

T.C.
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları ABD

**ANTİFOSFOLİPİD SENDROMUNDA
P-SELEKTİN POLİMORFİZMİ İLE
TROMBOZ RİSKİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Dr Nilüfer Alpaz
İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi
İstanbul, 2009

**ANTİFOSFOLİPİD SENDROMUNDA P-SELEKTİN
POLİMORFİZMİ İLE TROMBOZ RİSKİ ARASINDAKİ
İLİŞKİ**

Dr Nilüfer Alpay
İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meliha Nalçacı

İstanbul, 2009

Bu tezde birlikte yola çıktığımız çalışmalarımıza yön veren, ben ve birçok asistan arkadaşımın örnek aldığı Prof Dr Reyhan Diz-Küçükaya 'ya, tezimin danışmanlığını yapan yanımda olmasından huzur duyduğum Prof. Dr. Meliha Nalçacı 'ya, Moleküler hematoloji laboratuvarındaki çalışmalarından dolayı Uzman Biyolog Veysel Hançer 'e ve tüm Hematoloji Laboratuvarı çalışanlarına, Öğrenciliğimden itibaren birlikte çalışabilmenin onur verdiği, hematolojiye ilgimin artmasına sebep olan, ilk klinik çalışmamda ve tüm asistanlık dönemimde öğrettikleri nedeniyle hayat boyu minnettar kalacağım Doç Dr. Selim Yavuz 'a, İç Hastalıkları yoluna çıkmama sebep olan ve o yolda duruşuna hep hayran kaldığım Prof. Dr. Tefik Ecdar 'e, Hematolojiye dair olanların yanı sıra hayata dair öğretilerini de esirgemeyen Dr. Hüseyin Keskin 'e, Eğitimimde büyük katkıları olan,engin bilgilerinden her konuda faydalandığım, zor anlarımda benim ve tüm diğer asistan arkadaşlarımın kuşkusuz yanında olacağını bildiğimiz İç Hastalıkları Anabilim dalı Başkanı Prof. Dr. Kerim Güler 'e ve tüm diğer değerli hocalarıma, Asistanlığımı keyifli kılan, birlikte her anımızın anlam kazandığı, aynı kaderi paylaştığım ve çok sevdiğim asistan arkadaşlarıma, burada olmamın asıl nedeni babama ve canım aileme

Çok teşekkür ederim....

KISALTMALAR

AFS: Antifosfolipid sendromu

β 2 GPI : β 2 glikoprotein I

AKLA: Antikardiyolipin antikorları

SLE: Sistemik lupus eritematozis

LA: Lupus antikoagulanı

AFS: Antifosfolipid antikorları

EGF: Endotelyal büyüme faktörü

sP-selektin: 'soluble' P-selektin

PSGL-1: P-selektin glikoprotein ligand-1

TF: Doku Faktörü

TNP: Tek nükleotit polimorfizmi

SVO: Serebrovasküler olay

AMI: Akut miyokart infarktüsü

DVT: Derin ven trombozu

PE: Pulmoner emboli

CI: Güven aralığı

OR : Odds oranı

ICAM-1: intraselüler adezyon molekülü-1

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
A- Giriş	
A.1. Antifosfolipid sendromu	
A.1.1. Tanım	6
A.1.2. Antifosfolipid antikorları ve tromboz	10
A.1.3. Epidemiyoloji	12
A.1.4. Antifosfolipid sendromunda tedavi	13
A.2. P-selektin molekülü	
A.2.1. Tanım	14
A.2.2. P-selektinin trombozla ilişkisi	15
A.3. Genetik polimorfizmi genel bilgi	17
A.4. Çalışmanın amacı	18
B- Materyal ve Metod	
B.1. Olgular	19
B.2. Normal sağlıklı bireyler	20
B.3. Metod	20
B.3.1. P-selektin polimorfizminin araştırılması	20
B.3.2 İstatiksel analiz	21
C- Sonuçlar	
C.1.Olgular	
C.1.1 Trombozlu AFS grubu	21
B.1.2 Tromboz gelişmemiş AFA pozitif olgular	22
C.2. P-selektin polimorfizmi sonuçları	23
D- Tartışma	26
E- Özet	32
F- Kaynaklar	34

A. GİRİŞ

A. 1. ANTİFOSFOLİPİT SENDROMU

A. 1. 1. Tanım

Antifosfolipid Sendrom (AFS) edinilmiş otoimmün bir trombofili formudur (1). Önemli mortalite, morbidite sebebi olan trombotik olaylar ve gebelik kayıpları ile ilişkilidir. Yüzyıl kadar önce hastalık fark edilmeye başlansa da AFS ifadesi ilk kez 1987 yılında kullanılmıştır (2). Arteriyel ve/ veya venöz trombozu olan ya da gebelik kaybı olan hastalarda bazı spesifik antikorların gösterilmesiyle AFS tanısının konulabilir. Tablo-1 de görülen Harris kriterleri olarak adlandırılan klinik ve serolojik kriterler, 1990 yılından itibaren tanı koymada klinisyenlere yardımcı olmaya başlamıştır (3).

Tablo-1: Harris Kriterleri*

Klinik Kriterler	Serolojik Kriterler**
1) Venöz tromboz	1) Orta veya yüksek pozitif anti-kardiolipin IgG veya IgM antikorlarının pozitifliği
2) Arteriyel tromboz	2) Lupus antikoagülanı varlığı
3) Tekrarlayan fetüs kaybı	
4) Trombositopeni	

*AFS tanısı için en az bir klinik ve bir serolojik bulgu olmalıdır.

** Serolojik testlerin en az üç ay arayla iki kez pozitif bulunması gerekir.

Klinik kriterler arasında bahsi geçen trombozlar değişik büyüklükte pek çok damarı ilgilendirebilir ve farklı kliniklerle ortaya çıkabilir (Tablo-2).

Bu geniş klinik spektrumu ile birlikte AFS; hematoloji, romatoloji, immünoloji, obstetrik ve jinekoloji, nöroloji, kalp-damar cerrahisi, kardiyoloji, radyoloji ve moleküler biyoloji başta olmak üzere çeşitli disiplinleri ilgilendirmekte ve özellikle son yıllarda sayıları artan birçok araştırmaya konu olmaktadır. Söz konusu çalışmaların ışığında 1998'de Japonya'nın Sapporo kentinde toplanan '8th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies' adlı sempozyumda, AFS sınıflama kriterleri değiştirilmiştir (4).

Tablo-2: AFS'de klinik özellikler

Sistem	Semptom ve Klinik Bulgular
Kardiovasküler	AMI, angina pectoris, kalp kapak anomalileri, kalp kapaklarında vejetasyonlar, non bakterial trombotik (Libman Sacks) endokarditi, ateroskleroz, periferik damar hastalığı, miyokardit, claudicatio intermittens
Arteriyel sistem	Büyük, orta ve küçük boyutlarda arterlerde trombozlar görülebilir
Venöz sistem	Büyük, orta ve küçük boyutlarda venlerde trombozlar görülebilir
Nörolojik	Geçici iskemik atak, SVA, kore, konvülziyon, multi-infarakt demans, transvers miyelit başta olmak üzere spinal sendromlar, ensefalopati, migren, Sneddon sendromu, pseudo-tümör serebri, serebral venöz tromboz, mononöritis multipleks, amorozis fugaks
Obstetrik	Gebelik kaybı, intrauterin büyüme-gelişme geriliği, HELLP sendromu, oligohidroamnioz, preeklampsi-eklampsi, utero-plasental yetersizlik, infertilite
Hematoloji	Trombositopeni, otoimmün hemolitik anemi, trombotik trombositopenik purpura, hemolitik üremik sendrom,
Dermatolojik	Reynaud fenomeni, livedo retikularis, yüzeysel tromboflebit, splinter hemorajiler, bacak ülserleri, ciltaltı nodüller, mavi parmak sendromu, akrosiyanoz, cilt infarktları
Oftalmolojik	Retinal arter trombozu, retinal ven trombozu,
Gastrointestinal	Budd-Chiari sendromu, hepatik infarkt, intestinal infarkt, iskemik kolit, pankreatit, intestinal veno-oklüzif hastalık, hepatik veno-oklüzif hastalık
Endokrin	Adrenal yetersizliği, testis infarktüsü, prostat infarktüsü, hipofiz nekrozu ve yetersizliği
Pulmoner	Pulmoner emboli, pulmoner hipertansiyon, pulmoner alveoler kanama, sıkıntılı solunum sendromu, fibrozan alveolit
Renal	Renal ven trombozu, renal arter trombozu, hipertansiyon, akut böbrek yetersizliği, kronik böbrek yetersizliği, proteinüri, hematüri, nefrotik sendrom
Diğer	Psikoz, kognitif bozukluklar, kemik infarktları, avasküler nekroz

Bu sınıflamada trombotik komplikasyonlar ve ayrıntılı olarak belirlenen gebelik komplikasyonları klinik kriterler olarak ele alınıp, laboratuvar kriterleri aynı kalmıştır (Tablo-3).

Tablo-3: 1998 Sapporo Kriterleri *

Klinik Kriterler

- 1) **Tromboz:** Herhangi bir doku veya organda arteriyel, venöz veya küçük damar trombozuna yol açan bir veya daha fazla klinik atak olması,
- 2) **Gebelik morbiditesi:**
 - a) Bir veya daha fazla sayıda, 10. gestasyon haftası ve daha ileri dönemde, morfolojik olarak normal olduğu ultrason veya direkt muayene ile gösterilmiş fetüs kaybı,
 - b) Ağır preeklampsi, eklampsi veya plasental yetersizlik nedeniyle 34. gestasyon haftası veya daha ileri dönemde, morfolojik anomalisi olmayan, bir veya daha fazla prematüre doğum olması,
 - c) Üç veya daha fazla sayıda 10. gestasyon haftasından önce açıklanmayan spontan düşüklüklerin olması (kromozom anomalisi, annede hormonal veya anatomik bir patoloji saptanmamalı)

Laboratuvar Kriterleri

- 1) **Orta veya yüksek titrede antikardiolipin IgG veya IgM antikorlarının pozitifliği**** Testlerin $\beta 2$ glikoprotein I ($\beta 2$ GPI)'e bağımlı standart ELISA yöntemiyle araştırılması gereklidir.
- 2) **Lupus antikoagülanı pozitifliği**** . ISTH kriterlerine göre:
 - a) Fosfolipide bağımlı pıhtılaşma testlerinin (tarama testleri: aktive parsiyel tromboplastin zamanı, kaolin pıhtılaşma zamanı, sulandırılmış Russell's viper venom zamanı, sulandırılmış protrombin zamanı, textarin zamanı) uzamış olması
 - b) Tarama testinin, trombositten fakir normal plazma ile karışım yapıldığında düzelmemesi,
 - c) Tarama testinin fosfolipid ekleme testi ile kısalması veya normalleşmesi,
 - d) Başka koagülopatilerin (örneğin FVIII inhibitörü veya heparin kullanımı) dışlanması gereklidir.

*Tanı için en az bir klinik ve bir laboratuvar kriter olmalıdır,

**En az 6 hafta arayla, 2 veya daha fazla ölçümde pozitif bulunmaları gereklidir.

Bu kriterlere göre, bir klinik ve bir laboratuvar bulgusu olan hastalar 'kesin AFS' olarak tanımlanmaktadır. Trombositopeni klinik kriterler olmaktan çıkarılmıştır. Trombositopeni, hemolitik anemi, geçici serebral iskemi, transvers miyelopati, livedo retikularis, kalp kapak hastalığı, multipl skleroz-benzeri sendrom, kore ve migren kliniği destekleyici bulgular olarak kabul edilmiştir. Anti- β 2 GPI antikorları, antikardiyolipin antikorları (AKLA) IgA antikorları, düşük titrede AKLA IgG veya IgM antikorları ve diğer antifosfolipid antikorları (anti-protrombin antikorları, anti-annexin antikorları, vb) laboratuvar kriterlere dahil edilmemiştir. Bu sınıflamaya göre sadece trombositopenisi olan AFA-pozitif olgular kesin AFS olarak kabul edilmeyerek, 'olası AFS' hastaları olarak adlandırılmışlardır.

Bu kriterlerin yayımlanmasından kısa bir süre sonra AFS iki farklı kategoriye ayrılmıştır. Eğer sistemik lupus eritematozis (SLE) ya da başka bir sistemik otoimmün hastalığa eşlik ediyorsa sekonder AFS, böyle bir birliktelik yoksa primer AFS olarak tanımlanmıştır (5, 6). 1990 yılların başında bazı AFS olgularının kısa süre içerisinde ölümle sonuçlanan agresif hastalığa sahip oldukları görülmüştür (7, 8). Önceleri 'okluziv vaskülopati' (8) ve 'dissemine vaskülopati koagülopati' (9) olarak ifade edilen bu klinik form ise günümüzde 'Katastrofik AFS olarak adlandırılmaktadır (7).

Tablo-4: AFS ile ilişkili klinik durumlar

Kalp kapak anormallikleri: Kapaklarda hafif kalınlaşmadan Libman-Sachs Endokarditine kadar çeşitlilikte bulgular
İnme ile birlikte olmayan nörolojik bulgular: Kore, duyu kaybı, bilişsel fonksiyonların azalması, transvers myelit, demiyelinizan hastalık benzeri multifokal iskemik alanlar
Livedo retikularis, deri ülserleri, deri nekrozları
Otoimmün trombositopeni
Otoimmün hemolitik anemi

Sapporo kriterleri yayımlandıktan yedi yıl sonra iki yılda bir Sidney, Avusturya'da toplanan 'Uluslar arası Anifosfolipid Antikor Sempozyumu' Sapporo kriterlerinde bazı değişiklikler yapılmıştır (10). Anti β 2 glikoprotein I antikorlar pozitifliği laboratuvar kriterlerine eklenip laboratuvar testlerinin tekrarı için belirtilen 6 haftalık süre 12 haftaya çıkarılmıştır. Primer AFS ile sekonder AFS'nin klinik ve laboratuvar özellikleri bakımından

farklılık göstermediğine dair yapılan çalışmalara dikkat çekilmiştir (11). Sekonder AFS tanımlaması yerine AFS'nin ilişkili olduğu hastalıkla anılması tercih edilmiştir (ör: SLE ile ilişkili AFS, romatoid artrit ile ilişkili AFS).

Tüm bu çalışmalara rağmen AFS tanısında halen güçlük oluşturabilecek durumlar söz konusu olabilmektedir. Tromboz gösterilememiş olsa da Tablo-4'te gösterilen bazı klinik durumların AFS ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Diğer bir sorun ise başka klinik durumlarla ilişkili AFA pozitifliğidir. AFA saptanabilen diğer klinik durumlar Tablo-5'te özetlenmiştir. Sadece AFA pozitifliği olan olgularda tromboz riskinin belirlenmesi ve uygun tedavi seçimi ise halen tartışılan konulardır.

Tablo-5 AFA görülebilen diğer klinik durumlar

İnfeksiyonlar	Hepatit C HIV Sifiliz	HTLV-1 Malarya
İlaçlar	Fenotiazin Prokainamid Propranolol Amoksisilin	Fenitoin Kinidin α -interferon Hidralazin
Diğer klinik durumlar	Non-Hodgkin Lenfoma Akut Miyeloid Lösemi Orak Hücreli Anemi	Paraproteinemiler Karsinom

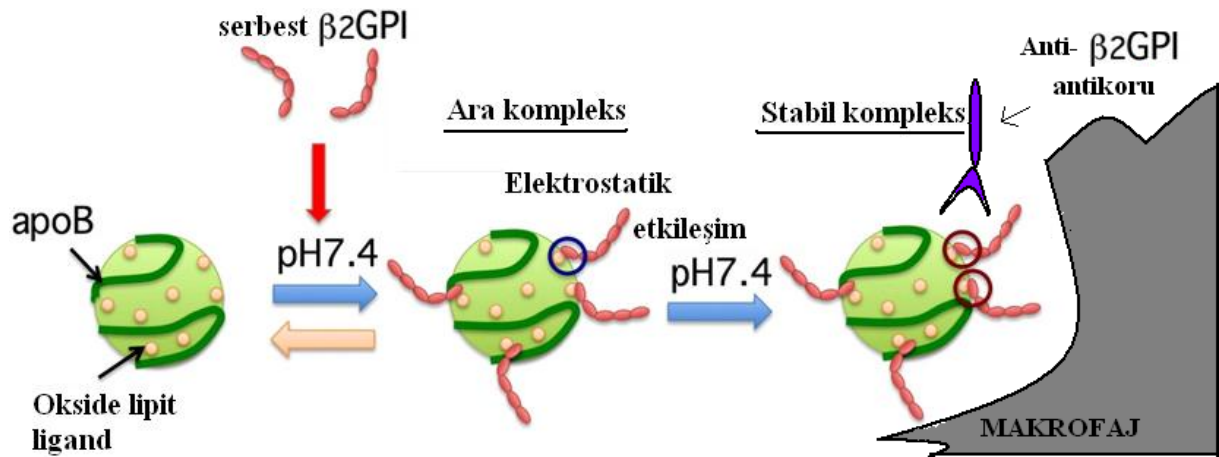
A. 1. 2. Antifosfolipid antikolları ve tromboz

AFA sadece fosfolipidleri değil aynı zamanda fosfolipidlere bağlanan β 2GPI ve protrombin gibi plazma proteinlerini de hedef alan, organizmada immun-aracılı değişik mekanizmalarla tromboza sebep olan antikollardır (11,12). AFA ilk defa sifiliz hastalarında gösterilmiştir (13,14). Daha sonra LA ve AKLA tanımlanmıştır (15-17). AKLA'nın kardiolipine bağlanabilmesi için β 2 GPI adlı bir kofaktörle bağlanması gerektiği anlaşılmıştır. β 2 GPI'in dolaşıma giren negatif yüklü molekülleri nötralize eden ve bu şekilde pıhtılaşma sisteminin gereksiz aktivasyonunu engelleyen bir madde olduğu öne sürülmektedir (18). Fosfolipidler tek başına zayıf immünojen etkiye sahip olduğundan, β 2 GPI'in kardiolipine

bağlanarak yeni bir antijenik yapı (neo-epitop) oluşturduğu, bu şekilde fosfolipid yapının immünojenitesini arttırdığı ileri sürülmüştür (19). Başlangıçta sadece antikardiolipin antikorlarının β -2 GPI aktivitesine ihtiyaç duyduğu ileri sürülse de, daha sonra bazı lupus antikoagülanı aktivitesi gösteren antikorların β 2 GPI'e bağımlı olabildiği gösterilmiştir (20,21). Bazı vakalarda ise LA etkisi yaratan antikorların kofaktör olarak protrombini kullandığı gösterilmiştir (22,23). Daha sonra anti-protrombin antikorları (24), 'zwitterionik' fosfolipidlere (örneğin fosfatidil etanolamin) karşı antikorlar ve diğer negatif yüklü fosfolipidlere karşı oluşmuş antifosfolipid antikorları tanımlanmıştır (25-27).

Tüm bu antikorların rol oynayabildiği tromboembolik süreç AFS'nin temel sorunudur. Bu tromboembolik süreci oluşturan mekanizmalardan bir tanesi AFA'nın endotel hücrelerini aktive etmesi ile ilgilidir. AFA'nın endotelden pro-adezif ve pro-inflamatuar maddelerin salınımını arttırdığı (28-33), doku faktörü salınımını indüklediği (34,35), apoptozu indüklediği (36), endotelin salınımını arttırdığı (37), anneksin V'in prokoagülan etkisini arttırdığı (38) gösterilmiştir. Diğer taraftan AFA'nın protein C ve S'i kofaktör olarak kullandığı ve inhibe ettiği (39-42), edinsel APC direncine neden olduğu (43-45) anneksin V çatısını bozduğu (46), antitrombini inhibe ettiği (47,48) bildirilmiştir. Trombositlerin aktivasyonunu sağladığı ve agregasyonunu indüklediği (49-54) gösterilmiştir. AFA'nın eikazonoid metabolizmasıyla etkileşmesi ile endotelden prostasiklin yapımının azaldığı, trombositlerden ise tromboksan A2 üretiminin arttığı; bu şekilde tromboksan/prostasiklin oranının belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (55-58). AFA'nın fibrinolitik mekanizmaları bozduğuna dair yayınlar mevcuttur (59).

Şekil-1: β 2GPI ile okside LDL molekülü arasındaki etkileşim.



Son yıllarda β 2GPI'nin okside LDL'e bağlandığı anlaşılmıştır (60). İnsanlarda ve deney hayvanlarında aterosklerotik lezyonlarda okside LDL bulunmaktadır. Okside LDL, bulunduğu aterosklerotik plağa makrofaj ve T lenfositleri çekerek inflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açmakta bu durumda endotel üzerinde sitotoksik etki göstermektedir (60). β 2GPI, okside LDL'e bağlanarak kolesterol esterlerini stabilize eder (Şekil-1). Okside LDL ve β 2GPI kompleksi AFS hastalarında anti β 2GPI'nin hedef kompleksidir (61,62). Böylece oluşan antijen-antikor kompleksi makrofaj tarafından fagosite edilir, bu fagositoz neticesinde ortama sitotoksik maddeler salınır ve aterosklerotik plak yapısı bozularak trombotik süreç başlar.

A. 1. 3. Epidemiyoloji

Genç erişkin sağlıklı denekler üzerinde yapılan çalışmalar LA ve AKLA pozitifliğinin %1-5 civarında olduğunu göstermektedir (63). Bu oran yaş ilerledikçe ve kronik hastalık varlığında artmaktadır. SLE hastalarında ise LA pozitifliği %15-30, AKLA pozitifliği ise %86'a kadar çıkmaktadır (64). SLE hastalarının %30'una AFS tanısı konulmaktadır.

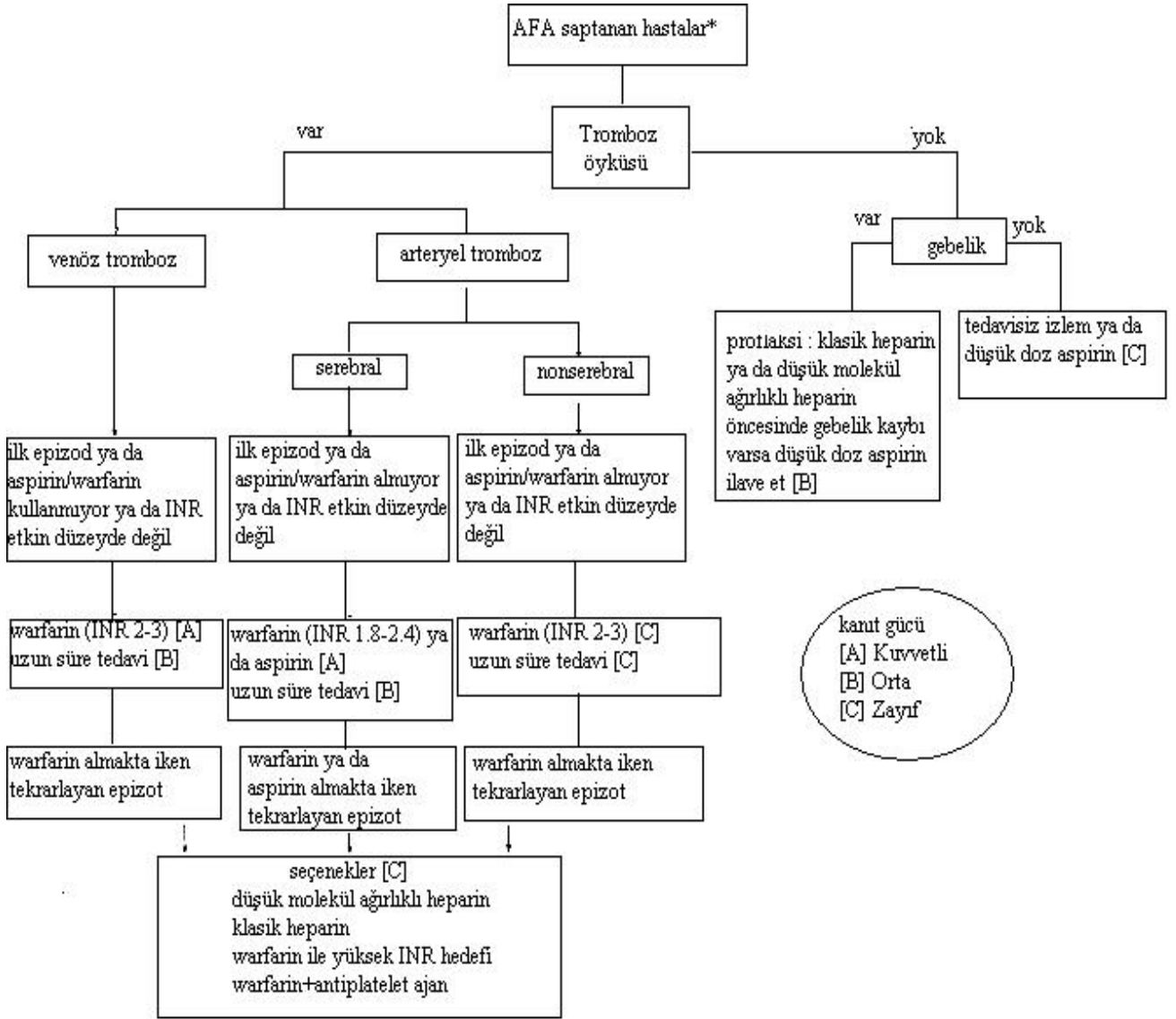
Gebe kadınlarda normal durumda gebeliğin dönemine göre değişen AFS antikör pozitifliği görülebilir (65). Normal bir gebelikte %1-6 oranında LA (66), %2-7 oranında AKLA saptanabilmektedir (67). AFS hastalarında tekrarlayan gebelik kaybına % 15 oranında rastlanılmaktadır (68).

A. 1. 4. AFS' de Tedavi

AFS tanısı konulan olgularda akut trombozların uygun antitrombotik tedavisinin yanı sıra tromboz tekrarını önlemek de mortalite ve morbidite oranlarını azaltmaktadır. Eğer AFA pozitifliğine eşlik eden herhangi bir AFS bulgusu (düşük, preeklampsi, tromboz, trombositopeni, livedo retikularis vb), bağ dokusu hastalığı yoksa veya kalp kapak bozukluğu ve kognitif disfonksiyon gibi AFA ile ilişkili olabilecek herhangi bir durum söz konusu değil ise tedavi önerilmemektedir (69,70). Ancak bazı araştırmacılar, bu bulgunun henüz trombotik bir atak geçirmemiş hastanın erken farkedilmesi olarak yorumlayıp cerrahi girişim, gebelik ve puerperal dönem gibi yüksek risk durumlarında tromboz profilaksisi önermektedir (71). Profilakside hangi ajanın (antiagregan-antikoagülan), ne dozda ve ne kadar süre kullanılması gerektiği konusunda kontrollü bir çalışma yoktur. Tesadüfen AFA-pozitif saptanan bir

kadında oral kontraseptif veya hormon replasman tedavisi yapılmasında bir sakınca olup olmadığı da açık değildir.

Şekil-2: AFA saptanan hastalarda uygulanacak antitrombotik tedavi şeması



* Geçici olarak AFA saptanan olgularda durum belirsizdir.

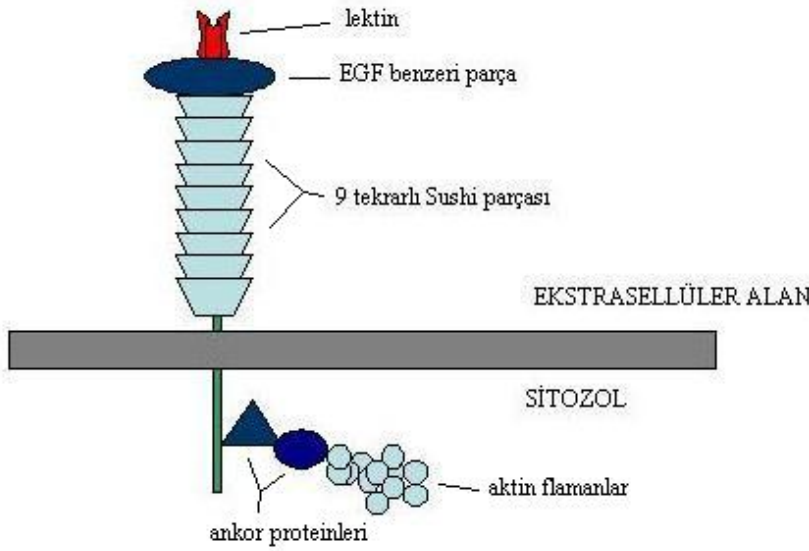
AFA-pozitif olup tromboz dışında AFS kriterlerini dolduran (tekrarlayan düşükleri olan) veya SLE gibi bir bağ dokusu hastalığı olan olgularda profilaksi gerektiği kabul edilmekle beraber nasıl yapılacağı tam olarak netleşmemiştir. AFA-pozitif, gebelik kaybı olan kadınlarda gebelik sırasında aspirin, düşük molekül ağırlıklı heparin, aspirin+düşük molekül ağırlıklı heparin tedavisi önerilmektedir. Riskli dönemler dışına bu hastalarda tedavi konusu tartışmalıdır. AFS’de AFA sürekli pozitif olduğu halde trombotik atakların epizodik oluşu, bazı hastalarda sadece tekrarlayan düşükler veya trombositopeni ile seyretmesi, bazılarında ağır arteriyel veya venöz tromboz atakları olması, bazılarında ise antikor pozitifliği yıllarca devam ettiği halde hiçbir klinik bulguya neden olmaması tromboz gelişimini etkileyen başka edinsel ve kalıtsal risk faktörlerinin olduğunu düşündürmektedir. Hastanın taşıdığı tromboz riskinin belirlenmesi, hangi dozda ne kadar süre antitrombotik tedavi uygulanacağı sorusunu cevaplamada yardımcıdır. Son yıllarda AFS hastalarında ya da AFA saptanan hastalarda tromboz riskini değerlendirmeye yönelik bir çok çalışma yapılmaktadır. Gen teknolojisindeki ilerlemelerle birlikte hızlanan genetik risk faktörlerini belirlemeye yönelik çalışmalar da önem taşımaktadır (72). AFA saptanan hastalarda uygulanacak antitrombotik tedavi algoritması Şekil-2’de gösterilmiştir (73).

A. 2. P-SELEKTİN MOLEKÜLÜ

A. 2. 1. Tanım

Selektinler, lökositlerin aktive olmuş endotel hücreleri ve aktif trombositler ile temasında önemli rol oynayan yüzey adezyon molekülleridir. E-selektin başlıca endotel hücreleri üzerinde, L-selektin başlıca lökositlerde, P-selektin ise endotel hücreleri ve trombositler üzerinde eksprese edilmektedirler. Aktifleşen trombositler üzerinde antikorların yardımıyla yaklaşık 13.000 P-selektin molekülü tespit edilebilir (74). P-selektin glikoprotein yapıdadır. NH₂-terminal C-tipi lektin parçası, endotelyal büyüme faktörü (EGF) benzeri parça, 9 tekrarlı ‘Sushi’ parçası, transmembran bölüm ve intrasitoplazmik kuyruk bölümünden oluşur (Şekil-3). P-selektin trombositlerin alfa granüllerinde ve endotel hücrelerinin Weibel Pallade cisimciklerinin içinde depolanır, aktivasyonu takiben membranda eksprese edilir. İnsan ve fare plazmalarında transmembran parçası eksik yapıda ‘soluble’ (çözülebilir) P-selektin (sP-selektin) saptanabilmektedir (75). P-selektin inflamasyon veya travma sonrasında aktiflenen endotel hücrelerinde eksprese edildiğinde, lökositlerin endotel üzerinde yuvarlanmasını, trombositler üzerinde eksprese edildiğinde tromboz alanına lökositlerin toplanmasını sağlar (76). P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) P-selektinin

nötrofil, monosit, lenfosit ve küçük miktarda trombositler üzerinde bulunan yüksek afiniteli reseptörüdür (75).



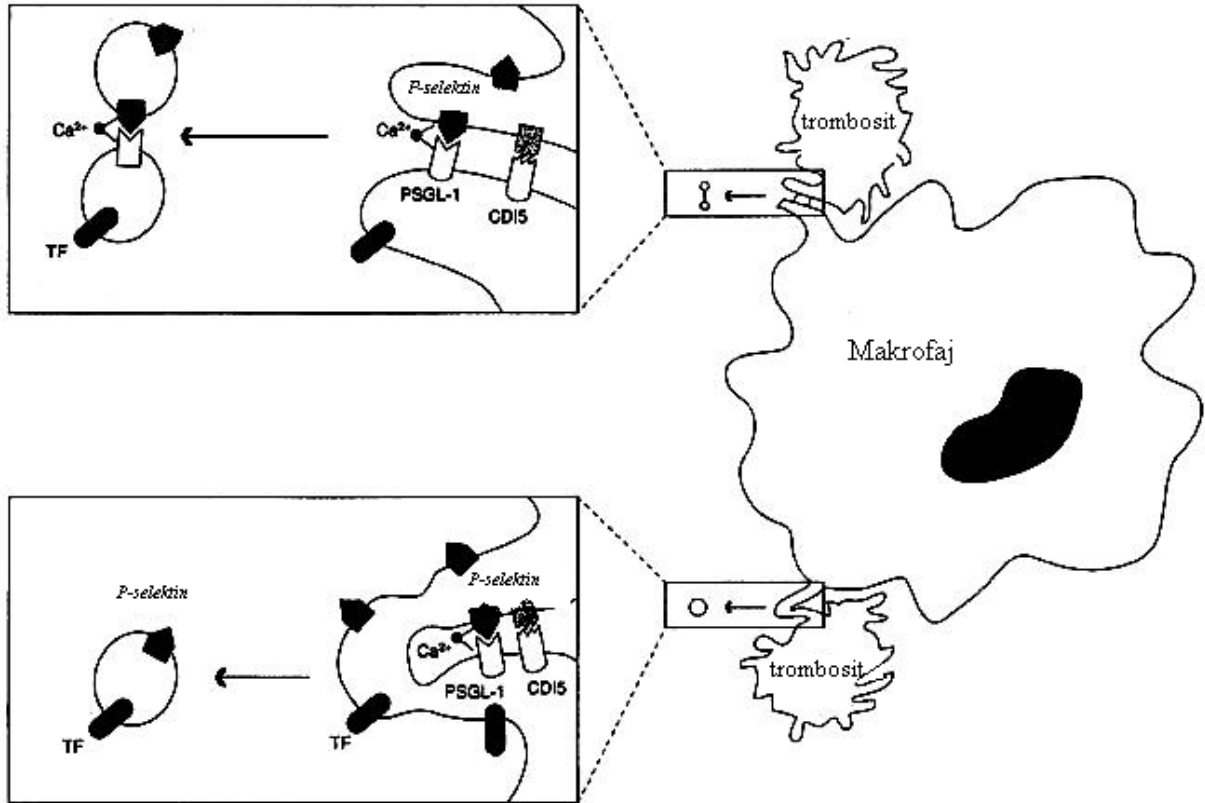
Şekil-3
P-selektin molekülünün
şematik görünümü

A. 2. 2. P-Selektinin Trombozla ilişkisi

Koagülasyon sisteminin aktivasyonunda doku faktörü önemli rol oynar. Yakın zamana kadar kanda doku faktörünün olmadığı, ancak doku hasarı ile ortaya çıkabildiği ve ekstresek pıhtılaşma sisteminin bu şekilde aktive olduğu düşünülmüştür. Kanda doku faktörünün bulunduğu ancak 1990'ların sonunda gösterilebilmiştir. Monosit ve lökositlerde doku faktörünün mRNA'sının bulunması ile inflamasyon ve koagülasyon arasındaki ilişki yeniden yapılanmaya başlamıştır. Daha önce hücrel debris olarak yorumlanan mikroveziküller ile ilgili yeni çalışmalar doku faktörünün kanda taşınmasında monosit kaynaklı mikroveziküllerin önemli rol oynadığını göstermiştir. Bu çalışmaların sonucunda koagülasyon sisteminin aktivasyonu şu şekilde açıklanmaktadır: Doku hasarı olsun olmasın endotel hücreleri ve trombositler aktive olduğunda trombositlerin adezyonu ve agregasyonu ile primer tıkaç oluşturulmaktadır. Aktif trombositler ve endotel hücrelerinin eksprese ettiği P-selektin; monositler, nötrofiller ve monosit kaynaklı mikroveziküllerde bulunan PSGL-1 reseptörüne bağlanmaktadır. Bu bağlanma ile monosit ve monosit kaynaklı mikroveziküllerden doku faktörü açığa çıkmaktadır (Şekil-4).

Bu yeni bilgiler trombozun gelişiminde P-selektin/ PSGL-1 ilişkisinin önemini arttırmaktadır. Oluşan sinyaller tromboz ve inflamasyonda önemli moleküllerin ekspresyonunu başlatır. Bağlanma sonrası meydana gelen sinyallerin doku faktörü ekspresyonuna neden olması, in vivo koagülasyon sisteminin aktivasyonu ile sonuçlanır. Trombositlerde β -integrinlerin aktivasyonu trombositlerin agregasyonunu güçlendirir. Bağlanma ayrıca değişik inflamatuvar mediatörlerin ekspresyonuna (monosit kemotaktik protein MCP-1, interlökin-8, tümör nekroz faktörü TNF- α), süperoksit anyon radikallerin oluşmasına ve lökositlerde α M β 2 integrinlerin (MAC-1) aktivasyonuna neden olur; trombotik ve inflamatuvar yanıt güçlenir. Hayvan tromboz modellerinde trombüs oluşturacak endotel hasarı yapıp trombüs gelişimi mikroskop altında incelenmektedir. Gerek P-selektin, gerekse PSGL-1 monoklonal antikolarla bloke edildiğinde trombositlerin primer tıkaçı oluşturduğu ancak fibrin oluşmadığı gösterilmiştir (76-79).

Şekil-4*: Trombositler üzerindeki P-selektin molekülü ile makrofaj üzerindeki PSGL-1'in birleşmesi ile doku faktörü taşıyan mikroveziküllerin oluşması. (TF: Doku faktörü)



* Landes Bioscience'den alınmıştır

P-selektinin hayvan modellerinde tromboz ile ilişkisinin gösterilmesinin ardından, plazma sP-selektin düzeylerinin trombozlu hastalarda arttığı bulunmuştur (80). Çeşitli P-selektin polimorfizmlerinin, P-selektin düzeyini etkileyerek ya da etkilemeden artan tromboz riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (81). SLE'li hastalar üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde ise P-selektin polimorfizmlerinin'nin SLE etyopatogenezinde rol oynayabileceğini göstermiştir (82). Şimdiye kadar primer AFS hastalarında P-selektin polimorfizmlerinin sıklığı ve etkilerini araştıran bir çalışma yayımlanmamıştır.

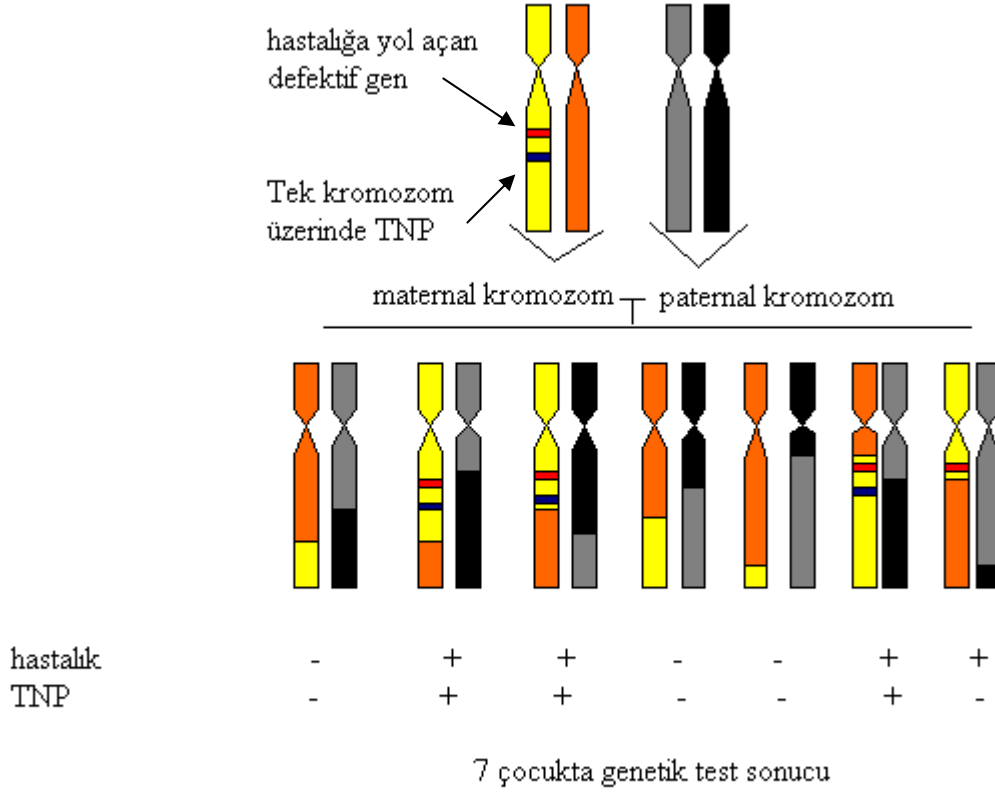
A. 3. GENETİK POLİMORFİZM: GENEL BİLGİ

Bir insanın DNA'sı yaklaşık 3 milyar nükleotitten oluşur. Ancak, genomun sadece % 1.5' inin protein ve RNA'ları şifreler (Coding bölge). Non-coding bölgelerde satellit DNA dediğimiz çok sayıda tekrarlar bulunmaktadır. Kodlayan bölgelerdeki genlerden çok sayıda proteinler oluşarak (translasyon) hücreleri ve bireyi meydana getirir. DNA üzerindeki genlerin allelik varyantları incelenirken tek nükleotit değişimlerine rastlanmıştır. Bu nedenle genomdaki bu tek nükleotit farklılıklarına tek nükleotit polimorfizmi (TNP) adı verilir. İnsan genom projesinin devam etmekte olan alt projelerinden (Genom kanser atlası, Encode projesi vs) biride TNP' lerin haritalanmasını amaçlayan HAP-MAP projesidir. Şu andaki bilgiyle rastgele iki insanın DNA'sında her 1000- 2000 nükleotidinden biri (A,T,G veya C) farklılık gösterebilir. TNP'nin hastalık ile ilişkisi Şekil-5'te şematize edilmiştir.

Haplotip grupları ise aynı kromozom üzerinde birbiri ile ilişkili TNP gruplarını ifade eder. Eğer özel bir haplotip, hastalıklı bireylerde sık sık karşımıza çıkıyorsa, o haplotipe yakın olan bir gen hastalığa neden oluyor olabilir. Kanser, kalp krizi, diyabet, depresyon ve astım gibi hastalıkların ortak yanı çok sayıda genetik varyant ve çevresel faktörden etkilenmeleridir. Bir hipoteze göre, toplumda yaygın olan bir hastalığa yakalanma riski, o toplumda daha sık görülen genetik varyantlar tarafından artırılmaktadır (83).

Herhangi bir hastalığın patogenezinde rol alan bir proteini kodlayan bölgeye yakın DNA bölgelerinde, hastalığı taşımayan popülasyona oranla anlamlı derecede yüksek oranda saptanabilecek polimorfizmlerin o hastalıkla ilişkili olabileceği söylenebilir. Bu polimorfizmler hastalığı kolaylaştırıcı olabileceği gibi hastalıktan koruyucu nitelikte de olabilir. Eğer bir polimorfizm hasta gruba oranla sağlık bireylerde daha sık görülüyorsa bu polimorfizmin o hastalıktan koruyucu olduğu söylenebilecektir.

Şekil-5: Tek nükleotit polimorfizminin bir sonraki kuşağa aktarımı ve hastalık ile ilişkisini gösteren aile örneği. Maternal kromozomda hastalık sebebi olan gen yaklaşık %60 oranda çocuklara aktarılmıştır. Bu aktarım %75 oranında işaretlenen TNP ile ilişkilidir. Eğer TNP daha uzak bir lokusta yer almış olsaydı, hastalık geni ile birlikte aktarım olasılığı azalacaktı.



TNP: Tek nükleotit polimorfizmi

A.4. ÇALIŞMANIN AMACI

Primer AFS olgularında tromboz hastalar için büyük bir sorundur. Morbidite ve mortalitenin artmasına sebep olmaktadır. Antikoagulan tedavinin kimlere ne zaman uygulanacağına doğru karar verebilmek hayat kurtarıcı olacaktır. O halde primer AFS hastalarında tromboz için risk faktörlerinin belirlenmesi önemlidir. Son yıllarda trombozda genetik risk faktörlerine yönelik çalışmaların sonuçları heyecan vericidir. Bu çalışmada, primer AFS hastalarında, bilinen P-selektin polimorfizmlerinden S290N, c.1087G>A;

D562N, c.1902G>A; T715P, c.2363A>C) polimorfizmleri araştırılacaktır. Bu polimorfizmler ile primer AFS'de tromboz riski arasında ilişki bulmak amaçlanmaktadır.

B. MATERYAL VE METOD

B.1. OLGULAR

İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından kabul edilen (2009/915- 03 sayılı toplantı) bu çalışmada hasta grubu İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı tarafından takip edilen olgular arasından seçilmiştir. Olgulardan çalışma öncesi bilgilendirilmiş onay alınmıştır. Çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından tez projesi kapsamında 3491 proje numarası ile desteklenmiştir

Hematoloji polikliniğinde kayıtlı 82 AFS hastası anamnez, fizik muayene ve laboratuvar verileri ile taranmıştır. Hastalardan 19'u sekonder AFS olduğundan, 11'i AFS tanı kriterlerini tam olarak karşılayamadığından, 12'sinde ise tromboza eğilim yaratan ek risk faktörü olduğundan (hiperlipidemi, hipertansiyon..vs) çalışma dışında bırakılmıştır. Sonuç olarak Sapporo kriterlerine göre 40 primer AFS tanısı konmuş ve arter ve/veya ven trombozu geçirmiş 24 olgu (trombozlu AFS grubu), en az 3 yıllık takipte trombotik komplikasyon geliştirmemiş AFA-pozitif 16 olgu (tromboz gelişmemiş AFA-pozitif grup) ve herhangi bir hastalık öyküsü olmayan normal sağlıklı bireyler dahil edilmiştir.

Kesin primer AFS tanısı konan olgularda trombotik komplikasyonlar doppler ultrasonografi, ventilasyon perfüzyon sintigrafisi, venografi, splenoportografi, manyetik rezonans anjiyografi, göz anjiyografisi, koroner anjiyografi, periferik anjiyografi ile teyit edilmiştir. Lupus antikoagülanı aktive parsiyel tromboplastin zamanı ve kaolin pıhtılaşma zamanı testleri kullanılarak taranmıştır. Test sonucu normalden uzun bulunan olgularda karışım testi yapılarak faktör eksikliği veya inhibitörü olmadığı gösterilmiştir. Fosfolipidlere bağımlılığı göstermek amacıyla trombosit kaynaklı fosfolipidler kullanılmış ve fosfolipid eklendiğinde testin düzeldiği gösterilmiştir. AKLA İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'da ELISA yöntemiyle bakılmıştır. AKLA IgG ve IgM için sırasıyla 40 GPL ve 40 MPL ünitesi ve üzerindeki değerler pozitif kabul edilmiştir.

B.2. NORMAL SAĞLIKLI BİREYLER

Bu gruba bilinen bir hastalığı ve tromboz eğilimi yaratacak herhangi bir risk faktörü olmayan, fizik muayeneleri normal 40 sağlıklı erişkin birey dahil edilmiştir. Bu bireylerin 24'ü kadın, 16'ı erkektir. Yaş ortalamaları $36 \pm 6,5$ 'dir.

B.3 METOD

Bu çalışmada olgu ve kontrol gruplarında P-selektin polimorfizmleri çalışılmıştır. Bütün işlemler İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı- Hematoloji Bilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

B.3.1. P-Selektin Polimorfizminin Araştırılması

Bu tetkikler DNA izolasyonu yapıp, PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. Olgu ve kontrol gruplarından 2 ml EDTA'lı venöz kan örnekleri alınarak periferik kandan DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu işleminde Roche Diagnostics- DNA izolasyon kiti kullanıldı. PCR işlemi 'MJ Research Thermal Cycler'da gerçekleştirildi. Ürünler ethidium bromid içeren agaroz jelde yürütüldü ve ultraviyole (UV) transilluminatörü üzerinde görüntülendi.

Daha önceki çalışmalarda (93,97) tanımlanmış olan üç adet tek nükleotit polimorfizmini (serin asparagine-S290N (c.1087G>A), aspartik asit asparagine-D562N (c.1902G>A), treonin proline -T715P (c.2363A>C) gösterebilmek için aşağıdaki allel spesifik primer dizileri kullanıldı:

- 1) 15 pmol 290N-R (5'- TAAATGAATTCAGTCCATGGTTCCTACAT-3'),
- 2) 5 pmol 290S-R (5'- CACAGTCCATGGTTCCTTGAC -3')
- 3) 11 pmol 290common (5'-TGTGTGGCTTTTCTCCTTTC -3')
- 4) 2 pmol 562D-R (5'-AATTGCCCTACCAGCTTAAAGCCG TAGTC-3'),
- 5) 7 pmol 562N-R (5'-CTCCAGCTTAAAGCCGTTCTT-3'),
- 6) 10.5 pmol 562common (5'-TGAATATATAAGTGAATGAAC TTTGTG-3'),
- 7) 3.5 pmol 715P-R (5'-CCT GCT TGA TAG GTT GCC ACG GAA GG-3')
- 8) 8 pmol 715T-R (5'-GCA GGT TGG CAC GGT TGT-3')
- 9) 9 pmol 715common (5'-CTG TGA AAT GCT CAG AAC TAC ATG-3')

Polimorfizm genotipleri S290N için; SS, SN (heterozigot varyasyon) ve NN (homozigot varyasyon), D562N için; DD, DN (heterozigot varyasyon) ve NN (homozigot varyasyon), T715P için; TT, TP (heterozigot varyasyon) ve PP (homozigot varyasyon) olarak belirlendi.

B.3.1.a PCR koşulları (25 µl 'lik reaksiyon için):

Steril su 17.5 µl, 10x PCR, buffer 2.5 µl, 25 mM MgCl 0.5 µl, 20 nM dNTP mix 1 µl, primer–reverse 1 µl, primer-forward 1 µl, taq DNA polymerase 0.5 µl (2.5 U), DNA 2 µl.

Bu karışım vortekslendi ve thermal cycler'a kondu. Thermal cycler'da 95 °C'da 45 saniye, 52 °C'da 1 dakika, 72 °C'da 1 dakika olmak üzere toplam 38 siklus hazırlandı. PCR ürünleri %2.5'luk agarozda yürütüldü. Uygun DNA işaretleyicisi kullanılarak alleler tanımlandı.

B.3.2. İstatistiksel Analiz

Trombozlu AFS grubu, trombotik komplikasyonu olmayan AFA pozitif olgular ve normal sağlıklı bireylerde elde edilen sonuçlar SPSS istatistik programı (Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey) 'na yüklendi. Oranlar ki-kare testi ile karşılaştırıldı. %95 Güven aralığı (Confidence Interval-CI), Odds oranı (Odds Ratio-OR) ve p değeri belirlendi. Parametrik verilerin iki grup arasındaki farklılıkları ise student t testi ile değerlendirildi. p değeri <0.05 olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.

C. SONUÇLAR

C.1.OLGULAR

C.1.1 Trombozlu AFS grubu:

Bu grupta AFS kriterlerini dolduran AFS ile ilişkili başka bir hastalığı olmayan 17 kadın 7 erkek yaş ortalamaları $39,5 \pm 10,3$ olan 24 olgu bulunmaktadır. Olguların klinik ve laboratuvar verileri Tablo-6 da özetlenmiştir.

Olguların 2'sinde hem arter hem de ven trombozu, 13'ünde sadece arter trombozu, 9'ünde sadece ven trombozu mevcuttur. Arter trombozlu olgularda ilk sırada serebrovasküler olay (SVO, serebral arteriyel tromboz) yer almaktadır (9 olgu), 2 olguda akut miyokart

infarktüsü (AMI), 1 olguda mezenter arter trombozu, 1 olguda dijital arter trombozu, 1 olguda 1 retinal arter trombozu, 1 olguda renal arter trombozu saptanmıştır. Venöz trombozlu hastaların 2'inde derin ven trombozu (DVT)+ pulmoner emboli (PE), 8'inde DVT, 1'inde retinal ven trombozu, 1'inde serebral sinüs trombozu, 1 olguda hepatik ven trombozu saptanmıştır.

Trombozlu toplam 24 olgunun 9'ünde düşük ve ölü doğum olmak üzere gebelik kaybı mevcuttur.

Trombozlu 24 olgunun 9'unda trombositopeni mevcuttur. Üç olguda ağır trombositopeni ($50.000/\text{mm}^3$ altında), 2 olguda orta derecede trombositopeni ($51.000-100.000/\text{mm}^3$), 4 olguda hafif trombositopeni ($101.000/\text{mm}^3$ üzerinde) saptanmıştır.

LA pozitiflik oranı % 54 ; AKLA pozitiflik oranı % 92 olarak bulunmuştur. AKLA IgG olguların % 79'sında, AKLA IgM % 54'sinde pozitif sonuçlanmıştır.

C.1.2. Tromboz gelişmemiş AFA-pozitif olgular:

Bu grupta 2 ay arayla en az 2 ölçümde AFA pozitif bulunan, en az 3 yıllık takipte herhangi bir trombotik komplikasyon geliştirmemiş 16 olgu yer almaktadır. Bu grubu oluşturan olguların tümü kesin AFS kriterlerini doldurmaktadır. Olgularda AFA pozitifliğine sebep olabilecek başka herhangi bir klinik durum (SLE ya da diğer romatolojik hastalıklar, infeksiyonlar, ilaç kullanımı ...vs) saptanmamıştır. Bu olgularda en az 2 kez AFA-pozitifliği gösterilmiştir. Olguların büyük bir kısmı düşük nedeniyle incelenen hastalardan oluştuğundan bu grupta kadın hakimiyeti belirgindir: kadın erkek oranı 15/1'dir. Ortalama yaş $39,2 \pm 8,2$ olarak bulunmuştur (Tablo 6).

Trombozu olmayan grupta toplam 12 olguda gebelik kaybı saptanmıştır.

Trombozu olmayan 16 olgunun 4'ünde trombositopeni mevcuttur. İki olguda orta derecede trombositopeni, iki olguda hafif trombositopeni, bir olguda ise ağır trombositopeni saptanmıştır.

LA pozitiflik oranı % 75; AKLA pozitiflik oranı % 92 olarak bulunmuştur. AKLA IgG olguların % 75'inde, AKLA IgM % 57'sinde pozitif sonuçlanmıştır.

Gebelik kaybı trombozu olmayan AFA pozitif olgularda anlamlı olarak yüksektir ($p:0,003$). Ancak bu durum trombozu olmayan AFA olgularının genellikle gebelik kaybı nedeniyle yapılan tetkikleri sonucunda tanı konulmasına bağlıdır. Trombozlu grupta AKLA IgG ortalama 49,1, IgM 21,7 bulunmuştur. Trombozu olmayan grupta ise AKLA Ig G 52,6, IgM ise 29,7 dir. AKLA IgG ve Ig M düzeyleri gruplar arasında farklılık göstermezken (p

değeri sırasıyla 0,80 ve 0,24) LA pozitifliği tromboz gelişmemiş grupta daha yüksek orandadır (p: 0,05).

Tablo-6 Trombozlu AFS grubu ve AFA-pozitif tromboz gelişmemiş olguların klinik ve laboratuvar bulguları

	Trombozlu AFS grubu	Tromboz gelişmemiş AFA-pozitif olgular	Toplam	P değeri
Olgu sayısı	24	16	40	-
Ortalama yaş	39,5±10,3	39,2±8,2	39,4±9,5	0,82
Kadın/erkek	17/7 (%71)	15/1 (%93)	32 (%80)	0,08
Gebelik kaybı	9 (%37)	12 (%75)	21 (%52)	0,003*
Trombositopeni	9 (%39)	5 (%31)	14 (%35)	0,43
Hafif	4 (%16)	2 (%13)	6 (%15)	0,35
Orta	2 (%8)	2 (%13)	4 (%10)	0,23
Ağır	3 (%12)	1(%6)	3 (%7)	0,43
LA pozitifliği	13 (%54)	12 (%75)	26 (%65)	0,05*
AKLA pozitifliği	22 (%92)	14 (%88)	36 (%92)	0,36
AKLA IgG	19 (%79)	11 (%69)	30 (%75)	0,26
AKLA IgM	13 (%54)	10 (%63)	23 (%57)	0,48
* istatistiksel olarak anlamlı p değeri				

C.2. P-SELEKTİN POLİMORFİZMİ SONUÇLARI

P selektin geni S290N, D562N ve T715P polimorfizmlerinin trombozlu ve trombozu olmayan AFS grupları ile kontrol grubu arasındaki dağılımı Tablo-7' de görülmektedir.

Hasta grubunda S290N polimorfizminin en sık rastlanılan genotipi SS'dir (%52). Bu oran istatistiksel olarak kontrol grubundan farklı değildir (p: 0,24). NN genotipine ise hasta grubunda rastlanmamıştır.

Tablo-7: Trombozlu AFS grubu ve AFA pozitif tromboz gelişmemiş olguların ve kontrol grubunun S290N, D562N ve T715P polimorfizimleri.

TNP	Rs numarası	Genotip	AFS n: 40	Trombozlu AFS n: 24	Trombozsuz AFS n: 16	Kontrol n: 40
S290N	rs6131 (G>A)	SS	21 (%52)	15 (%62)	6 (%38)	25 (%63)
		SN	19 (%48)	9 (%38)	10 (%62)	13 (%32)
		NN	Yok	Yok	Yok	2 (%5)
D562N	rs6127 (G>A)	DD	6 (%15)	2 (%8)	4 (%25)	8 (%20)
		DN	30 (%75)	21 (%88)	9 (%56)	17 (%42)
		NN	4 (%10)	1 (%4)	3 (%19)	15 (%38)
T715P	rs6136 (A>C)	TT	31 (%77)	18 (%75)	13 (%81)	32 (%80)
		TP	7 (%18)	5 (%21)	2 (%13)	8 (%20)
		PP	2 (%5)	1 (%4)	1 (%6)	Yok
<i>TNP: Tek nükleotit polimorfizmi, OR: Odds oranı, CI: Güven aralığı</i>						

S290N-SS, D562N-DN, T715-TT ve TP genotipleri trombozlu AFS grubunda trombozsuz AFS grubuna göre daha sık görülmektedir. Bu sıklıklardan istatistiksel olarak anlamlı olan sadece D562N-DN genotipidir (p:0,03). D562N-NN genotipi kontrol grubunda hasta grubuna oranla anlamlı olarak yüksek oranda iken, D562N-DN genotipi hasta grubunda daha yüksek orandadır (sırasıyla p:0,004 ve p:0,003). D562N-NN genotipi trombozsuz AFS ve kontrol grubunda benzer sıklıktadır ve bu genotipin trombozlu AFS grubundaki sıklığı kontrol grubundakinden anlamlı ölçüde düşüktür (sırasıyla p:0,21 ve p:0,003). Hasta ve kontrol grubu arasında S290N ve T715P polimorfizm sıklıkları farklı değildir. Tablo-8 de gruplar arası hesaplanan tüm p, OR ve CI değerleri, Şekil-6'da ise D562N-DN ve NN genotipinin sıklığı görülmektedir.

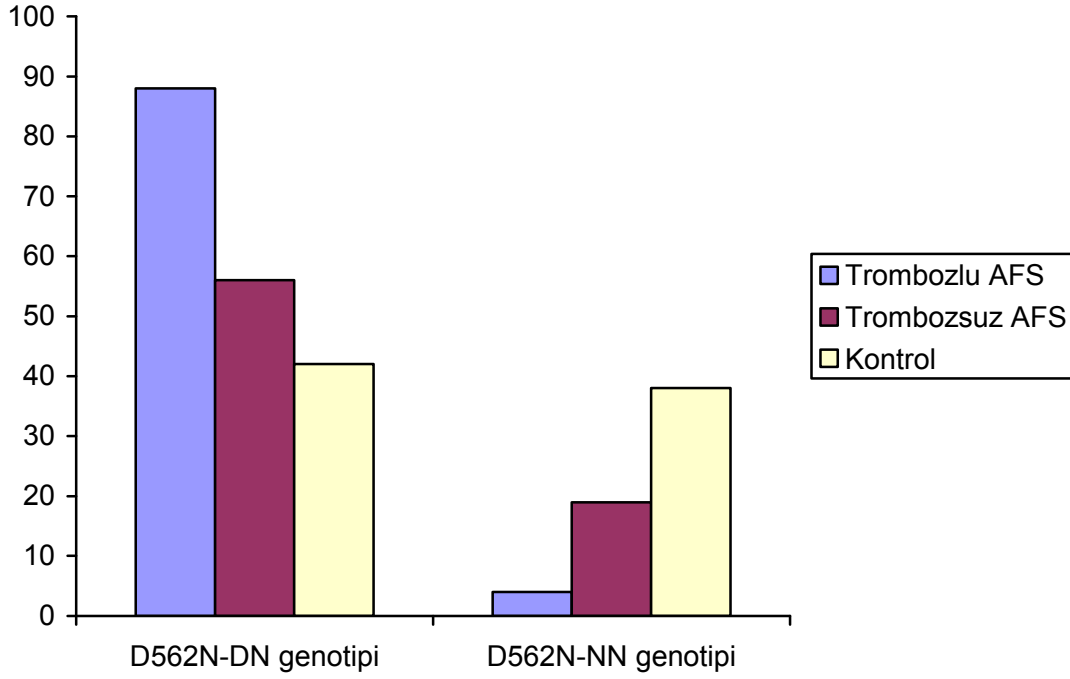
Tablo-8: AFS hastaları (A grubu), Trombozlu AFS hastaları (B grubu), Trombozsuz AFS hastaları (C grubu) ile kontrol grubu (D grubu) arasında S290N, D562N ve T715P polimorfizmlerinin farkı.

TNP		A ve D grubu	B ve D grubu	C ve D grubu	B ve C grubu
S290N	SS; p değeri	0,24	0,60	0,13	0,11
	OR	0,6	1,0	2,7	2,7
	CI	0,2-1,6	0,3-2,8	0,8-9,2	0,7-10,2
	SN; p değeri	0,12	0,78	0,07	0,11
	OR	1,8	0,8	0,2	0,3
	CI	0,7-4,6	0,2-2,3	0,09-0,9	0,09-1,3
	NN; p değeri	0,24	0,38	0,50	-
		-	-	-	
D562N	DD; p değeri	0,38	0,29	0,72	0,16
	OR	0,7	2,7	0,75	0,2
	CI	0,2-2,2	0,5-14,2	0,19-2,9	0,04-1,7
	DN; p değeri	0,003*	0,001*	0,38	0,03*
	OR	4,0	0,1	0,5	5,4
	CI	1,5-10,5	0,02-0,4	1,1-1,8	1,1-25,9
	NN; p değeri	0,004*	0,003*	0,21	0,16
	OR	0,1	13,8	2,6	0,1
	CI	0,05-0,6	1,6-112,9	0,6-10,6	0,01-2,0
T715P	TT; p değeri	0,50	0,75	0,61	0,47
	OR	0,8	1,3	0,9	0,6
	CI	0,2-2,5	0,3-4,4	0,2-4,03	0,1-3,2
	TP; p değeri	0,50	0,58	0,70	0,40
	OR	0,8	0,9	1,7	1,8
	CI	0,2-2,6	0,2-3,3	0,3-9,3	0,3-10,9
	PP; p değeri	0,24	0,37	0,28	0,64
	OR	-	-	-	0,6
	CI	-	-	-	0,03-11,2

TNP: Tek nükleotit polimorfizmi, OR: Odds oranı, CI: Güven aralığı İstatistiksel olarak anlamlıdır.*

Şekil-6: Trombozlu AFS, trombozsuz AFS ve kontrol gruplarında D562N-DN ve NN genotip sıklıkları görülmektedir. Trombozlu AFS grubunda kontrol grubuna kıyasla D562N-DN genotipi anlamlı olarak yüksek sıklıkta (p:0,001), NN genotipi ise düşük sıklıktadır (p:0,003)

% (sıklık)



Polimorfizm sıklıklarının ile LA ve AKLA pozitifliği arasında anlamlı ölçüde herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Benzer şekilde, trombositopeni ya da gebelik kaybı görülme sıklığı ile herhangi bir polimorfizm arasında ilişki yoktur.

D. TARTIŞMA

Endotel ve trombositlerde bulunan P-selektin molekülü, inflamasyon sırasında bu hücrelerin aktifleşmesiyle membran yüzeyine yerleşir. Bir bölümü ise 'soluble' halde plazmaya dağılır. Bir yandan infalamasyonda rol oynarlarken diğer yandan da tromboz gelişimini sağlayan bir dizi moleküler olayın içerisinde rol alırlar. P-selektinle ilgili edinilen tüm

bilgiler, trombozla seyreden hastalıklarda P-selektinin önemine dair merak uyandırmıştır. Literatürde venöz tromboembolizm geçirmiş olgularda, plazma sP-selektin düzeylerinin yüksek olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (80,85,86). Rectenwald ve arkadaşları akut DVT'li olgularda plazma sP-selektin düzeylerinin prediktif olduğunu göstermektedir (86).

Tromboz gelişimi multifaktöryel bir süreçtir. Bu nedenle sP-selektin düzeylerinin artışının tromboza sebep olabilecek başka bir faktöre bağlı olabileceği akla gelebilir. Blann ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada plazma sP-selektin düzeylerinin sigara içiciliği ile zayıf ilişki gösterdiği belirtilmiştir (87). Subramaniam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada P-selektin eksikliği olan farelerde kanama zamanının uzadığı ve hemostaz bozuklukları olduğu görülmüştür (88). Başka bir çalışmada hemofili A'lı farelerde P-selektin immunglobulini injeksiyonunun hemostazı iyileştirdiği saptanmıştır (89). Bu çalışmalarla edinilen bilgiler, P-selektin molekülünün yapısı ya da fonksiyonundaki anormalliklerin, diğer etkenlerden bağımsız olarak tromboz sebebi olabileceğini desteklemektedir. Venöz tromboembolisi olan olgularda P-selektinin inhibisyonunun tromboz riskini azalttığı bildirilmiştir (90). İlerki yıllarda tromboz tedavisinde P-selektinin aktivitesinin azaltılmasının hedef olabileceği düşünülmektedir.

Statin kullanan hastalarda yapılan birkaç çalışmada P-selektin düzeylerinin önemli ölçüde düştüğü bulunmuştur (91,92). Ay ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada oral antikoagulan kullanımının sP-selektin düzeylerini değiştirmediği belirtilmektedir (80).

P-selektin'den yoksun (P-selektin-deficient) farelerde AFA'nın endoteli aktive edemediği ve bu farelerde AFA ile ilişkili tromboz gelişiminin belirgin ölçüde azaldiği ileri sürülmüştür (44). Gerek P-selektin, gerekse onun yüksek afiniteli reseptörü PSGL-1'in hayvan modellerinde tromboz gelişiminde önemli rolü olduğu ispatlanmıştır. AFS olgularında sP-selektin düzeyinde artış olmadığını belirten bir çalışma (93) olmasına rağmen SLE ve primer AFS olgularında yapılan diğer çalışmalar, plazma sP-selektin düzeylerinin kontrol gruplarına göre anlamlı derecede artmış olduğunu göstermektedir (94-97). Nakatani ve arkadaşları lupuslu fare modellerinin glomeruler lezyonlarında sP-selektin ekspresyonunun arttığını göstermiştir (94). Joanne ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SLE ve primer AFS olgularında sP-selektin düzeyi kontrol grubundan yüksek bulunmuştur (95). Bu çalışmada primer AFS olgularının ortalama sP-selektin düzeyleri, SLE hastalarının ortalama değerinden anlamlı olarak yüksektir. Söz konusu çalışmalarda akut trombozlu hastalar çalışmaya alınmamıştır. Zira trombozun kendisi sP-selektin düzeylerini yükseltebilir. AFS hastalarının

tromboz hikayeleri ya da gebelik kayıpları ile plazma sP-selektin düzeyi arasındaki ilişki ise şimdiye kadar net bir biçimde ortaya konabilmiş değildir.

Tromboz gelişiminde kalıtsal risk faktörlerinin edinsel risk faktörleri ile birleştiğinde tromboz gelişme riskini anlamlı olarak arttırdığı bilinmektedir. Kalıtsal risk faktörlerinin belirlenmesi, AFA pozitifliği olan tromboz ya da gebelik kaybı geçirmemiş ancak AFA ile ilişkilendirilen semptom ve bulguları olan olgularda, (örneğin trombositopeni, livedo retikülaris, kognitif disfonksiyon gibi) özellikle tromboz açısından riskli durumlarda (gebelik, puerperal dönem, cerrahi girişim gibi) ya da rutin takipte profilaktik antikoagulan tedaviye karar vermek için yönlendirici olabilir. Trombotik atak geçirmemiş kadın olgularda AFA-pozitif saptandığında oral kontraseptif veya hormon replasman tedavisi yapılması konusu tartışmalıdır (98). Kalıtsal risk faktörlerini belirleyebilmek bu durumda da doğru kararın verilmesinde yardımcı olabilir.

Bu gerekçeler ile birlikte AFS olgularında kalıtsal risk faktörlerinin belirlenebilmesine yönelik çalışmalar son zamanlarda hız kazanmıştır. Hirose ve arkadaşları $\beta 2$ GPI geniyle ilişkili V247V polimorfizminin AFS li hastalarda sık olduğunu göstermiştir (99). Protein C, Protein S, protrombin de $\beta 2$ GPI gibi fosfolipidleri bağlayan plazma proteinleridir. Protrombin 20210A mutasyonunun trombozu olan AFS olguları ile trombozu olmayan AFS olguları arasında farklı olmadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (100-102). Toplumda en sık rastlanan genetik trombofili sebebi FV Leiden mutasyonunun AFSli olgularda tromboz riskini arttırdığı gösterilmiştir (102-104). Diz-Küçükkaya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (102) AFS olgularında Protein C, Protein S, Antirombin III seviyelerinin, protrombin 20210A mutasyonunun tromboz riski ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada FV Leiden mutasyonu ile tromboz riski arasında ilişki bulunmuştur.

PSGL-1 polimorfizminin trombozla ilişkisini araştıran çalışmalar mevcuttur (105-107) Lazona ve arkadaşları PSGL-1 uzunluk polimorfizmi ile serebral tromboz riski arasında ilişki olduğunu göstermiştir (105). Roldan ve arkadaşları da kısa allellerin koroner trombozdan koruyucu olduğunu göstermiştir (106). Diz-Küçükkaya ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise ilk defa AFS'li olgularda PSGL-1 polimorfizmi ile tromboz riski arasında ilişki gösterilmiştir (107).

PSGL-1 polimorfizmi ile tromboz riski arasındaki bu ilişkiye benzer bir ilişkinin P-selektin polimorfizmi ile tromboz riski arasında bulunabileceği düşünülerek birkaç çalışma yapılmıştır. Yukarıda bahsi geçen sP-selektin düzeyleri ile tromboz riski arasındaki ilişki de

bu hipotezi desteklemektedir. Chaim ve arkadaşları ise SLE'li çocuklarda saptadıkları N673S P-selektin polimorfizminin SLE patogenezi ile ilişkili olduğunu düşünmektedir (82). Erişkin hastalarda ise ilk kez 2009 Nisan ayında Morris ve arkadaşları P-selektin geni varyasyonlarının SLE patogenezi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (108).

Çalışmamızda araştırdığımız c.1087G>A, c.1902G>A ve c.2363A>C polimorfizmleri P-selektin geninde sırasıyla S290N, D562N ve T715P varyasyonlarına sebep olmaktadır. Bu varyasyonlar P-selektin geninin tekrarlanan parçasını kodlayan genetik bölge içerisindedir ve P-selektinin PSGL-1 ile bağlanmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (109,110). İskemik kalp hastalığı ve serebrovasküler olay geçiren hastalarda bu üç polimorfizmin birlikte sP-selektin düzeylerini etkileyerek arteriyel tromboz riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (111-114). Ay ve arkadaşları Avusturya'dan beyaz ırkın venöz tromboemoli geçiren hastalarında, sP-selektin düzeylerinin kontrol grubuna oranla yüksek olduğunu göstermenin yanısıra P-selektin pro715 varyantının düşük plazma sP-selektin düzeyi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (80). Ay ve arkadaşları aynı bölgeden yaptıkları bir diğer çalışmada, tekrarlayan DVT ve PE geçiren hastalarda ayrı ayrı S290N, D562N ve T715P polimorfizmi ile tromboz riski arasında ilişki gösterememiş olmakla birlikte, bu üç polimorfizmi ilgilendiren bazı P-selektin haplotiplerinin, yüksek plazma sP-selektin düzeyleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (81).

Biz ise çalışmamızda yukarıda anlatılan, daha önce başka sebeplere bağlı tromboemboli geçiren hastalarda yapılmış olan çalışmalardan farklı olarak, primer AFS hastalarında D562N polimorfizminin DN genotipinin hasta grubunda daha sık olduğunu gösterdik. Hasta grubuna bakıldığında, aynı genotipe trombozlu AFS olgularında, trombozsuz AFS olgularına göre daha sık rastlanılmaktadır. O halde D562N-DN genotipi AFS hastalığında tromboz gelişimde bir risk faktörü olabilir. Bir diğer önemli bulgu D562N-NN genotipi ile ilgilidir. Bu genotip kontrol grubunda hasta grubuna oranla daha az sıklıktadır. Hasta grubu içerisine bakıldığında, trombozsuz AFS olgularında, bu genotip sıklığının kontrol grubu değerlerine yakın olduğu, trombozlu AFS olgularında ise daha az oranda bulunduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak D562N-NN genotipinin AFS hastalarında trombozdan koruyucu olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda S290N ve T715P polimorfizmlerinin sıklığı ise hasta grubunda kontrol grubuna oranla farklı değildir. Bu sonuç başka nedenlerden tromboemboli geçirmiş hastalarla yapılan önceki çalışmaların sonuçları ile paraleldir (80,81,111-114).

Kontrol grubumuzun rastlantısallığını değerlendirmek için S290N, D562N ve T715P polimorfizmlerinin beyaz ırkta araştırıldığı diğer çalışmalardaki kontrol grubu verileri ile kıyaslamalı değerlendirme yapılmıştır. Kontrol grubu sonuçlarımızın benzer olması, elde ettiğimiz sonucun tesadüfle açıklanamayacağını desteklemektedir. Tablo-9’ da bizim kontrol grubumuz ile Ay ve arkadaşlarının 129 kontrol üzerinde çalışmanın (81) sonuçlarındaki benzerlik görülmektedir.

Tablo-9: Çalışmamızın kontrol grubu ile Ay ve arkadaşlarının (81) kontrol grubunda S290N, D562N ve T715P polimorfizm sıklıkları

	S290N			D562N			T715P		
	SS	SN	NN	DD	DN	NN	TT	TP	PP
Kontrol grubumuz-n:40	%63	%32	%2	%20	%42	%38	%80	%20	0
Ay ve ark’nın kontrol grubu-n:129	%72	%25	%3	%27	%44	%28	%78	%23	0

Diğer taraftan çalışmamıza sadece 40 hasta alınabilmiş olması sonuçlarımızın anlamlılık gücünü azaltmaktadır. Her ne kadar primer AFS’nin toplumda görülme sıklığı az olduğundan istatistiksel olarak kullanılan formüllerde hasta sayısının 40 olması yeterli gibi gözükse de polimorfizmlerin araştırıldığı bir çalışmada sayının daha fazla olması arzu edilebilir. AFS tanısıyla polikliniklerimizde izlenen hastalar tarandığında primer AFS kriterlerini dolduran ve başka bir trombofili risk faktörü taşımayan hasta sayısı azalmaktadır. Bunun yanında trombozu olmayan AFS hastaları son derecede nadirdir. Dolayısıyla hastalıklı kontrol grubunu oluşturmak daha zor olmaktadır.

Sonuç olarak çalışmamızda, primer AFS’li olgularda D562N P-selektin polimorfizmlerinin tromboz riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. D562N-DN genotipinin tromboz riskini arttırdığı, D562N-NN genotipinin ise tromboz riskini azalttığı belirlenmiştir. Gen teknolojisindeki ilerlemeler ile AFS olgularında genetik tromboz risklerinin belirlenmesinde daha fazla yol katedileceğini düşünmekteyiz. Primer AFS hastalarında ilk defa P-selektin polimorfizmi ile tromboz riski arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmamız,

bu yolda yapılacak yeni çalışmalara y6n belirleyici nitelikte sayılabilir. 6zellikle yeni tanı konmuş AFS hastalarında bu polimorfizmler değerlendirilerek, daha agresif antikoagulan tedavi kararı verilebilir.

Bu çalışmanın devamı olarak hasta ve kontrol grubunda plazma sP-selektin düzeyinin bakılması planlanlanarak hastalarımızdan plazma 6rnekleri ayrılmıştır. P-selektin polimorfizmlerinin plazma sP-selektin düzeyine etkileri araştırılarak çalışmamızın tamamlanması planlanmaktadır. Ayrıca P-selektin polimorfizmlerinin AFS dışındaki diğer tromboembolik olaylardaki sıklığının araştırılması yeni çalışmalarımızın konusu olacaktır.

E. ÖZET

Giriş: Hücre adezyon molekülü olan selektinler, lökositlerle (L-selektin), aktive plateletler (P-selektin) ya da endotel hücreleri (E-selektin) arasındaki etkileşime aracılık eder. Arteriyel ve venöz tromboembolilerde soluble P-selektin (sP-selektin) konsantrasyonunun arttığı bilinmektedir ve tromboza eğilim yaratan hastalıklarda P-selektin genotiplerinin trombozla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Antifosfolipid antikorlarının (AFA), antifosfolipid sendromunda (AFS) bir dizi mekanizma ile tromboza neden olduğu bilinmektedir. Bu trombotik süreçte P-selektinlerin ve P-selektin polimorfizmlerinin bilinmemektedir. Bu çalışmada primer AFS hastalarında tromboz riski ile P-selektin polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metod: Çalışmamıza Hematoloji polikliniğimizde takip edilmekte olan 32'si kadın 8'i erkek toplam 40 primer AFS'li olgu ve 40 sağlıklı birey alınmıştır. Tromboz için hiperlipidemi hipertansiyon..vb risk faktörü olanlar çalışma dışında bırakılmıştır. Hasta ve kontrol grubunda elde edilen kan örneklerinde P-selektin gen bölgesiyle ilişkili üç tane tek nükleotid polimorfizmi (S290N, c.1087G>A; D562N, c.1902G>A; T715P, c.2363A>C) araştırılarak genotipleri belirlenmiştir.

Sonuçlar: Hasta grubunda 26 trombozlu AFS olgusu ve 14 trombozu olmayan AFS olgusu yer almaktadır. Hastaların yaş ortalaması 39,4±9,5'dir. Hasta ve kontrol grubu kıyaslandığında incelenen polimorfizmlerden D562N-DN genotipi hasta grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p:0,003). Yine hasta grubuna bakıldığında trombozlu AFS grubunda trombozu olmayan AFS grubuna kıyasla D562N-DN genotipine anlamlı olarak sık rastlanmıştır (p:0,03). D562N NN genotipi ise kontrol grubunda hasta grubuna oranla daha yüksek sıklıktadır (p:0,004). Trombozu olmayan AFS olgularında bu genotip sıklığının kontrol grubundan farklı olmadığı belirlenmiştir (p:0,21). S290N ve T715P polimorfizmleri hasta ve kontrol grupları arasında farklılık göstermemiştir. AFA, trombositopeni sıklığı ya da gebelik kaybı ile herhangi bir polimorfizm arasında ilişki kurulamamıştır.

Sonuç olarak P-selektin D562N polimorfizmi DN genotipi primer AFS hastalarında tromboz riski ile ilişkilidir. Aynı polimorfizmin NN genotipi ise primer AFS hastalarında trombozdan koruyucu niteliktedir.

SUMMARY

Introduction: The selectins which are cell adhesion molecules mediate the interaction among leukocytes (L-selectin), activated platelets (P-selectin) and endothelial cells. Soluble P-selectin (sP-selectin) concentrations in arterial and venous thrombosis are known to increase. P-selectin genotypes in thrombotic diseases are associated with thrombosis. Antiphospholipid antibodies (APLA) in antiphospholipid syndrome (APS) with a number of mechanisms cause thrombosis. The role of P-selectin polymorphisms in the thrombotic process are not clear. In this study, we aim to investigate the relationship between risk of thrombosis and P-selectin polymorphisms in patients with APS.

Materials and Methods: 40 patients (32 females, 8 males) with primer APS and 40 healthy people were included in this study. The patients who have the risk factor such as hypertension or hyperlipidemia for thrombosis were excluded. Three single nucleotide polymorphisms associated with P-selectin coding region (S290N, c.1087G>A; D562N, c.1902G>A; T715P, c.2363A>C) were assessed.

Results: There were 26 APS patients with thrombosis and 14 APS patients without thrombosis in patient group. The mean age of patients was $39,4 \pm 9,5$. The frequency of D562N-DN genotype was significantly higher in patients with APS than healthy controls ($p: 0,003$). The frequency of this genotype was significantly higher in patients with APS with thrombosis compared with patients without thrombosis ($p:0,03$). D562N-NN genotype was found at higher frequency in patients with APS than healthy controls ($p:0,004$). The frequency of D562N-NN genotype was not different between patients without thrombosis and control subjects ($p:0,21$). On the other hand, S290N and T715P polymorphisms were not different between patient and control groups. There was no relationship between APLA, thrombocytopenia, or pregnancy loss and any polymorphism.

In conclusion, our results suggest that D562N polymorphism DN genotype of P-selectin is associated with risk of thrombosis in patients with primer APS. NN genotype of the same polymorphism may protective for thrombosis in those patients.

F. KAYNAKLAR

1. Robertson B, Greaves M. Antiphospholipid syndrome: an evolving story. *Blood Rev.* 2006;20:201-12
2. Harris EN, Baguley E, Asherson RA, Hughes GRV: Clinical and serological features of the antiphospholipid syndrome (APS). *Br J Rheumatol* 26 (suppl 2):1 (abstract) 1987.
3. Harris EN: Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 1990;74:1.
4. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis and Rheum* 1999;42:1309-11.
5. Asherson RA. A primary anti-phospholipid syndrome? *J Rheumatol* 1988;15:1742–1745
6. Alarcon Segovia D, Sanchez–Guerrero J. Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1989;16:482–487
7. Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid antibody syndrome. *J Rheumatol* 1992;19:508–512.
8. Greisman SG, Thaya Paran RS, Godwin TA, Lockshin MD. Occlusive vasculopathy in systemic lupus erythematosus – association with anticardiolipin antibody. *Arch Intern Med* 1991;151:389–392
9. Harris EN, Bos K. An acute disseminated coagulopathy – vasculopathy associated with the antiphospholipid syndrome. *Arch Intern Med* 1991;151:231–232
10. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2006;4:295–306.
11. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipidbinding inhibitor of coagulation: β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4120–4.
12. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ, Cramer RM, Krilis SA. A phospholipid- β 2-glycoprotein I complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus* 1992;1: 75–81.
13. Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, et al. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European Multicenter Study of 114 patients. *Am J Med* 1994;96:3–9
14. Wasserman A Neisser A, Bruck C: Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. *Dtsch Med Wochenschr* 1906;32:745.

15. Conley CL, Hartmann RC: A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1952;31:621.
16. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al: Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983;2(8361):1211-4.
17. Harris EN, Pierangeli S: The anticardiolipin ELISA. In *Techniques in Diagnostic Pathology*, Vol 2, Academic Press Limited, 1991
18. Schousboe I. β 2 – glycoprotein I: a plasma inhibitor of contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 1985;66:1086-91.
19. Harris EN, Pierangeli S: Antiphospholipid antibodies: Method of detection. *Am J Reprod Immunol* 1992;28:208-10.
20. Oosting JD, Derksen RH, Entjes HT, Bouma BN, de Groot PG. Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of β -2 glycoprotein-I. *Thromb Haemost* 1992;67:499-502.
21. Roubey RA, Pratt CW, Buyon JP, Winfield JB: Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon β -2 glycoprotein-I. *J Clin Invest* 1992;90:1100-4
22. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF: Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but a complex of lipid bound human prothrombin. *Throm Haemost* 1991;66:629-32.
23. Permpikul P, Rao LVM, Rappaport SI: Functional and binding studies of the roles of prothrombin and β -2 glycoprotein-I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood* 1994;83:2878-92.
24. Arvieux J, Darnige L, Aaron C, Reber G, Bensa JC, Coulomb MG: Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. *Throm Haemost* 74:1120, 1995.
25. Harris EN, Gharavi AE, Loizou S et al: Cross-reactivity of anti-phospholipid antibodies. *J Clin Lab Immunol* 16:1, 1985.
26. Toschi V, Mota A, Castelli C, Paracchini ML, Zerbi D, Gibelli A: High prevalence of antiphosphatidylinositol antibodies in young patients with cerebral ischemia of undetermined cause. *Stroke* 29:1759, 1998.
27. Berard M, Chantome R, Marcelli A, Boffa MC: Antiphosphatidyletanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 23:1369, 1996.

28. Simantov R, LaSala JM, Lo SK et al: Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest*, 96: 2211, 1995.
29. Del Papa N, Sheng YH, Raschi E et al: Human β 2 – glycoprotein I binds to endothelial cells through a cluster of lysine residues that are critical for anionic phospholipids binding and offers epitopes for anti- β 2 – glycoprotein I antibodies. *J Immunol* 160:5572, 1998.
30. Meroni PL, Raschi E, Camera M, et al: Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestation of the syndrome. *J Autoimm* 15:237, 2000.
31. Pierangeli SS, Espinola RG, Liu X, Harris EN. Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin. *Circ Res* 88:245, 2001.
32. Pierangeli S, Colden-Stanfield M, Liu X, Barker JH, Anderson GL, Harris N. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation* 99:1997, 1999.
33. Kaplanki G, Cacoub P, Farnarier C, et al. Increased soluble vascular adhesion molecule 1 concentrations in patients with primary or systemic lupus erythematosus syndrome: correlations with the severity of thrombosis. *Arthritis and Rheum* 43:55, 2000.
34. Branch DW, Rodgers GM : Induction of endothelial cell tissue factor activity by sera from patients with antiphospholipid syndrome: a possible mechanism of thrombosis. *Am J Reproduct Immunol* 168:206,1993.
35. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR: The role of tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 79:276, 1998.
36. Nakamura N, Shidara Y, Kawaguchi N, et al : Lupus anticoagulant antibody induces apoptosis in HUVEC : involvement of annexin V. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1488, 1994.
37. Atsumi T, Khamashta MA, Haworth RS, et al :Arterial disease and thrombosis in the antiphospholipid syndrome: a pathogenetic role for endothelin 1. *Arthritis and Rheum* 41:800, 1998.
38. Rand JH : Antiphospholipid antibody-mediated disruption of annexin V antithrombotic shield :a thrombogenic mechanism for the anti-phospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2:107, 2000.
39. Malia RG, Kitchen S, Greaves M, Preston FE. Inhibition of activated protein C and its cofactor protein S by antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 76:101, 1990.

40. Oosting JD, Derksen RHW, Robbink IWG, et al. Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with thrombin, protein C, or protein S: An explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* 81:2618,1993.
41. Ames PRJ, Tommasino C, Iannaccone L, et al. Coagulation activation and fibrinolytic imbalance in subjects with idiopathic antiphospholipid antibodies- a crucial role for acquired free protein S deficiency. *Thromb Haemost* 76:190, 1996.
42. Crowther MA, Johnston M, Weitz JS, Ginsberg JS: Free protein S deficiency may be found in patients with antiphospholipid antibodies who do not have systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 76:689, 1996.
43. Pötzch B, Kawamura H, Preissner KT, Schmidt M, Seelig C, Müller-Berghaus G: Acquired protein C dysfunction but not decreased activity of thrombomodulin is a possible marker of thrombophilia in patients with lupus anticoagulant. *J Lab Clin Med* 125:56, 1995.
44. Matsuda J, Gotoh M, Gohchi K, Kawasugi K, Tsukamoto M, Saitoh N: Resistance to activated protein C activity of an anti- β 2-glycoprotein I antibody in the presence of β 2-glycoprotein I. *Br J Haematol* 90:204, 1995.
45. Male C, Mitchell L, Julian J, et al: Acquired activated protein C resistance is associated with lupus anticoagulants and thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Blood* 97: 844, 2001.
46. Rand JH : Antiphospholipid antibody-mediated disruption of annexin V antithrombotic shield :a thrombogenic mechanism for the anti-phospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2:107, 2000.
47. Shibata S, Sasaki T, Harpel P, Fillit H: Autoantibodies to vascular heparin sulfate proteoglycan in systemic lupus erythematosus react with endothelial cells and inhibit the formation of thrombin-antithrombin III complexes. *Clin Immunol Immunopathol* 70:114, 1994.
48. Chamley LW, McKay EJ, Pattison NS: Inhibition of heparin/antithrombin III cofactor activity by anticardiolipin antibodies: a mechanism for thrombosis. *Thromb Res* 71:103, 1993.
49. Godeau B, Piette JC, Fromont P, Intrator L, Schaeffer A, Bierling A. Specific antiplatelet glycoprotein autoantibodies are associated with the thrombocytopenia of primary antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 98:873, 1997.

50. Macchi L, Rispoli P, Clofent-Sanchez G, et al. Antiplatelet antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and the primary antiphospholipid antibody syndrome: their relationship with the observed thrombocytopenia. *Br J Haematol* 98:336, 1997.
51. Galli M, Daldossi M, Barbui T Anti-glycoprotein Ib/IX and IIb/IIIa antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 71:571, 1994.
52. Lipp E, von Felten A, Sax H, Muller D, Berchtold P. Antibodies against platelet glycoproteins and antiphospholipid antibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 60:283 1998.
53. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ: Increased circulating platelet-leukocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol* 115:451, 2001.
54. Ichikawa Y, Kobayashi N, Kawada T et al: Reactivities of antiphospholipid antibodies to blood cells and their effects on platelet aggregations in vitro. *Clin Exp Rheumatol* 8:461, 1990.
55. Carreras LO, Maclouf J: Antiphospholipid antibodies and eicosanoids. *Lupus* 3:271, 1994.
56. Carreras LO, Vermuyen J: 'Lupus' anticoagulant and thrombosis. A possible role of inhibition of prostacyclin formation. *Thromb Haemost* 48:38, 1982.
57. Watson KV, Schorer AE: Lupus anticoagulant inhibition of in vitro prostacyclin release is associated with a thrombosis prone subset of patients. *Am J Med* 90:47, 1991.
58. Forasterio R, Martinuzzo M, Carreras LO, Maclouf J: Anti- β 2-glycoprotein-I antibodies and platelet activation in patients with antiphospholipid antibodies: association with increased excretion of platelet-derived thromboxane urinary metabolites. *Thromb Haemost* 1998;79:42-5
59. Keeling DM, Campbell SJ, Mackie IJ, Machin SJ, Isenberg DA: The fibrinolytic response to venous occlusion and natural anticoagulants in patients with antiphospholipid antibodies both with and without systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 1999;77:354-9
60. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989;84:1086-95.
61. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini ML, Makino H, Sakairi N, et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with β 2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res* 2003;44:716-26.

62. Matsuura E, Kobayashi K, Tabuchi M, Lopez LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 2006;45:466–86.
63. Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome. *Journal of Autoimmunity* 2000;15:145–51.
64. Petri M. The lupus anticoagulant is a risk factor for myocardial infarction (but not atherosclerosis): Hopkins lupus cohort. *Thromb Res* 2004;114:593–5.
65. Topping J, Quenby S, Farquharson R, Malia R, Greaves M. Marked variation in antiphospholipid antibodies during pregnancy: Relationships to pregnancy outcome. *Human Reproduction* 1999;14:224–8.
66. Pattison NS, Chamley LW, McKay EJ, Liggins GC, Butler WS. Antiphospholipid antibodies in pregnancy: Prevalence and clinical associations. *British Journal of Obstetrics & Gynaecology* 1993;100:909–13.
67. MacLean MA, Cumming GP, McCall F, Walker ID, Walker JJ. The prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in women with a history of first trimester miscarriages. *British Journal of Obstetrics & Gynaecology* 1994;101:103–6.
68. Lynch A, Byers T, Emlen W, Rynes D, Shetterly SM, Hamman RF. Association of antibodies to beta2-glycoprotein 1 with pregnancy loss and pregnancy-induced hypertension: A prospective study in low-risk pregnancy. *Obstetrics & Gynecology* 1999;93:193–8.
69. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Eng J Med* 346:752, 2002.
70. Greaves M. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Lancet* 1999;354(9183):1031
71. Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I: Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 2000;109:704-15
72. Castro-Marrero J, Balada E, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J. Genetic risk factors of thrombosis in the antiphospholipid syndrome *Br J Haematol.* 2009 Jul 30.
73. Lim W, Crowther MA, Eikelboom JW Management of antiphospholipid antibody syndrome: a systematic review. *JAMA.* 2006;295:1050-7
74. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb. Haemost.* 1991;65:467-73.

75. Ishiwata N, Takio K, Katayama M. Alternatively spliced isoform of P-selectin is present in vivo as a soluble molecule. *J. Biol. Chem* 1994. 23;269:23708-15.
76. McEver RP, Cummings RD. Perspective series: cell adhesion in vascular biology: role of PSGL-1 bindings to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997;100:485-492.
77. Fernandes LS, Conde ID, Smith CW, et al: Platelet-monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with α IIB β 3 and α M β 2, in coronary stenting. *Thromb Res.* 2003;111:171-7
78. Cambien B, Wagner DD: A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med* 10:179, 2004.
79. Furie B, Furie BC: Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med* 10:171, 2004.
80. Ay C, Jungbauer LV, Sailer T, Tengler T, Koder S, Kaider A, Panzer S, Quehenberger P, Pabinger I, Mannhalter C. High Concentrations of Soluble P-Selectin Are Associated with Risk of Venous Thromboembolism and the P-Selectin Thr715 Variant. *Clin Chem.* 2007;53:1235-43.
81. Ay C, Jungbauer LV, Kaider A, Koder S, Panzer S, Pabinger I, Mannhalter C. P-selectin gene haplotypes modulate soluble P-selectin concentrations and contribute to the risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2008;99:899-904
82. Jacob CO, Reiff A, Armstrong DL, Myones BL, Silverman E, Klein-Gitelman M, McCurdy D, Wagner-Weiner L, Nocton JJ, Solomon A, Zidovetzki R. Identification of Novel Susceptibility Genes in Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus Using Uniquely Designed Candidate Gene Pathway Platform. *Arthritis Rheum.* 2007;56:4164-73
83. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raf M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of The Cell.* 5th edition. pg: 559-561
84. Tregouet DA, Barboux S, Escolano S, et al. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2015–2023.
85. Blann AD, Noteboom WM, Rosendaal FR. Increased soluble P-selectin levels following deep venous thrombosis: cause or effect? *Br J Haematol* 2000;108:191–3.

86. Rectenwald JE, Myers DD Jr, Hawley AE, Longo C, Henke PK, Guire KE, et al. D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis: a pilot study. *Thromb Haemost* 2005;94:1312–7.
87. Blann AD, Steele C, McCollum CN. The influence of smoking on soluble adhesion molecules and endothelial cell markers. *Thromb Res* 1997;85:433–8.
88. Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood* 1996;87:1238–42.
89. Hrachovinova I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, Kappelmayer J, Camphausen RT, Widom A, et al. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med* 2003;9:1020–5.
90. Myers DD Jr, Rectenwald JE, Bedard PW, Kaila N, Shaw GD, Schaub RG, et al. Decreased venous thrombosis with an oral inhibitor of P selectin. *J Vasc Surg* 2005;42:329–36.
91. Undas A, Celinska-Lowenhoff M, Domagala TB, Iwaniec T, Dropinski J, Lowenhoff T, et al. Early antithrombotic and anti-inflammatory effects of simvastatin versus fenofibrate in patients with hypercholesterolemia. *Thromb Haemost* 2005;94:193–9.
92. Bickel C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Rippin G, Hafner G, et al. Influence of HMG-CoA reductase inhibitors on markers of coagulation, systemic inflammation and soluble cell adhesion. *Int J Cardiol* 2002;82:25–31.
93. Aleksandrova EN, Novikov AA, Reshetniak TM, Kliukvina NG, Reshetniak DV, Samsonov MIu, Nasonov EL. Soluble adhesion molecules in antiphospholipid syndrome associated with systemic lupus erythematosus and in primary antiphospholipid syndrome. *Ter Arkh.* 2002;74:23-7
94. Nakatani K, Fujii H, Hasegawa H, Terada M, Arita N, Ito MR, Ono M, Takahashi S, Saiga K, Yoshimoto S, Iwano M, Shiiki H, Saito Y, Nose M. Endothelial adhesion molecules in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Kidney Int.* 2004;65:1290-300
95. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol.* 2001;115:451-9

96. Joseph, J.E., Donohoe, S., Harrison, P., Mackie, I.J. & Machin, S.J. Platelet activation and turnover in the primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1998;7: 333-340.
97. Martinuzzo ME, Forastiero RR, Kordich L, Carreras LO Increased lipid peroxidation correlates with platelet activation but not with markers of endothelial cell and blood coagulation activation in patients with antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol.* 2001;114:845-51
98. Brenner B, Vulfsons SL, Lanir N, Nahir M: Coexistence of familial antiphospholipid syndrome and factor V Leiden: impact on thrombotic diathesis. *Br J Haematol* 94:166, 1996
99. Hirose, N., Williams, R., Alberts, A.R., Furie, R.A., Chartash, E.K., Jain, R.I., Sison, C., Lahita, R.G., Merrill, J.T., Cucurull, E., Gharavi, A.E., Sammaritano, L.R., Salmon, J.E., Hashimoto, S., Sawada, T., Chu, C.C., Gregersen, P.K. & Chiorazzi, N. A role for the polymorphism at position 247 of the beta2-glycoprotein I gene in the generation of anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis and Rheumatism* 1999; 42:1655–1661
100. Galli M, Finazzi G, Duca F, Norbis F, Moia M. The G1691-A mutation of factor V, but not the G20210-A mutation of factor II or the C677-T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase genes, is associated with venous thrombosis in patients with venous thrombosis in patients with lupus anticoagulants. *Br J Haematol* 2000;108:865–870
101. Forastiero R, Martinuzzo M, Adamczuk Y, Varela ML, Pombo G, Carreras LO. The combination of thrombophilic genotypes is associated with definite antiphospholipid syndrome. *Haematologica* 2001;86:735–741
102. Diz-Kucukkaya R, Hancer VS, Artim-Esen B, Pekcelen Y, Inanc M The prevalence and clinical significance of inherited thrombophilic risk factors in patients with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Thrombolysis.* 2009 Jun 6. [Epub ahead of print]
103. Dizon-Townson D, Hutchinson C, Silver R, Branch DW, Ward K. The factor V Leiden mutation which predispose to thrombosis is not common in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1995;74:1029–1031

104. Fijnheer R, Horbach DA, Donders RC et al. Factor V Leiden, antiphospholipid antibodies and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 1996;76:514–517
105. Lozano ML, Gonzales-Conejero R, Corral J, Rivera J, Iniesta JA, Martinez C, et al. Polymorphisms of P-selectin glycoprotein ligand-1 are associated with neutrophil-platelet adhesion and with ischaemic cerebrovascular disease. *Br J Haematol* 2001;115:969–76.
106. Roldan V, Gonzales-Conejero R, Marin F, Pineda J, Vicente V, Corral J. Short alleles of P-selectin glycoprotein ligand-1 protect against premature myocardial infarction. *Am Heart J* 2004;148:602–5.
107. Diz-Kucukkaya R, Inanc M, Afshar-Kharghan V, Zhang QE, López JA, Pekcelen Y. P-selectin glycoprotein ligand-1 VNTR polymorphisms and risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome *Ann Rheum Dis*. 2007;66:1378-80.
108. Morris DL, Graham RR, Erwig LP, Gaffney PM, Moser KL, Behrens TW, Vyse TJ, Graham DS. Variation in the upstream region of P-Selectin (SELP) is a risk factor for SLE. *Genes Immun*. 2009;10:404-13.
109. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, et al. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2007; 195: e76–82.
110. Ruchaud-Sparagano MH, Malaud E, Gayet O, et al. Mapping the epitope of a functional P-selectin monoclonal antibody (LYP20) to a short complement-like repeat (SCR4) domain: use of human-mouse chimaera and homologue-replacement mutagenesis. *Biochem J* 1998; 332: 309–314.
111. Tregouet DA, Barboux S, Escolano S, et al. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2015–2023.
112. Zalewski G, Ciccarone E, Di Castelnuovo A, et al. P-selectin gene genotypes or haplotypes and cardiovascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006; 16: 418–425.
113. Volcik KA, Ballantyne CM, Coresh J, et al. P-selectin Thr715Pro polymorphism predicts P-selectin levels but not risk of incident coronary heart disease or ischemic stroke

in a cohort of 14595 participants: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Atherosclerosis* 2006; 186: 74–79.

114. Ferrari J, Rieger S, Endler G, et al. The Thr715Pro polymorphism of the P-selectin gene is not associated with ischemic stroke risk. *Stroke* 2007; 38: 395–397.