotiplerinin dağılımı

Protrombin	Hasta (%)	Kontrol (%)	P
G20210G (Normal)	146 (92,4)	130 (97)	
G20210A (Heterozigot)	11 (7)	4 (3)	
A20210A (Homozigot)	1 (0,6)	-	

Tablo 5.5. Alt grub analizinde Protrombin G20210A genotiplerini dağılımı

TANI	Genotip			P
	Normal (%)	Heterozigot (%)	Homozigot(%)	
Akciğer Kanseri				
Hasta	17 (89,5)	2 (10,5)	-	0,219
Kontrol	21 (100)	-	-	
GİS Kanseri				
Hasta	53 (91,4)	5 (8,6)	1	0,210
Kontrol	51 (98,1)	1 (1,9)	-	
Meme kanseri				
Hasta	16 (94,1)	1 (5,9)	-	1,000
Kontrol	20 (95,2)	1 (4,8)	-	
GÜS kanseri				
Hasta	27 (96,4)	1 (3,6)	-	1,000
Kontrol	14 (93,3)	1 (6,7)	-	
Sarkom				
Hasta	11 (91,7)	1 (8,3)	-	1,000
Kontrol	12 (100)	-	-	
Başboyun kanseri				
Hasta	8 (88,9)	1 (11,1)	-	1,000
Kontrol	7 (100)	-	-	

5.2.3. Faktör-V Leiden G1691A Polimorfizmi

Faktör V normal tip (G1691G), heterozigot (G1691A) ve homozigot mutant (A1691A) genotipleri tespit edebilmek için öncelikle örnekler PCR ile amplifiye edildi. Analiz sonuçlarına göre trombozu olan hasta grubunda normal genotipli kişi sayısı 109 (%69) iken, heterozigot genotip 48 (%30,4) kişide ve homozigot genotip 1(%0,6) kişide tespit edilirken kontrol grubunda 101(%75,4) kişide normal genotip, 32 (%23,9) kişide heterozigot genotip ve 1(%0,7) kişide homozigot genotip saptandı. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo5.6.).Alt grup analizinde de gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi (Tablo5.7.).

Tablo 5.6. Faktör-V Leiden G1691A genotiplerinin dağılımı

Faktör V	Hasta (%)	Kontrol (%)	P
G1691G (Normal)	109 (69)	101 (75,4)	0,462
G1691A (Heterozigot)	48 (30,4)	32 (23,9)	
A1691A (Homozigot)	1 (0,6)	1 (0,7)	

Tablo 5.7. Alt grub analizinde Faktör-V Leiden G1691A genotiplerinin dağılımı

TANI	Genotip			P
	Normal (%)	Heterozigot (%)	Homozigot(%)	
Akciğer Kanseri				
Hasta	10 (52,6)	9 (47,4)	-	0,338
Kontrol	14 (66,7)	6 (28,6)	1 (4,8)	
GİS Kanseri				
Hasta	42 (72,4)	16 (27,6)	-	1,000
Kontrol	37 (71,2)	15 (28,8)	-	
Meme kanseri				
Hasta	9 (52,9)	8 (47,1)	-	0,598
Kontrol	14 (66,7)	7 (33,3)	-	
GÜS kanseri				
Hasta	22 (78,6)	6 (21,4)	-	0,391
Kontrol	14 (93,3)	1 (6,7)	-	
Sarkom				
Hasta	9 (75)	3 (25)	-	0,590
Kontrol	11 (91,7)	1 (8,3)	-	
Başboyun kanseri				
Hasta	7 (77,8)	1(11,1)	1(11,1)	0,411
Kontrol	7 (100)	-	-	

Ayrıca Faktör V Leiden heterozigot polimorfizmi saptanan iki hastada Aktive Protein C Rezistansı (APCR) saptanmadı. Bu durum metodoloji hatası olarak düşünüldü. Bununla birlikte Faktör V Leiden polimorfizmi saptanmayan 12 hastada APCR gözlemlendi. Kanserin kendisine bağlı olduğu düşünülen bu durumda hastaların 7'sinde genitoüriner sistem kanseri, 4'ünde gastrointestinal sistem kanseri ve 1 hastada ise sarkom tanısı bulunmakta idi.

5.2.4. PAI-1 4G/5G Polimorfizmi

PAI-1 normal (5G/5G) tip, heterozigot (4G/5G) ve homozigot mutant (4G/4G) genotipleri değerlendirildi.(Şekil 5.2).

Yapılan analiz sonucunda trombozu olan hasta grubunda normal genotipli kişi sayısı 91(%57,6), heterozigot genotipli kişi sayısı 56 (%35,4) ve homozigot genotip ise 11(%7) kişide saptandı. Trombozu olmayan grupta ise 66 (%49,3) kişide normal genotip, 57(%42,5) kişide heterozigot genotip ve 11(%8,2) kişide ise homozigot genotip saptandı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo 5.8.). Alt grup analizinde ise trombozu olmayan gastrointestinal sistem kontrol grubunda bu polimorfizm istatistiksel olarak daha yüksek oranda bulundu (Tablo 5.9.).



Şekil 5.2. *Bsl* enzimi ile kesilen 4G/5G PCR ürünlerinin %4'lük agaroz jel görüntüleri. 1:PCR ürünü 2,9-13:Normal 3-8: Homozigot bantlar

Tablo 5.8. PAI-1 4G/5G genotiplerinin dağılımı

PAI-1	Hasta (%)	Kontrol (%)	P
5G/5G (Normal)	91 (57,6)	66 (49,3)	0,362
4G/5G (Heterozigot)	56 (35,4)	57 (42,5)	
4G/4G (Homozigot)	11 (7)	11 (8,2)	

Tablo 5.9. Alt grub analizinde PAI-1 4G/5G genotiplerinin dağılımı

TANI	Genotip			P
	Normal (%)	Heterozigot (%)	Homozigot (%)	
Akciğer Kanseri				
Hasta	14 (73,7)	4 (21,1)	1 (5,3)	0,423
Kontrol	14 (66,7)	7 (33,3)	-	
GİS Kanseri				
Hasta	35 (60,3)	18 (31)	5 (8,6)	0,044
Kontrol	19 (36,5)	25 (48,1)	8 (15,4)	
Meme kanseri				
Hasta	9 (52,9)	7 (41,2)	1 (5,9)	0,464
Kontrol	10 (47,6)	11 (52,4)	-	
GÜS kanseri				
Hasta	16 (57,1)	10 (35,7)	2 (7,1)	0,278
Kontrol	11 (73,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	
Sarkom				
Hasta	5 (41,7)	6 (50)	1 (8,3)	1,000
Kontrol	5 (41,7)	6 (50)	1 (8,3)	
Başboyun kanseri				
Hasta	4 (44,4)	4 (44,4)	1 (11,1)	0,635
Kontrol	4 (57,1)	3 (42,9)	-	

6. TARTIŞMA

1868 yılında Trousseau'nun kanser ve tromboz birlikteliğini tanımlamasından bu yana son dönem yapılan çalışmalarda bu birlikteliğin oranının yaklaşık olarak % 4-20 oranında olduğu belirtilmektedir (93). Venöz tromboembolizm gelişimi multifaktöriyel olup bu mekanizmalar klasik Virchow triadı (hiperkoagülabl durum, staz ve endotel hasarı) bulunduran bu fenomene katkıda bulunurlar. İyi bilinen edinsel risk faktörlerine rağmen son yıllarda genetik polimorfizmlerinde tromboz gelişimine katkısı olduğu düşünülmektedir (90). En sık bakılan genetik mutasyonlar arasında Faktör V Leiden G1691A, Protrombin G20210A, Metilen Tetra Hidrofolat Redüktaz (MTHFR) C677T ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör (PAI-1) 4G/5G bulunmaktadır.

Ramacciotti ve arkadaşlarının 64 venöz trombozu veya pulmoner embolizmi bulunan kanserli hasta ile 147 tromboz öyküsü olmayan kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada Faktör V Leiden G1691A polimorfizm sıklığı sırasıyla %1,5 ve %2,7 bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (90).

Otterson ve arkadaşlarının retrospektif olarak yaptığı 353 kişiyi içeren çalışmada Faktör V Leiden G1691A polimorfizmi 18 hastada heterozigot ve 1 hastada homozigot mutant tespit edilmiş olup bu hasta grubunun içerisinde yalnızca 1 heterozigot ve 1 homozigot polimorfizm tespit edilen hastanın öyküsünde derin ven

trombozu öyküsü vardı. Böylece bu mutasyonun tromboz gelişimine katkısının çok az oranda olduğu düşünüldü (96).

Kennedy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kanseri ve trombozu bulunan 101 hasta ile kanseri olup trombozu bulunmayan 101 hasta çalışmaya alınmış ve trombozu bulunan grupta 5 kişide heterozigot faktör V mutasyonu saptanırken trombozu bulunmayan grupta 3 kişide saptanmış olup aralarında anlamlı fark saptanmadı (91).

Haim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kanseri ve trombozu bulunan 55 hasta, kanseri olup trombozu bulunmayan 58 hasta, kanseri olmayan ve trombozu bulunan 54 hasta ve sağlıklı kontrol grubu 56 kişi çalışmaya dahil edildi. Çalışma sonucunda faktör V leiden mutasyonu sırasıyla 1.grupta 1 kişide, 2.grupta 4 kişide, 3.grupta 18 kişide ve 4. grupta 2 kişide tespit edilip kanserli hastalarda tromboz gelişimine katkısı olmadığı düşünülmüştür Bununla birlikte APC rezistansının kanserli hastalarda tromboza katkısı olabileceğini göstermiştir.(83).

Ravin ve arkadaşlarının birbirlerine benzer demografik özellikleri olan, jinekolojik kanserli hastalarda yaptığı çalışmada, trombozu bulunan 40 kişilik grupta 2 hastada faktör V leiden mutasyonu saptanırken, trombozu bulunmayan 34 kişilik grupta 5 hastada faktör V leiden mutasyonu bulunmuştur. Bu sonuçtan dolayı kanserli hastalarda bu mutasyonun tromboz gelişimine katkısı olmadığı düşünülmüştür (94).

Kanserli hastalarda faktör V leiden mutasyonunun tromboz gelişimine katkısı olduğunu düşündüren çalışmalarda mevcuttur. Mandala ve arkadaşlarının meme kanserli hastalarda yaptığı çalışmada santral venöz kateteri bulunan trombozlu 25 hasta ile trombozu olmayan 50 lokal-ileri veya metastatik meme kanseri çalışmaya alınmıştır. Yapılan analiz sonucunda trombozu olan grupta 5 vakada trombozu bulunmayan grupta ise 2 vakada faktör V leiden mutasyonu saptanmış olup, bu polimorfizmi taşıyanların ileri evre meme kanserli hastalarda kemoterapi aldığı sürece artmış tromboz riski taşıdığı belirtilmiştir (97).

Blom ve arkadaşlarının altı kliniğin verilerini toplayarak yaptığı çalışmada (3220 tromboz öyküsü olan ve 2131 sağlıklı trombozu bulunmayan bireyler) ise kanserin kendisinin tromboz gelişimi riskini 7 kat artırdığı ve faktör V leiden mutasyonu

taşıyan kanserli bireylerin, kanser ve trombozu olmayanlara göre 12 kat daha fazla tromboz riski altında olduğu bulunmuştur (93).

Pihusch ve arkadaşlarının gastrointestinal sistem kanseri bulunan hastalarda yaptıkları çalışmada faktör V leiden mutasyonu olan kanserli hasta grubunda, bu mutasyonu olmayan kanserli hastalara göre tromboz riskinin anlamlı şekilde arttığı ortaya çıkmıştır (95).

Eroğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda 4 grup belirlenmiş olup, 1. Grup trombozu olan tedavi gören 43 kanser hastası, 2.grup trombozu olmayan 81 kanser hastası, 3.grup kanseri olmayan 100 tromboz hastası ve 4.grub 100 kişilik sağlıklı bireyden oluşmakta idi. Analiz edilen faktör V leiden mutasyonu 1.grupta %30,2 gibi yüksek oranda saptanırken, 2.grupta %3,7, 3.grupta %18 ve 4. grupta %8 oranda bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunup kanserli hastalarda tromboz olduğu takdirde dikkatli bir şekilde bu polimorfizmin değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (92).

Bizim çalışmamızda ise 5 yıl süren prospektif değerlendirme sonucunda 158 kanseri ve trombozu bulunan hasta grubu ile 134 trombozu bulunmayan kanserli hastalarda faktör V leiden mutasyonu değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonucunda trombozu olan kanser hastalarında heterozigot genotip 48 (%30,4) kişide ve homozigot genotip 1(%0,6) kişide tespit edilirken kontrol grubunda 32 (%23,9) kişide heterozigot genotip ve 1(%0,7) kişide homozigot genotip saptandı. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,462$). Bu sonuç alt grub analizinde de değişmemiştir. Çalışmamızın sonuçları Ramacciotti ve arkadaşları, Otterson ve arkadaşları, Haim ve arkadaşları, Ravin ve arkadaşları ayrıca Kennedy ve arkadaşlarının buldukları sonuçlarla örtüşmektedir. Çalışmamızda faktör V leiden mutasyonunun kanserli hastalarda tromboz gelişimine katkısı olmadığını desteklemektedir. Bununla birlikte trombozu bulunan hastalarda daha yüksek oranda polimorfizm vardı. Bu polimorfizmin olması diğer faktörlerle birlikte tromboz oluşmasına katkı sağlayabilir.

Protrombin G20210A polimorfizmi de kanserli hastalarda tromboz ile ilgisi en fazla araştırılan genetik mutasyonlardan biridir. Ramacciotti ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada bu polimorfizmi hasta ve kontrol grubunda sırasıyla %1,5 ve %1,3 oranında bulmuş olup kanserli hastalarda tromboz gelişimine katkısı olmadığı sonucuna varmışlardır (90).

Mandala ve arkadaşlarının lokal ileri ve metastatik meme kanserlerinde yaptığı çalışmada kateter ilişkili trombozu olan 25 kişilik hasta grubu ve trombozu olmayan 50 kişilik hasta grubunda Protrombin G20210A değerlendirilmiş ve trombozu bulunan grupta bu mutasyona 1 kişide rastlanmıştır. Bu sonuçla kanserli hastalarda tromboz gelişimine katkısı olmadığı düşünülmüştür (97).

Eroğlu ve arkadaşlarının yukarıda bahsedilen çalışmalarında 1.grupta hiçbir hastada protrombin gen polimorfizmine rastlanmazken, 2.grupta 3 hastada heterozigot mutant bulunmuş, 3.grupta 3 hastada ve 4.grupta 4 hastada heterozigot mutant görülmüş olup gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu yüzden Protrombin G20210A polimorfizmin kanserli hastalarda tromboz gelişimine katkısı olmadığı sonucuna varılmıştır (92).

Sciacca ve arkadaşlarının venöz tromboembolisi bulunan yüksek greydli gliomalı hastalarda yaptıkları çalışmada ise protrombin gen mutasyonunun sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark bulunamamıştır (100).

Bununla birlikte bazı çalışmalarda kanserli hastalarda bakılan bu polimorfizmin tromboz gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Kennedy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Protrombin G20210A polimorfizmi kanseri ve trombozu olan 101 kişilik hasta grubunda 5 kişide heterozigot mutant bulunurken, trombozu olmayan 101 kişilik hasta kanser grubunda ise bu mutasyona rastlanmamıştır. Bu nedenle kanser ilişkili trombozda etkili olabileceğini düşündürmüştür (91).

Pihusch ve arkadaşlarının gastrointestinal kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada bu polimorfizminin heterozigot mutanti değerlendirilmiş olup tromboz insidansında artışa yol açabileceği bulunmuştur. Bu polimorfizmin heterozigot mutantını bulduran kişilerde yaklaşık 2.4 kat daha artırdığı gösterilmiştir (95).

Blom ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kanserli hastalarda faktör V leiden mutasyonu veya Protrombin G20210A mutasyonunun tromboz gelişimini sağlıklı

bireylere 12-17 kat artırdığı bulunmuştur. Kanserli hastalarda bu polimorfizmlerin tromboz gelişimine ciddi oranda katkısı bulunduğu gösterilmiştir (93).

Bizim çalışmamızda da kanseri ve trombozu olan hasta grubunda 11 (%7) kişide Protrombin G20210A polimorfizmi heterozigot olarak bulunurken bu sayı trombozu olmayan kanser grubunda 4(%3) idi. Ayrıca trombozu olan grupta 1(%0,6) kişide homozigot mutanta rastlanırken diğer grupta homozigot mutanta rastlanmadı. Trombozu olan grupta yaklaşık 2 kat daha fazla polimorfizm saptanırken bu fark istatistiksel olarak anlamlı değil idi ($p=0,12$). Alt grub analizlerinin sonuçlarında birbirine benzerdi ve istatistiksel olarak fark yok idi. Bizde bu polimorfizmin kanserli hastalarda tromboz gelişiminde çok önemli rolü olabileceğini düşünmemekle birlikte daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

PAI-1 fibrinolitik sistemin vücut içerisindeki en önemli düzenleyicisidir. Bu inhibitörün aşırı derecede ortaya çıkması fibrinolitik sistemde yıkıma ve trombotik hadiselerin görülme sıklığında artışa neden olur. PAI-1 geninin promotor bölgesi 4G/5G polimorfizm sekansından kaynaklanır ve plazma PAI-1 seviyeleri ile bu polimorfizm ile korelasyon gösterir (65).

Grubic ve arkadaşlarının derin ven trombozu olan hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda yaptıkları çalışmanın sonucunda bu polimorfizmin tromboz gelişimine katkısı olmadığı sonucuna varmışlardır (106). Stegnar ve arkadaşlarının 61 yaş altı venöz tromboembolizm hikayesi olan 158 hasta ve 145 kontrol grubunda yaptıkları bir çalışmada 4G/5G polimorfizmi ile PAI-1 seviyesi arasında DVT'li hastalar açısından bir ilişki bulunduğunu, ancak her iki grupta da 4G/5G genotiplerinin benzer dağılım göstermesi nedeniyle bu polimorfizmin tek başına DVT için bir risk faktörü olmadığı sonucunu çıkarmışlardır (107).

Benzer bir sonuçta Ridker ve arkadaşlarının 40-84 yaşları arasındaki 374 miyokard infarktüsü ve 121 venöz trombozlu hasta grubunda yaptıkları çalışma sonucunda elde edilmiştir. PAI-1 4G/5G polimorfizminin orta yaşlı erkek grubunda arteriyel veya venöz tromboz gelişimine katkısı olmadığı sonucuna varmışlardır (108).

Bununla birlikte Zölller ve arkadaşları PAI-1 genotipinin düşük protein S'li bireylerde trombotik riskin ekspresyonunu etkilediğini bildirmişlerdir (109). Ayrıca Segui ve arkadaşları genetik olarak trombofilik defektli bireylerde 4G/5G genotipinin ekspresyonu etkilediğini göstermişlerdir. Ancak 190 hasta ve 152 DVT'li kontrol grubunda yapılan çalışmada 4G/5G genotip dağılımı benzer olarak bulunmuştur. 4G allel frekansı hasta ve kontrol grubunda sırası ile 0,43 ve 0,57 olarak bulunmuştur. Bu nedenle venöz tromboembolizmi multifaktöryel bir hastalık olarak kabul etmişler ve çalışmalarının sonucunda DVT'li hastalarda PAI-1 promotor polimorfizminin PAI-1 seviyesini etkilediğini tespit etmişlerdir. 4G genotipinin PAI-1 seviyesini artırmasından dolayı tromboz riskini artırdığını savunmaktadırlar (110).

Tsantes ve arkadaşlarının PAI-1 gen polimorfizmleriyle ilgili çalışmalarda farklı sonuçlar ortaya çıkması üzerine 22 çalışmanın ve 2644 vaka ile 3739 kontrolden oluşan bir metaanaliz yayınlamışlardır. Bu analiz sonucunda 4G allelinin özellikle diğer genetik risk faktörleri ile birlikte bulunduğu venöz tromboz riskini artırabildiğini göstermekte idi. Bu yüzden trombofilili hastaların değerlendirildiği esnada bu polimorfizmde göz önünde bulundurulması gerektiğini önermişlerdir (65).

PAI-1 4G/5G polimorfizminin kanserli hastalarda tromboz gelişimine katkısı ile ilgili çok az sayıda çalışma mevcuttur. Sclacca ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada derin ven trombozu veya pulmoner emboli görülen yüksek greydlı gliomalarda genetik polimorfizm bakılmış, nörolojik hastalığı bulunanlar ve sağlıklı kişiler kontrol grubu olarak alınmıştır. Çalışma sonucunda gliomalı hastalarda tPA ve PA-I seviyeleri diğer iki gruba göre yüksek bulunmasına rağmen 4G/5G polimorfizmin sıklığı kontrol grubuna benzer oranda bulunmuş olup tromboz gelişimine katkısı olmadığı sonucuna varılmıştır (100).

Eroğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kanseri ve trombozu bulunan 45 kişilik hasta grubu ile kanseri olup trombozu bulunmayan 80 kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Yaş, cins, kanser tipi ve performans durumu birbirine benzer olan her iki grubun genetik analiz sonucunda kanseri ve trombozu olan grupta 10 (%22,2) kişide homozigot mutant ve 30 (%66,7) kişide heterozigot mutant saptanmıştır. Trombozu olmayan kanser grubunda ise 33 (%41,25) kişide homozigot mutant ve 41(%51,25)

kişide ise heterozigot mutant saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ve kanserli hastalarda PAI-1 4G/5G polimorfizminin tromboz gelişimine katkısı olmadığı düşünülmüştür (99).

Bizim çalışmamızda da yukarıdaki sonuçlara benzer sonuçlar alınmıştır. Trombozu bulunan kanserli grupta 56 (%35,4) kişide heterozigot mutant saptanırken 11 (%7) kişide homozigot mutant gözlemlendi. Trombozu olmayan kanser grubunda ise bu oranlar sırasıyla 57 (%42,5) ve 11 (%8,2) idi. Her iki grub arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değil idi ($p=0,362$). Alt grup analizlerinin sonuçlarında birbirine benzerdi ve istatistiksel olarak fark yok idi. Biz PAI-1 4G/5G polimorfizminin daha geniş serilerde araştırılmasını uygun görmekle birlikte kanser hastalarında tromboz gelişimine katkısı olmadığını düşünmekteyiz.

Frost ve arkadaşları tarafından MTHFR geninde tanımlanan (C677T) polimorfizmi mutasyon bakımından homozigot olan bireylerde yüksek plazma homosistein seviyesi vardır ve böylece hem arteriyel hemde venöz tromboembolizme yatkınlık oluşturur (42). Bu polimorfizmin kardiyovasküler hastalıklar, nöral tüp defektleri, serebrovasküler hadiselerde önemli oranda risk artışına neden olabileceği gösterilmiştir (111).

Kanserli hastalarda bu polimorfizmin tromboz gelişimine katkısı ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Ramacciotti ve arkadaşlarının trombozu olan ve olmayan kanserli hastalarda yaptığı çalışmada MTHFR C677T polimorfizmi trombozu olan grupta %53,1 oranında saptanırken trombozu olmayan grupta ise %60,5 oranında bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan bu sonuca göre kanserli hastalarda tromboz gelişimine katkısı olmadığı düşünülmüştür (90).

Sciacca ve arkadaşlarının yüksek greydlili gliomalarda yaptığı çalışmada değerlendirilen bir başka polimorfizmde MTHFR C677T olup, diğerleri gibi bu hastalarda tromboza katkısı ilişkilendirilememiştir (100).

Pihusch ve arkadaşlarının gastrointestinal kanserlerde tromboz gelişimi üzerine yaptıkları gen polimorfizm çalışmalarında MTHFR C677T'nin homozigot mutanti

değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda kanser ilişkili tromboz gelişimine katkısı olmadığı gösterilmiştir (95).

Lipay ve arkadaşlarının tedavi esnasında tromboz gelişen kanserli çocuk hastalarda gen polimorfizmi çalışılmıştır. Yapılan analiz sonucunda MTHFR C677T'nin hem hasta grubunda hemde kontrol grubunda benzer oranda bulunduğu gösterilmiştir (sırasıyla %47,4 ve %55). Böylece bu polimorfizmin kanser ilişkili tromboza katkısı olmadığı bildirilmiştir (112).

Bununla birlikte Schiavon ve arkadaşlarının bildirdiği bir vaka sunumunda 5-Fluorouracil (5-FU) bazlı adjuvan kemoterapi almakta olan bir kolon kanserli vakada rekürren tromboflebit gelişmesi üzerine yapılan genetik analizde MTHFR C677T'nin heterozigot mutantına rastlanmıştır. Homosistein seviyelerini artıran 5-FU gibi antimetabolit ajanların kullanıldığı rejimlerde bu polimorfizmin tromboz gelişimine katkısı olduğu düşünülmüştür (113).

Bizim çalışmamızda ise kanseri ve trombozu olan hasta grubunda 48 (%30,4) kişide heterozigot ve 15 (%9,5) kişide homozigot mutant ve trombozu olmayan kanser grubunda 24 (%17,9) kişide heterozigot mutant ve 12 (%9) kişide homozigot mutant saptanmıştır. Her iki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,04$). Ayrıca değerlendirilen alt grub analizinde gastrointestinal kanserlerde trombozu olan grupta 22 hastada heterozigot mutant ve 4 hastada homozigot mutant saptanırken, trombozu olmayan grupta ise 8 hastada heterozigot ve 6 hastada homozigot mutanta rastlandı. Bu iki alt grup arasındaki fark istatistik olarak anlamlı idi ($p=0,028$).

7. SONUÇLAR

1. MTHFR C677T polimorfizminin analizi sonucunda; trombozu bulunan hasta grubunda normal genotipli kişi sayısı 95 (%60,1), heterozigot genotipli kişi sayısı 48 (%30,4) ve homozigot genotipli kişi sayısı 15 (%9,5) iken kontrol grubunda ise sırasıyla normal genotip 98 (%73,1), heterozigot genotip 24 (%17,9) ve homozigot genotip 12 (%9) kişide bulundu. Trombozu olan hasta grubunda bu polimorfizmler daha yüksek bulunurken bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,04$). Alt grup analizinde ise trombozu olan ve olmayan grup karşılaştırılmış gastrointestinal kanserlerde bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($P=0,028$).

2. Protrombin G20210A polimorfizminin analizi sonucunda; trombozu bulunan hasta grubunda 146 (%92,4) kişide normal genotip, 11(%7) kişide heterozigot genotip ve 1(%0,6) kişide ise homozigot genotip saptandı. Kontrol grubunda ise 130 (%97) kişide normal genotip, 4 (%3) kişide heterozigot genotip saptanırken hiçbirinde homozigot genotip gözlenmedi. Her iki grub arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi($P=0,12$). Alt grup analizinde de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($P>0,05$).

3. Faktör V Leiden G1691A polimorfizminin analizi sonucunda; trombozu olan hasta grubunda normal genotipli kişi sayısı 109 (%69) iken, heterozigot genotip 48 (%30,4) kişide ve homozigot genotip 1(%0,6) kişide tespit edilirken kontrol grubunda 101(%75,4) kişide normal genotip, 32 (%23,9) kişide heterozigot genotip ve 1(%0,7) kişide homozigot genotip saptandı. Bu iki grup arasında istatistiksel

olarak anlamlı fark yoktu($P=0,462$).Alt grup analizinde de gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($P>0,05$).

4. PAI-1 4G/5G polimorfizminin analiz sonucunda; trombozu olan hasta grubunda normal genotipli kişi sayısı 91(%57,6), heterozigot genotipli kişi sayısı 56 (%35,4) ve homozigot genotip ise 11(%7) kişide saptandı. Trombozu olmayan grupta ise 66 (%49,3) kişide normal genotip, 57(%42,5) kişide heterozigot genotip ve 11(%8,2) kişide ise homozigot genotip saptandı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu($P=0,362$). Alt grup analizinde ise trombozu olmayan kontrol grubunda bu polimorfizm istatistiksel olarak daha yüksek oranda bulundu($P=0,044$).

Sonuç olarak, literatürde kanserli hastalarda tromboz gelişimi ile ilgili genetik polimorfizm çalışmaları az sayıda olmakla birlikte bu çalışmaların sonuçlarında birbirleri ile çelişmektedir. Bizim çalışmamızda Faktör V Leiden G1691A, Protrombin G20210A, ve PAI-1 4G/5G polimorfizmlerinin kanserli hastalarda tromboz gelişimine katkısı olmadığı, bununla birlikte MTHFR C677T'nin tromboz gelişimine neden olabileceği düşünülmüştür. Kanser hastalarında tromboza yatkınlık oluşturan edinsel ve genetik faktörlerin ayrıntılı biçimde ortaya konması ve bu çalışmadaki sonuçların başka çalışmalarla desteklenmesi halinde genetik yatkınlığın kanser hastalarında tromboz gelişmesinde rolü olup olmadığını ortaya koyacaktır.

KAYNAKÇA

1. 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.
2. Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet* 2000;355:1627–32.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Chrobak L, Dulicek P. Resistance to activated protein C as pathogenic factor of venous thromboembolism. *ACTA MEDICA* 1996; 39: 55-62
8. 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.
9. Rodgers GM. Thrombosis and antithrombotic therapy. 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:1781-1820.

10. Thomas DP, Roberts HR. Hypercoagulability in Venous and Arterial Thrombosis. *Ann Intern Med* 1997;126:638-644.
11. Mancı Z. Ocak 2000-Aralık 2005 tarihleri arası Erciyes Üniversitesi Göğüs Hastalıkları servisinde yatarak tedavi gören pulmoner tromboembolili hastaların edinsel ve genetik risk faktörleri açısından retrospektif incelenmesi. Göğüs Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Kayseri 2007.
12. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996;87:3531-3544.
13. 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.
14. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67.
15. Goodnight SS, Griffin JH. Hereditary thrombophilia. In Williams Hematology Textbook, Sixth edition (ed: Ernest Beutler) McGraw Hill Medical Publishing, 2001, page: 1697-1714.
16. 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.
17. Bertina RM. Genetic aspects of venous thrombosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:189-192.
18. Bucciarelli P, Rosendaal FR, Tripodi A, et al. 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.

19. Nachman RL, Silverstein R. Hypercoagulable state. *Ann Intern Med* 1993;119:819-827.
20. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000;95:1527-1528.
21. Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, et al. Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism. Prevalence and risk assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:511-518.
22. Kyrle PA, Mannhalter C, Béguin S, et al. 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.
23. Brodmann M, Renner W, Stark G, et al. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Amitrano L, Brancaccio V, Guardascione MA, et al. High prevalence of thrombophilic genotypes in patients with acute mesenteric vein thrombosis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:146-149.
27. Bertina RM. Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clin Chem* 1997;43:1678-1683.
28. 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.

29. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, et al. Prothrombin G20210A Mutant Genotype Is a Risk Factor for Cerebrovascular Ischemic Disease in Young Patients. *Blood* 1998;91: 3562-3565.
30. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, et al. 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.
31. Gouin-Thibault I, Arkam R, Nassiri S, et al. Markers of activated coagulation in patients with factor V Leiden and/or G20210A prothrombin gene mutation. *Thromb Res* 2002;107:7-11.
32. Rosenblatt DS. Methyltetrahydrofolate reductase. *Clin Invest Med* 2001; 24: 56-59.
33. Homberger G, Linnebank M, Winter C, et al. Genomic structure and transcript variants of the human methyltetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Gen* 2000; 8: 725-729.
34. Bagley PJ, Jacob S. A common mutation in the methyltetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Med Sci* 1998; 95: 13217-13220.
35. Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998; 64: 169-172.
36. Stern LL, Bagley PJ, Rosenberg IH, et al. Conversion of 5-formyltetrahydrofolic acid is unimpaired in folate-adequate persons homozygous for the C677T mutation in the methyltetrahydrofolate reductase gene. *J Nutr* 2000; 130: 2238-2242.
37. Goyette P, Pai A, Milos R, et al. Gene structure of human Mouse methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome* 1998; 9: 652-656.
38. Botto LD, Yang Q. 5,10-methyltetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 862-877.

39. Seli SM, Lugemwa PR. Development of a highly accurate, rapid PCR-RFLP genotyping assay for the metyhlenetetrahydrofolate reductase gene. *Genet Test* 1999; 3: 287-289.
40. Taşçıoğlu N. Gastrointestinal Sistem Kanserlerinde Metilentetrahidrofolat Redüktaz Geni 677C->T, 1298 A->C ve Metiyonin Sentetaz Geni 2756 A->G Polimorfizmlerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2005.
41. Födinger M, Horl WH, Sunder-Plassman G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *JNephrol* 2000; 13 (1): 20-33.
42. Lievers KJA, Boers GHJ, Verhoef V et al. A second common variant in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine and cardiovascular disease risk. *Journal of Molecular Medicine* 2001.
43. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113.
44. Sharp L, Little J. Polymorphism in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A HuGE Review *Am J Epidemiol* 2004; 159: 423-443.
45. Güleç S, Araş O, Akar E, et al. MTHFR gene polymorphism and risk of premature myocardial infarction. *Clinical Cardiology* 2001; 24 (4): 281-4.
46. Haliloğlu B. Açıklanamayan Tek Bir 3. Trimester Fetal Kayıp Olgularında Faktör V Leiden ve Protrombin Gen Mutasyonlarının Yeri. Uzmanlık Tezi, Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İstanbul 2004.
47. Griffin JH. Control of coagulation reactions. in: Beutler E, Lichtman MA., eds. *Williams Hematology*. 6th ed. McGraw-Hill, 2000:1435-49.
48. Beauchamp NJ, Daly ME, Hampton KK et al. High prevalence of mutation in the factor V gene within the U.K. population: relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis. *British Journal of Hematology* 1994; 88: 219-22.

49. Özbek U, Tangün Y. Frequency of factor V Leiden (Arg506Gln) in Turkey. *Br J Haematol* 1997; 97: 504-5.
50. 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.
51. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood*. 1998;92(7):2353-2358.
52. Svensson PJ, Dahlbäck B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994;330:517-522.
53. Goodnight SS, Griffin JH. Hereditary thrombophilia. In Williams Hematology Textbook, Sixth edition (ed: Ernest Beutler) McGraw Hill Medical Publishing, 2001, page: 1697-1714.
54. 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.
55. 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.
56. Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, et al. 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.
57. Lensen RPM, Rosendaal FR, Koster T, et al. Apparent different thrombotic tendency in patients with factor V Leiden and protein C deficiency due to selection of patients. *Blood* 1996;88:4205-4208.
58. Price DT, Ridker PM. Factor V Leiden mutation and the risk for thromboembolic disease. *Ann Intern Med* 1997;127:895-903.

59. Meyer G, Emmerich J, Helley D, et al. Factor V Leiden and II 20210A in patients with symptomatic pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Am J Med* 2001;110:12-15.
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. Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, et al. Five frequent polymorphism of the PAI-1 gene: lack of association between genotypes, PAI activity, and triglycerides levels in a healthy population. *Arterioscler Thromb Biol* 1997; 17: 851-858.
62. Kohler HP, Grant PJ. Mechanisms of disease: plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1801-1972.
63. Dawson S, Wiman B, Hamsten A, et al. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in hepG2 celi. *J Biol Chem* 1993; 268:10739-10745.
64. Yılmaz E, Akar E, Akar N. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thromboembolic patients with and without prothrombin 20210 G-A. *Türk J Haematol* 2004; 21(2): 83-86.
65. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, et al. Association between the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and venous thrombosis. A meta-analysis *Thromb Haemost.* 2007 Jun;97(6):907-13.
66. Sartori MT, Wiman B, Vettore S, et al. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 956–960.
67. Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, et al. Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene: lack of association between genotypes, PAI activity, and triglyceride levels in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 851–858.
68. Grubic N, Stegnar M, Peternel P, et al. A novel G/A and the 4G/5G polymorphism within the promoter of the plasminogen activator inhibitor –1 gene in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res* 1996; 84:431–443.

69. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpainter K, et al. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997; 95: 59–62.
70. Green KB, Silverstein RL: Hypercoagulability in cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*;1092:499-530,1996.
71. Maly J, Blazek M, Blaha M, Pecka M: Changes in hemostasis in malignant diseases *Vnitr Lek*; Jul, 48(7): 614-8, 2002.
72. Piccioli A, Prandoni P, Ewenstein BM, Goldhaber SZ: Cancer and venous thromboembolism. *Am Heart J* 1996; 132: 850-855, 1996.
73. Rodger L, Bick, M.D: Cancer-Associated Thrombosis. *NEJM*; July 10, Volume 349:109-111, 2003.
74. Hillen HF: Thrombosis in cancer patients. *Ann Oncol*;11 Suppl 3:273-6, 2000.
75. Greenberg CS, Orthner CL: Blood Coagulation And Fibrinolysis. *Wintrobe's Clinical Hematology* (Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM), 10 th Edition, Volume 1, Williams and Wilkins, Baltimore, Philadelphia, London. Pp 684-764,1999.
76. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Zimnoch L, Kozlowski L, Kisiel W: Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in human tumor tissue. *Thromb Haemost*; Jul;90(1): 140-6,2003.
77. Mielicki WP: Biochemistry of cancer procoagulant. *Haemostasis*;31 Suppl 1:8-10, 2001.
78. Gouin-Thibault, Achkar A, Samarna MM: The Thrombophilic State in Cancer Patients. *Acta Haematol*; 106:33-42,2001.
79. Paspatis GA, Sfyridaki A, Papanikolaou N, et al: Resistance to activated protein C, factor V leiden and the prothrombin G20210A variant in patients with colorectal cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb*; Jan-Feb;32(1):2-7, 2002.

80. Bajzar L: Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vase Biol*; Dec;20(12):2511-8, 2000.
81. Meijers JC, Oudijk EJ, Mosnier LO, et al.: Reduced activity of TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) hi acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*; Mar;108(3):518-23, 2000.
82. Asherson RA: Antiphospholipid antibodies, malignancies and paraproteinemias. *J Autoimmun*; Sep; 15(2): 117-22, 2000.
83. Haim N, Lanir N, Hoffman R, et al: Acquired activated protein C resistance is common in cancer patients and is associated with venous thromboembolism. *Am J Med*; Feb 1;110(2):91-96,2001.
84. De Lucia D, De Vita F, Orditura M,et al: Hypercoagulable state in patients with advanced gastrointestinal cancer: evidence for an acquired resistance to activated protein C. *Tumori*; Nov-Dec;83(6):948-52,1997.
85. Sallah S, Wan JY, Nguyen NP: Venous thrombosis in patients with solid tumors: determination of frequency and characteristics. *Thromb Haemost*; Apr;87(4):575-9, 2002.
86. Yamamura T: Hematological disorders in patients with gastric cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*; Jul;85(7):675-85,1984.
87. Joung S, Robinson B: Venous thromboembolism in cancer patients in Christchurch, 1995-1999. *N Z Med J*; Jun 7,115(1155):257-60,2002.
88. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel III CF. Thomson and Thomson Tıbbi Genetik. *Güneş Kitabevi* 2005 (6. baskı) 87-93,46, 33-35.
89. Elkıran T. Güllü İH: Kanser ve Tromboz. *THOD*;2(13):100-108, 2003.
90. Ramacciotti E, Wolosker N, Puech-Leao P, et al. Prevalence of factor V Leiden, FII G20210A, FXIII Val34Leu and MTHFR C677T polymorphisms in cancer patients with and without venous thrombosis. *Thromb Res*. 2003 Feb 15;109(4):171-4.

91. Kennedy M, Andreescu AC, Greenblatt MS, et al. Factor V Leiden, prothrombin 20210A and the risk of venous thrombosis among cancer patients. *Br J Haematol.* 2005 Feb;128(3):386-8.
92. Eroglu A, Ulu A, Cam R, Kurtman C, Akar N. Prevalence of Factor V 1691 G-A (Leiden) and prothrombin G20210A polymorphisms and the risk of venous thrombosis among cancer patients. *J Thromb Thrombolysis.* 2007
93. Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA.* 2005 Feb 9;293(6):715-22.
94. Ravin AJ, Edwards RP, Krohn M, et al. The factor V Leiden mutation and the risk of venous thromboembolism in gynecologic oncology patients. *Obstet Gynecol.* 2002 Dec;100(6):1285-9.
95. Pihusch R, Danzl G, Scholz M, et al. Impact of thrombophilic gene mutations on thrombosis risk in patients with gastrointestinal carcinoma. *Cancer.* 2002 Jun 15;94(12):3120-6.
96. Otterson GA, Monahan BP, Harold N, et al. Clinical significance of the FV:Q506 mutation in unselected oncology patients. *Am J Med.* 1996 Oct;101(4):406-12.
97. Mandala M, Curigliano G, Bucciarelli P, et al. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutation and the risk of subclavian vein thrombosis in patients with breast cancer and a central venous catheter. *Ann Oncol.* 2004 Apr;15(4):590-3.
98. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel III CF. Thomson and Thomson *Tıbbi Genetik.* Güneş Kitabevi 2005 (6. baskı) 87-93,46, 33-35.
99. Eroglu A, Ulu A, Cam R, Akar N. Plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism in cancer patients. *J BUON.* 2007 Jan-Mar;12(1):135-6.
100. Sciacca FL, Ciusani E, Silvani A, et al. Genetic and plasma markers of venous thromboembolism in patients with high grade glioma. *Clin Cancer Res.* 2004 Feb 15;10(4):1312-7.

101. Monreal M, Davant E. Trombotic complications of central venous catheters in cancer patients. *Acta Haematol* 2001 ;106:69-72.
102. Koopman MW, Prandoni P, Piovella F, et al. Treatment of venous thrombosis with intravenous unfractionated heparin administered in the hospital as compared with subcutaneous low molecular weight heparin administered at home. *N Eng J Med* 1996;334:628-7.
103. Özkan M: Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde Kemoterapi ile Birlikte Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin Uygulamasının Tedavi Cevabı, Progresyonsuz Geçen Süre ve Yaşam Süresi Üzerine Etkisi. Dahiliye Uzmanlık Tezi, Kayseri 2000.
104. Togna G, Togna A, Franconi M, Caprino L. Cisplatin triggers thrombosit activation. *Thromb Res* 2000;99:503-9. Feb;23(1):31-4.
105. Levine MN, Hirsh J, Gent M et al. Double-blind randomized trial of a very low-dose warfarin for prevention of thromboembolism in stage IV breast cancer. *Lancet* 1994;343:886-9.
106. Grubic N, Stegnar M, Peternel P, Kaider A, Binder BR .A novel G/A and the 4G/5G polymorphism within the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 gene in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res.* 1996 Dec 15;84(6):431-43.
107. Stegnar M, Uhrin P, Peternel P, et al. The 4G/5G sequence polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) gene: relationship to plasma PAI-1 level in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1998; 79 (5): 975-979.
108. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation.* 1997 Jan 7;95(1):59-62.
109. Zöller, B., Garcia de Frutos, P. & Dahlbaeck, B. A common 4G allele in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene as a risk factor

for pulmonary embolism and arterial thrombosis in hereditary protein S deficiency. *Thrombosis and Haemostasis* 1998; 79: 802-807.

110. Segui R, Estelles A, Mira Y, et al. PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *British Journal of Haematology* 2000; 111: 122-128.
111. Bova I, Chapman J, Sylantiev C et al. The A677C methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and carotid atherosclerosis. *Stroke* 1999; 30: 2180-2182.
112. Lipay NV, Dmitriev VV, Borisenok MB. Thrombotic complications during cancer treatment in children. *Exp Oncol.* 2007 Sep;29(3):231-35.
113. Schiavon G, Vincenzi B, Santini D, Avvisati G, Tonini G. Recurrent thrombophlebitis in a colon cancer patient with C677T heterozygous genotype for MTHFR treated with 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Chemotherapy.* 2004 Oct;50(4):194-5.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. İsmail KOÇYİĞİT'e ait "Kanserli Hastalarda, Tromboz Gelişmesinde Faktör-V Leiden, Metilentetrahidrofolat Redüktaz, Protrombin Ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip 1 Polimorfizmlerinin Rolü" adlı uzmanlık tezi, jürimiz tarafından İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 10... / 09.. / 2008

İmza

Başkan :

Prof. Dr. Abdülkadir

Üye :

Prof. Dr. Kadri Giver

Üye :

Doç. Dr. Metin Özkan

Üye :

Doç. Dr. Nurettin Görgü

Üye :

Yrd. Doç. Dr. M. Tugrul