

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANKARA

**VENÖZ TROMBOEMBOLİLİ HASTALARDA
ANJİYOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE) I/D VE
PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖR-1 (PAİ-1)
4G/5G POLİMORFİZMLERİNİN ARASTIRILMASI**

Halide KAYA
Biyolog

Tıbbi Genetik Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2012

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VENÖZ TROMBOEMBOLİLİ HASTALARDA
ANJİYOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE) I/D VE
PLAZMİNOJEN AKTİVATÖR İNHİBİTÖR-1 (PAİ-1)
4G/5G POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Halide KAYA
Biyolog

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik Programı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Prof.Tbp.Kd.Alb. Yusuf TUNCA

ANKARA
2012

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:
'Venöz Tromboembolili Hastalarda Anjiyotensin Konverting Enzim I/D (ACE I/D) ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 4G/5G (PAI-1 4G/5G) Polimorfizmlerinin Araştırılması' konulu bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Tbp.Kd.Alb. Yusuf TUNCA, GATA

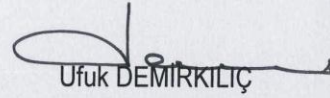
Üye : Prof.Dz.Tbp.Tuğamiral Hayati BİLGİÇ, GATA

Üye : Prof.Hv.Tbp.Kd.Alb. Orhan KOZAK, GATA

Üye : Prof.Tbp.Kd.Alb. Ayhan KUBAR, GATA

Üye : Doç.Tbp.Yb. Cengizhan AÇIKEL, GATA

ONAY: Sivil Memur Biyolog Halide KAYA'nın 11.06.2012 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.



Ufuk DEMİRKILIÇ
Prof. Tbp. Tuğgeneral
Sağ. Bil. Enst. Md.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim, tez aşamasında beni yönlendiren danışman hocam Prof. Tbp.Kd.Alb Yusuf TUNCA'ya,

Tezimin her aşamasında tecrübelerini bana aktaran ve yardımlarını esirgemeyen Uzm.Hv.Tbp.Kd.Yzb. Deniz TORUN'a,

Tez çalışmam sırasında verdiği destekten dolayı Uzm.Tbp.Kd.Yzb. Salih KOZAN'a,

Tezimin gerçekleştirilmesi esnasında sınırsız desteğini esirgemeyen Uzm.Tbp.Tğm. Mutlu KARKUCAK'a,

Tez çalışmamın istatistiksel olarak değerlendirilmesinde büyük emeği olan Doç.Tbp.Yb. Cengizhan AÇIKEL'e,

Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Tbp.Ütğm. Hatice SALİFOĞLU, Tbp.Yzb. Ali ÖZTUNA, Yük. Tıbbi Bio. Mehmet KÖSEM ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Son olarak beni yetiştiren, bana inanan, hayatımın her anında yanımda olan, eğitimim süresince bütün sıkıntılara ortak olan ve benden desteklerini esirgemeyen sevgili aileme

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Tez Yazarı : Biyolog Halide KAYA

Tez Başlığı : Venöz Tromboembolili Hastalarda Anjiyotensin Konverting Enzim I/D (ACE I/D) ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 4G/5G (PAİ-1 4G/5G) Polimorfizmlerin Araştırılması

Tez Programı : Tıbbi Genetik Yüksek Lisansı, Ankara, 2012

Derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner emboli (PE), venöz tromboembolizm (VTE) olarak da bilinen oldukça yaygın görülen multifaktöriyel hastalıklardır. Genetik faktörlerin popülasyonlar arası farklılık göstermesi nedeniyle VTE ile ilişkili birçok polimorfizm çalışması yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda, hastalık gelişimi ile polimorfizmler arasındaki ilişki net olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda VTE ilişkili genetik faktörler arasında yer alan Anjiyotensin Konverting Enzim İnsersiyon/Delesyon (ACE I/D) ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 4G/5G (PAİ-1 4G/5G) polimorfizmlerinin hastalık gelişimindeki rolünü araştırmayı amaçladık. Araştırmamızda, 80 VTE hastası ve 79 kontrol grubundan izole edilen DNA'lar kullanıldı. ACE I/D polimorfizminin araştırılmasında klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılırken, PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizminin belirlenmesinde ise "Allel Spesifik Amplifikasyon" yöntemine dayanan PZR yöntemi kullanılmıştır. Çalışmamız sonucunda, hasta grubu ile kontrol grubu arasında ACE I/D ve PAİ-1 4G/5G polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular, bu gen polimorfizmleri ile VTE gelişimi arasında bir ilişki olmadığını gösterse de VTE'li hastalarda yapılacak daha geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler :Venöz tromboemboli, Pulmoner Emboli, Derin Ven Trombozu, ACE I/D, PAİ-1 4G/5G

Danışman :Prof. Tbp. Kd. Alb. Yusuf TUNCA

SUMMARY

Author of the thesis : Biologist Halide KAYA

Title of the thesis : The Investigation of Angiotensin Converting Enzyme I/D (ACE I/D) and Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Polymorphisms in Venous Thromboembolism Patients

Thesis program : Master of Medical Genetics, Ankara, 2012

Deep venous thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE), known as venous thromboembolism (VTE) and seen as a fairly common multifactorial diseases. Differ between populations due to genetic factors, several polymorphisms associated with VTE was conducted. As a result of these studies the relationship between disease development and polymorphism is not clear yet. In this study we aimed to investigate the role of Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion (ACE I/D) and Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G (PAI-1 4G/5G) polymorphism in the development of disease. In our study, DNA isolated from 80 VTE patients and 79 control groups was used. While the classical Polymerase Chain Reaction (PCR) method used to investigate the ACE I/D polymorphism, the PCR based on allele-specific amplification was used for the detection of PAI-1 4G/5G polymorphism. As a result, there were no significant statistical differences for ACE I/D and PAI-1 4G/5G polymorphism among patient and control groups ($p>0,05$). In conclusion, these findings revealed that there is no relationship between these polymorphisms and the development of VTE, but large-scale studies are need to be done.

Keywords : Venous Thromboembolism, Pulmoner embolism, Deep Vein Thrombosis, ACE I/D, PAI-1 4G/5G

Supervisor : Prof.Dr.Yusuf TUNCA

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
2. Hemostaz Fizyolojisi ve Patofizyolojisi	2
2.1. Hemostaz Fizyolojisi	2
2.2. Hemostaz Patofizyolojisi	3
2.3. Venöz tromboemboli	5
2.3.1. Epidemiyoloji	6
2.3.2. Dağılım	8
2.3.3. Genetik risk faktörleri	9
2.3.4. Klinik ve Tanı	12
2.3.5. Tedavi	14
2.4. Polimorfizm	15
2.4.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi [Single Nucleotide Polymorphism (SNP)]	15
2.4.2. Simple Variable Number of Tandem Repeat Polymorphism (VNTR)	16
2.4.3. Large Scale VNTR Polimorfizm	16
2.5. Anjiyotensin konverting enzim (ACE)	16
2.6. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1) Geni 4 Guanozin /5 Guanozin(4G/5G)	18

GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. DNA izolasyonu.	21
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Protokolü	21
3.3. ACE geni I/D polimorfizminin analizi	22
3.4. PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizminin analizi.....	23
3.5. Agaroz Jel Elektroforez Protokolü	24
3.6. İstatistiksel Analizler.....	26
3.7. Kullanılan Cihazlar	27
3.8. Ticari kit ve kimyasallar	27
BULGULAR	28
TARTIŞMA	33
SONUÇ VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	: Anjiyotensin konverting enzim
ADP	: Adenozin difosfat
aPTT	: Parsiyel tromboplastin zamanı
AT III	: Antitrombin III
Bç	: Baz çifti
BT	: Bilgisayarlı tomografi
BTPA	: Bilgisayarlı tomografi pulmoner anjiyografi
CNV	: Kopya sayısı varyasyonları
D	: Delesyon
dH ₂ O	: Distile su
DMAH	: Düşük moleküler ağırlıklı heparin
DNA	: Deoksiribonükleik asid
dNTP	: Deoksi ribonükleozid tri fosfat
DVT	: Derin ven trombozu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ELİSA	: Enzyme linked immunosorbent assay
FVL	: Faktör V Leiden
I	: İnsersiyon
I.V.	: İntravenöz
kg	: Kilogram
KKH	: Koroner kalp hastalığı
L	: Litre
Mg	: Miligram
Mİ	: Miyokard infarktüsü
ml	: Mililitre
MTHFR	: Metilen tetra hidrofolat redüktaz
NTP	: Nükleotid tri fosfat
PAİ-1	: Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PE	: Pulmoner emboli
PT G20210A	: Protrombin G20210A
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu

RAS	: Renin-anjiyotensin sistemin
RNA	: Ribonükleik asid
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SSR P	: Mikrosatellit Polimorfizm
TBE	: Tris-Borik Asit
t-PA	: Doku plazminojen aktivatörü
TXA2	: Tromboksan A2
UFH	: Fraksiyone olmayan heparin
uPA	: ürokinaz plazminojen aktivatörü
UV	: Ultraviyole
V/Q	: Ventilasyon/perfüzyon sintigrafisi
VNTR	: Simple Variable Number of Tandem Repeat Polimorphism
VTE	: Venöz tromboemboli

ŞEKİLLER

SAYFA

Şekil 3.1	ACE geni PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	25
Şekil 3.2	4G/4G, 4G/5G ve 5G/5G genotipli olguların PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü.....	26
Şekil 4.1	Hasta ve kontrol gruplarında PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizminin allel sıklıklarının dağılımı.....	31
Şekil 4.2	Hasta ve kontrol gruplarında ACE geni I/D polimorfizminin allel sıklıklarının dağılımı.....	32

TABLolar	SAYFA
Tablo 2.1. Venöz tromboemboli risk faktörleri	8
Tablo 2.2. Türkiye’de kalıtsal trombofili oranları	11
Tablo 2.3. Pulmoner embolinin klinik olasılık değerlendirmesinde kullanılan Wells skoru	14
Tablo 3.1. PZR reaksiyonu karışımı için kullanılan malzemeler ve miktarları	22
Tablo 3.2. ACE geninin I/D polimorfizmi için PZR döngü Programı	23
Tablo 3.3. PZR reaksiyonu karışımı için kullanılan malzemeler ve Miktarları	24
Tablo 3.4. PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizmi için PZR döngü programı	24
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ve cinsiyete göre Dağılımı.....	28
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubunun Hardy Weinberg denklemine göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	29
Tablo 4.3. ACE geni I/D polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun değerlendirilmesi.....	30
Tablo 4.4. PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun değerlendirilmesi.....	30

GİRİŞ

Venöz tromboembolizm (VTE), genellikle bacak venlerinde gelişen trombüslerle, bunlardan kopan parçaların pulmoner arter ve onun vasküler dallarını tıkaması ve kan akımındaki kesintileri ifade etmektedir. Pulmoner tromboemboli (PE), sadece pulmoner vasküler yataktaki bölümdür. Bacak derin venlerindeki trombozlar, derin ven trombozu (DVT) olarak adlandırılır (1).

VTE'nin yıllık insidansı, 1.6/1000'dir. VTE, faktör V Leiden (FVL) ve Protrombin G20210A polimorfizmleri varlığında, fizyolojik antikoagülan proteinlerin eksikliği ve hiperhomosisteinemi gibi kalıtsal ve kazanılmış risk faktörleriyle ilişkilendirilmiş multifaktöriyel bir hastalıktır. Kalıtsal risk faktörlerinden olan trombofili ve hiperhomosisteinemi, VTE'nin yaklaşık %40'ına neden olmakla birlikte, geri kalan vakaların nedenleri hala bilinmemektedir (2).

Anjiyotensin Konverting Enzim (ACE) İnsersiyon/Delesyon (I/D) ve Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAİ-1) 4 Guanozin / 5 Guanozin (4G/5G) polimorfizmleri, trombotik risk oluşumundaki rolleri nedeniyle VTE'li olgularda araştırılan genetik faktörler arasında yer almaktadır.

Renin anjiyotensin sistemi (RAS), farklı mekanizmalar aracılığıyla hemostazı etkiler. ACE, bradikiniyi degrade eden Anjiyotensin I'i, Anjiyotensin II'ye dönüştürerek, fibrinoliz, trombosit agregasyonu ve kanama pıhtılaşma aktivasyonu gibi pek çok biyolojik aktivasyonların düzenlenmesinde rol oynar (2).

PAİ-1, plazmadaki plazminojen aktivatörlerinin primer inhibitörüdür. PAİ-1'in yüksek seviyeleri, tromboza yatkınlığı arttıran hipofibrinolitik durum oluşturabilir. PAİ-1'in seviyeleri, genetik faktörlere bağlıdır. 4G/5G insersiyon/delesyon polimorfizmi, 7. kromozom üzerinde lokalize olup, sık çalışılan polimorfizmler arasında yer almaktadır (3).

Bu çalışmamızda, koagülasyon mekanizması üzerindeki etkilerinden dolayı, ACE I/D ve PAİ-1 4G/5G polimorfizmlerinin VTE gelişimi ile ilişkisini ortaya koymayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

2. Hemostaz Fizyolojisi ve Patofizyolojisi

2.1. Hemostaz Fizyolojisi

Normal hemostaz; kanın, sağlam damar içinde pıhtılaşmadan akışkanlığını koruması ve damar zedelenmelerinde, hızlı hemostatik tıkaç oluşturarak, kanamanın durmasını sağlayan mekanizmaları içerir. Damar duvarı (endotel ve endotel altı dokular), trombositler ve pıhtılaşma sistemi bu mekanizmaları oluşturur. Zedelenmeye yanıt olarak, refleks nörojenik mekanizmalar ile kısa süren bir vazokonstriksiyon meydana gelir. Endotel kaynaklı endotelin gibi faktörlerin lokal olarak sekresyonuyla vazokonstriksiyon güçlenir. Geçici olan bu etkinin ardından, trombosit ve pıhtılaşma sistemi aktive olmaz ise kanama devam eder (4, 5, 6).

Vasküler hasar sonucu trombositler, endotel örtüsünün ortadan kalkmasıyla trombojenik olan endotel altı ekstraselüler matriks ile karşılaşarak, damar duvarına yapışır ve aktive olurlar. Trombositler, ekstraselüler matriks ile karşılaştıklarında 3 genel tepki verirler: 1) yapışma ve şekil değişikliği, 2) sekresyon, 3) agregasyon. Sekretuar granüllerden açığa çıkan adenzin difosfat (ADP) ile endotel hücrelerinden serbestleşen tromboksan A₂ (TXA₂) daha çok trombositin kümelenmesini sağlayarak hemostatik tıkaç oluştururlar. Buna primer hemostaz denir. Kanamayı kısa süre önleyen primer hemostaz geçicidir (4, 6). Zedelenme bölgesinde, endotelden trombin salınımını sağlayan, prokoagülan bir doku faktörü salınır. Trombin, fibrin oluşumunu sağlarken, trombosit kümelenmesi ve granül serbestleşmesine de katkıda bulunur. Bu süreç, sekonder hemostaz olarak adlandırılır ve primer hemostazdan daha uzun sürer. Doku plazminojen aktivatörlerinin (tPA) salınımı ile hemostatik trombusün lizis süreci başlar. Normal şartlarda, trombus ortadan kaldırılınca, endotel örtüsü yenilenerek hasarlanan bölgeyi onarır. Kanın akışkanlığının devamı, pıhtılaşma ve pıhtılaşma karşıtı mekanizmalar arasındaki hassas dengenin sağlanması ile sürdürülür (4).

2.2 Hemostaz Patofizyolojisi

Hemostaz mekanizmasındaki dengenin bozulmasıyla, venöz sistemde trombüs meydana gelir. Venöz sistemde trombüs oluşumu, Virchow triadı adı verilen 3 olay dizisi ile meydana gelir:

- 1.Endotelyal hasar
- 2.Staz veya türbülans (Anormal kan akımı)
- 3.Hiperkoagülabilité (Pıhtılaşma eğiliminin artması)

Endotel zedelenmesi, tek başına tromboza neden olabilecek kadar baskın bir etkidir. Ayrıca, endotelin tromboza katılması için mutlaka endotel örtüsünün soyulması veya fiziksel bir kesintiye uğraması gerekmemektedir. Protrombotik ve antitrombotik etkiler arası dinamik dengenin bozulması, lokal pıhtılaşmayı başlatmaya yeterlidir (6).

Staz (kan akımının yavaşlaması), venöz tromboz oluşumunda temel faktördür. Normal kan akımı, laminer (tabakalı)'dır. Yani hücreler, damar lümeninin orta kısmında, daha yavaş hareket eden hücresiz bir plazma tabakası tarafından endotelden ayrılmış olarak akarlar. Staz ve türbülans (çalkantılı akımlar), laminer akımı bozar ve trombositlerin endotelle temasa geçmesine neden olurlar. Aktive olan pıhtılaşma faktörlerinin taze kan ile sulandırılmasını engellerler. Pıhtılaşma faktörleri inhibitörlerinin kan akımı ile bölgeye ulaşması geciktirilerek, trombüs oluşumuna izin verirler ve endotel hücrelerini aktive ederek lokal tromboza, lökosit yapışmasına ve başka endotel hücre etkilerine yol açarlar (6).

Hiperkoagülabilité; trombüs oluşumunda diğer iki nedene oranla daha az tromboza neden olur. Pıhtılaşma sisteminin aşırı aktivasyonu ya da karşıt mekanizma olan antikoagülan mekanizmanın inhibisyonu şeklinde meydana gelir. Tekrarlayan derin ven trombozlu hastalarda sıklık daha yüksektir. Bazı çalışmalarda %60 olarak açıklanmıştır. Protrombin geninin tanımlanmamış 3' bölgesindeki bir mutasyon (G20210A) protrombin düzeyinde yükselmeye ve sonuçta venöz tromboza yatkınlığa neden olmaktadır (6).

Normal koagülasyon sürecinde, bölgesel vazokonstrüksiyon ve trombüs oluşumu, damar lümeninde daralma ile sonuçlanmaktadır. Böylece kan akımında direnç ve kollateral damarlar oluşmaktadır. Hemostaz

sağlandığında erime, parçalanma, embolizasyon, olgunlaşma veya bunların etkisi ile trombüs yıkıma uğramaktadır. Fibrinolitik sistem ile parçalanmayan veya embolizasyona uğramayan trombüs, zamanla büzüşerek endotel tabakasına daha sıkı tutunmaktadır. Olgunlaşma denilen bu süreç, damar duvarında bölgesel yangıyı başlatarak, granülasyon dokusunun gelişmesini tetiklemekte ve bölgesel bir skar dokusunun oluşumuna sebep olmaktadır (7, 8).

Damar içinde, kan akımı ile kaynağından uzak başka bir yere taşınan katı, sıvı ya da gaz niteliğindeki kitle embolus olarak adlandırılır. Embolusların %99'u yerinden kopmuş trombüs parçacıklarından oluştuğu için tromboembolizm terimi kullanılmaktadır. Yağ damlacıkları, tümör kırıntıları, aterosklerotik artıklar, kemik iliği parçacıkları, amniyon ya da yabancı cisim embolisi şeklinde emboli formları bulunmasına karşın, türü belirtilmedikçe bir embolus trombotik kökenli kabul edilmelidir. Trombüsler, arter ve venlerin tıkanmasına neden olurlar. Ayrıca emboliye neden oldukları için de önemlidirler (6).

Trombüsün nerde oluştuğuna bağlı olarak önemi artar. Venöz trombüsler, tıkanmanın distalindeki damar yatağında konjesyon ve ödeme yol açarken, daha ciddi olarak pulmoner embolizm ile ölüme neden olabilmektedirler. Arteriyel trombüsler, embolizm yapabilmekle birlikte, bunların koroner veya serebral damarlar gibi hayati yerlerdeki damar tıkanıklıklarında oynadıkları rol çok daha önemlidir. Trombüsler, kalp boşluklarında, kapakçıklar üzerinde, arterlerde, venlerde veya kapillerlerde oluşabilirler. Kaynaklandıkları yere ve gelişme koşullarına göre farklı şekil ve boyutta olabilirler. Arterlerdeki ya da kalpteki trombüsler, endotel zararı veya çalkantılı akım olan yerde başlarken, venöz trombüslerin karakteristiği, staz bölgelerinde olmasıdır. Tüm trombüslerin tutunduğu bir bölge vardır. Arteriyel trombüsler, tutunma bölgesinden başlayarak kan akımına ters yönde gelişme eğilimi gösterirken, venöz trombüsler, kan akımı yönünde yani kalbe doğru uzanırlar. Kuyruk kısmı, özellikle venlerde yapışık olmayabileceği gibi parçalanıp emboli oluşturmaya yatkındır. Arteriyel trombüsler, en sık olarak koronerler, serebral arterler ve femoral arterlerde yerleşip, çoğunlukla tıkaçıcı

niteliktedir. Arteriyel trombozlarda, endotel hasarı ve trombosit fonksiyonları önemliyken, venöz trombozlarda, staz ve pıhtılaşma–fibrinolitik sisteme ait bozukluklar ön plana çıkmaktadır (6).

2.3. Venöz Tromboemboli

Venöz tromboembolizm (VTE), venlerde oluşan trombüslerle, bunlardan kopan parçaların, pulmoner arter ve vasküler dallarında yarattığı tıkanıklık ve kan akımındaki kesintileri ifade etmektedir (9). Gelişmiş ülkelerde ortalama görülme oranı 1/1000 olarak bildirilmekle birlikte ileri yaşlarda görülme oranı 1/100'e kadar yükselir (10). Venöz tromboz, en sık derin baldır venlerinde oluşmaktadır. Kalıcı santral venöz kateter kullanımının artışıyla birlikte üst ekstremité DVT prevalansı zamanla artış göstermektedir. Yüzeysel venöz trombüsler sıklıkla safen ven sisteminde ortaya çıkar. Bu trombüsler, konjesyona ve tutulan ven boyunca şişme, hassasiyet ve ağrıya neden olabilirler. Nadiren embolizme yol açarlar. Diz ekleminde, popliteal, femoral ve iliyak venlerde oluşan derin trombüsler, emboliye neden olabileceği için daha önemlidir. Lokal ağrı ve ödeme neden olabilirler. Fakat venöz tıkanıklık kollateral kanallarla giderilebildiği için derin ven trombozlu hastaların yaklaşık %50'si bulgu vermez. Ancak embolizme neden oldukları zaman farkına varılır (6). Trombüsün lizisinde aksama, venöz bölümün kalıcı olarak tıkanmasına sebep olmaktadır. Bunlara ek olarak venöz kapakçık komşuluğunda gelişen trombüs, lokal yangısal tepkimelere sebep olarak venöz tıkanıklık, reflü ve göllenme ile karakterize post trombotik sendrom ile sonuçlanabilmektedir (7, 8). Trombüs oluştuktan sonra fibrinolitik aktivasyon ile eriyebilir veya üzerine trombosit ve fibrin birikmesi ile kan akım yönünde uzama gösterip damar tıkanıklığına yol açabilir. Büyüyen trombüsten kopan parçaların başka bölgelere gitmesi ile emboliye neden olabilir (11). Emboli içeren materyal fibrinoliz ve organizasyon ile ortadan kaldırılabilir. Rezolüsyon genellikle ilk hafta başlar ve 4–8 hafta boyunca devam eder (12).

Derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner emboli (PE), venöz tromboembolizm olarak adlandırılmaktadır. Derin ven trombozu, kalp yetmezliği gibi staz durumlarında ve pıhtılaşmaya eğilimin arttığı durumlarda ortaya çıkabilir. Genetik olarak pıhtılaşmaya yatkınlığı olan kişilerde, uçak

veya araba yolculuğu sırasında gelişen hafif bir staz bile derin ven trombozuna neden olabilir. Doğum sırasında amniyon sıvısının dolaşıma girmesi olasılığından başka, gebeliğin son dönemi ve lohusalıkta da pıhtılaşmaya eğilim artmıştır. Yaygın kanserlerde, tümöre bağlı prokoagülan salınımı sonucu gezici tromboflebit veya Trousseau Sendromu denilen tromboembolik olgu riski artar. Ayrıca ileri yaş, yatağa bağımlılık ve hareket kısıtlaması derin ven trombozu riskini artırır (6).

Pulmoner embolizm (PE), pulmoner arter veya dallarının, sistemik derin venlerde meydana gelen trombüslere kopan parçalar tarafından tıkanması sonucu gelişir. Mortalite ve morbiditesi yüksek, tekrarlayabilen, bazen tanısı güç olan ve sık atlanılabilen bir hastalıktır (13). Genellikle alt ekstremitelerdeki derin venöz sistemde oluşan trombüslere bağlı gelişir (14). PE'nin kaynağını çoğunlukla iliofemoral venler oluşturur (15). Akciğerlere ulaşan büyük trombüslere, ana pulmoner arter bifurkasyonuna yerleşip, damar yatağının %50'sinden fazlasını aniden tıkararak hemodinamik anstabilite, şok veya sistemik hipotansiyona yol açabilir (16). PE geçiren ve yaşayan hastaların yaklaşık 2/3'ünde doğru tanı konulamamaktadır. Postmortem çalışmalarda, tüm ölümler içerisinde PE'nin tanı konulma sıklığının daha fazla olması bu durumun bir göstergesidir (17). PE'de, çevresel ve klinik risk faktörleri kadar genetik risk faktörleri de önemli bir yere sahiptir (18). Genç yaşta görülmesi, aile öyküsünün olması, kazanılmış risk faktörü bulunmaması gibi nedenler yüzünden genetik risk faktörlerinin mutlaka araştırılması gerekmektedir (19). PE oluşumuna neden olabilecek başlıca kalıtsal trombofili sebepleri arasında; faktör V Leiden mutasyonu, antitrombin III eksikliği, protein C ve S bozuklukları ve hiperhomosisteinemi yer almaktadır. Gerçek prevalansı net olarak bilinmemekle birlikte, kalıtsal faktörlerin PE hastalarının yaklaşık %20'sinden sorumlu olduğu öne sürülmektedir (20, 21).

2.3.1. Epidemiyoloji

Venöz tromboemboli (VTE) tanımı, proksimal ve distal bacak derin venlerinin (popliteal, femoral veya iliak venler gibi), derin ven trombozunu ve pulmoner emboli gibi üst ekstremitelere ait derin venlerin trombozunu içerir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 900.000 hasta semptomatik VTE tanısı almaktadır ve tahminen 300.000 hasta PE'ye yenik düşmektedir (22). Ölümcül olmayan, kalan 600.000 VTE hastasının, yaklaşık %60'ı DVT ve %40'ı PE tanısı ile takip edilmektedir. Ölümcül olmayan VTE tedavisi için tıbbi maliyetin toplamda 5.8 ile 7.8 milyar dolar arasında olduğu düşünülmektedir (22). ABD'de yapılan bir çalışmada, beyaz nüfus arasında VTE'nin son 30 yıl içinde ortalama yıllık insidansının 100.000 'de 108 olduğu bulunmuştur (23). VTE, ağırlıklı olarak ileri yaş hastalığıdır. VTE insidansı, hem kadınlarda hem de erkeklerde yaşla birlikte önemli derecede artmaktadır. Yapılan başka bir çalışmada, 347 olgunun 30 yıl takibi ve otopsisini ile VTE oranı %35 olarak belirtilmiş, olguların %75'inde PE, %68'inde DVT saptanmıştır (24). Nordstrom ve ark.'larının yaptıkları çalışma, kontrast venografi ile tanılarını doğruladığı, semptomu olan DVT olgularında, DVT insidansını 1.6/1000 olgu/yıl olarak saptamıştır (25). Avrupa Kardiyoloji Birliğinin yayınladığı pulmoner emboli çalışma raporuna göre yıllık yeni olgu sayısı Fransa için 100.000, İngiltere ve Galler için 65.000 ve İtalya için 60.000 olarak bildirilmektedir (26).

Toplumdaki VTE olgularının %60'ının nedeni, daha önceki hastanede yatış veya bakım evi şartlarına bağlıdır. Toplumdaki VTE olgularının %20'si ise aktif kanser tedavilerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. VTE riskini arttıran durumlar; cerrahi girişim sonrası, kadın cinsiyet, ventilatöre bağlı olmak, ameliyat öncesi dispne, anestezi değerlendirmesinde yüksek riskli olmak, metastatik kanser, 30 gün içinde kemoterapi almak, 72 saat içinde 4 üniteden fazla eritrosit transfüzyonu almış olmak, albumin değerlerinin 3,5 mg/dL altında olması, bilirubin değerlerinin 10 mg/dL üstünde olması, sodyum değerinin 145 mmol/L üstünde olması, hematokrit değerinin % 38'den düşük olması, acil cerrahi, kompleks cerrahi müdahale ve enfekte ya da kontamine yara dokusunun bulunması olarak sıralanabilir (22). 50 yaş üzeri kişilerde, VTE hikayesi olanlarda, trombofili durumunda, immobilité, kanser ve variköz venleri olan yolcularda risk yüksektir (27).

VTE için risk faktörleri Tablo.2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Venöz tromboemboli risk faktörleri (22)

- 1)** Geçirilmiş VTE öyküsü,
- 2)** Aktive protein C rezistansına sebep olan Faktör V Leiden (FVL) gen mutasyonu, Protrombin G20210A mutasyonu, antitrombin, protein C, protein S eksikliği ve antifosfolipid antikor sendromu gibi kazanılmış trombofil durumları,
- 3)** Kalça protezi gibi majör cerrahi girişimler,
- 4)** Hastanede yatış (VTE riskini 8 kat artırır),
- 5)** Kemoterapi,
- 6)** Uzun süreli yolculuk,
- 7)** Felç veya immobilizasyon,
- 8)** Kalp krizi, inme,
- 9)** Polistemiya vera, esansiyel trombositemi, primer myelofibrozis gibi myeloproliferatif durumlar,
- 10)** Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri,
- 11)** Obezite,
- 12)** Venöz kateterizasyon,
- 13)** Doğum ve lohusalık,
- 14)** Eksojen östrojen alımı,
- 15)** Sigara.

2.3.2.Dağılım

VTE insidansı, farklı etnik gruplarda değişkenlik göstermekle beraber genel olarak tüm dünyada, siyah ırkta en yüksek, beyaz ırkta ve Orta Asya ırkında en düşük olarak görülmektedir (28-30). Keenan ve ark.'ları ile White ve ark.'ları, yıllık VTE insidansını Afrika kökenli Amerikalılarda 29/100.000, beyazlarda 23/100.000, Hispaniklerde 14/100.000, Pasifik ve Asya ırkında 14/100.000 olarak bildirmiştir (31-33). 40 yaş altı, yılda 1/10.000 olarak belirtilen VTE insidansı, 45 yaş sonrası hızla artmaktadır. 80 yaşlarında yılda 5-6/1000 olmaktadır (34).

Romero ve ark.'larının yaptığı çalışmaya göre; cinsiyetin VTE için bir risk faktörü olmadığı, riskin sıklıkla gebelik (1.23/1000 olgu/yıl), puerperal

dönem (3.2/1000 olgu/yıl), trombofilik gebelik (40/1000 olgu/yıl), VTE öyküsü olan gebelik (110/1000 olgu/yıl) gibi kadınlara özgü durumlar ile ilişkili olduğu şeklindedir (35). Yapılan bir çalışmada; yıllık toplam VTE insidansı, erkeklerde belirgin olarak daha düşüktür (1.52-2.03/1000 olgu/yıl) ve insidans yaşla birlikte yükselmektedir (36).

40 yaş altı kadınlarda hamilelik ve postpartum dönem, tromboembolik hastalığa en sık rastlanabilecek dönemlerdir. Bu dönemlerde venöz tromboz aynı yaşta olan oral kontraseptif kullanmayan kadınlara göre beş kat daha fazla gelişmektedir. Derin ven trombozu, doğum öncesine göre üçüncü trimester ve postpartum dönemde daha sık olmakla beraber, hamilelik boyunca risk artmaktadır. Sezeryan bu riski daha da arttırmaktadır (37).

2.3.3.Genetik risk faktörleri

2.3.3.1.Faktör V Leiden (G1691A) mutasyonu

FV Leiden (FVL) mutasyonu, genetik risk faktörleri içinde en sık görülenidir. 506. pozisyondaki arjininin yerini glutaminin alması sonucu meydana gelen tek nokta mutasyonudur (27, 38). Aktive Faktör V (Faktör Va), koagülasyon kaskadında protrombinin trombine dönüşümünde rol oynayan faktörlerden biridir. Tek nokta mutasyonu sonucu faktör Va parçalanmaya dirençli olur. FVL'in inaktivasyon hızı normal faktör Va'ya göre yavaşlar ve serumda FVL'in artmış aktivitesi ile protrombinden trombin oluşumunu hızlandırarak koagülan etkide artışa neden olur (38). Aktive faktör Va'nın faktör VIIIa yıkımında protein C için kofaktör gibi davranma özelliğinde azalma oluşturarak, antikoagülan etkide azalma gözlenir (39). Homozigot FVL mutasyonu olanlar, heterozigot mutasyonu olanlara göre daha fazla risk taşırlar. Bu durum, heterozigot bireylerde sağlam faktör V'in bulunması nedeniyle aktive protein C'nin faktör VIIIa'yı inaktive ederek antikoagülan etkinlik sağlanmasıyla açıklanabilir (40). Heterozigotlarda VTE riski 5 ile 10 kat fazla iken homozigotlarda bu risk 80 kata çıkmaktadır (41).

Faktör V Leiden ve PT G20210A mutasyonu, ilk venöz tromboemboli atağına yatkınlık yarattığı bilinen en sık gözlenen genetik mutasyonlardır (42). Bu mutasyonlar tek başına VTE riskini arttırabileceği gibi birliktelik

gösterdikleri olgularda risk, belirgin olarak daha da artmaktadır (43). Toplam 3104 olgunun derlendiği bir makalede, ilk VTE atağında FVL mutasyonu %21.4, PT G20210A mutasyonu ise %9.7 oranında saptanmıştır (44).

Hiperhomosisteinemi ve Metilen tetra hidrofolat redüktaz (MTHFR) mutasyonunun VTE için risk faktörü olduğu yönünde çalışmalar olmakla beraber literatürde ilişkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (45, 46).

VTE ile MTHFR C677T mutasyonunun 53 hastada birlikteliğinin değerlendirildiği derleme bir makalede, homozigot MTHFR C677T mutasyonunun, VTE riskini %20 arttırırken, heterozigot C677T mutasyonunun, VTE riski açısından kontrol grubu ile anlamlı fark oluşturmadığı belirtilmektedir. Hiperhomosisteinemi'nin de VTE riskini arttırdığı vurgulanmaktadır (45).

2.3.3.2.Protrombin G20210A mutasyonu: VTE için ikinci en sık görülen kalıtsal risk faktörüdür. Protrombin G20210A mutasyonu beyazlar ve Hispanik Amerikalıların %1.1'inde ve Afrikalı Amerikalıların %0.3'ünde heterozigot olarak bulunur. G20210A mutasyonu heterozigotlarda yaklaşık %30 ve homozigotlarda %70 oranında protrombin düzeylerinde artış ile ilişkilidir (22).

2.3.3.3.Protein C eksikliği: Protein C, Va ve VIIIa'yı inaktive ederek antikoagülan etki gösterir. Etkilenen bireylerde, plazma protein C düzeyi, yaklaşık %50 oranında azalır. Faktör V Leiden gibi ek risk faktörleri, protein C eksikliği için heterozigot hastalarda yaygın tromboz uyarabilir. Homozigot protein C eksikliği doğumdan hemen sonra, yaşamı tehdit eden trombotik komplikasyonlardan biri olan, neonatal purpura fulminans olarak adlandırılan ciddi bir hastalığa neden olur (22). Türkiye'de kalıtsal trombofili oranları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 2.2 Türkiye’de kalıtsal trombofili oranları (21, 47)

	Sağlıklı toplum (%)	DVT’li hastalar (%)	PE’li hastalar (%)	VTE’li (DVT+PTE) hastalar (%)
Faktör V leiden mutasyonu (heterozigot + homozigot)	2-12	24.6-28.8	7.9-21	5.4-35
Faktör V leiden mutasyonu (homozigot)	0-3.0	0-1.6	*	2.6-4.8
Faktör V leiden mutasyonu (heterozigot)	0-8.8	22.9-28.8	*	17-30
Protrombin 20210A Mutasyonu	0-4.8	6.5	0-7.7	5.7-11
Protein C eksikliği	0-2	5.4	2.5	5.8-13.5
Protein S eksikliği	0-3.0	5.4	3.8	3.1-13.5
Antitrombin III eksikliği	0-0.5	0	2.5	1.0-5.4
Artmış faktör VIII	3.0-9.4	*	53.3	53.1-55
Artmış faktör IX	4.7	*	*	*
Hiperhomosisteinemi	8.9	5.4	8.8	11.5 - 17.6
Kalıtsal trombofili	15.1	37.4	7.9-8.6	41.6

*veri yok

2.3.3.4. Protein S eksikliği: Protein S, faktör Va ve Villa’nın inaktivasyonunu kolaylaştırmak için aktive protein C’nin kofaktörü olarak görev yapar. Otozomal dominant geçişlidir. Herediter protein S eksikliğinin 3 tipi vardır: bunlar tip 1) protein S aktivitesinin azalmış seviyesi ve total protein S azalmış seviyesi (hem bağlı hem de serbest protein S), tip 2) protein S aktivitesinin azalmış seviyesi, normal serbest protein S seviyesi ve azalmış total protein S seviyesi, tip 3) azalmış protein S aktivitesi ve azalmış serbest protein S seviyesi ve normal total protein S seviyesi. Protein S eksikliği tanısı alan hastaların yarısından azı trombozla karşılaşmaktadır. K vitamini eksikliği, varfarin, akut tromboz veya dissemine intravasküler koagülasyon, gebelik, karaciğer hastalığı tedavisi, HIV gibi durumlarda protein C ve protein S eksikliği önemlidir (22).

2.3.3.5. Antitrombin III eksikliği (AT III): Antitrombin III; Faktör VIIa dışında tüm prokoagulan proteinazları (FIIa, Xa, IXa, XIa, XIIa) nötralize eder (48). AT III eksikliğinde VTE riski 5 kat artar (38). Antitrombin eksikliği, en önemli morbidite ve ölüm nedenlerinden olan artmış DVT ve PE riski ile birliktelik gösterir (49). Tromboz hikayesi olan hastaların %1-2'sini AT III eksikliği oluşturur. Tip I AT eksikliği AT'nin sentezinin azalmasına neden olur. Kompleks eksikliği ise yaşla bağdaşmaz. Heterozigot AT tip I eksikliği nispeten nadirdir (yaklaşık 1/25.000) ve tromboz riskinde yaklaşık 10 kat artış ile birliktedir. Heparin bağlayan, trombosit bağlayan veya her iki bölgede mutasyon ile tanımlanan birkaç tip AT II homozigot mutasyonu tanımlanmıştır. AT eksikliği olan kadınlarda venöz tromboembolizm riski %50'nin üzerinde olabilir (22).

2.3.4.Klinik ve Tanı

VTE atağının tetiklemede tek başına bir risk faktörü sorumlu olmayıp, çevresel ve genetik birçok risk faktörü bir araya gelerek VTE atağını tetiklemektedir (50). Derin ven trombozunun klinik özellikleri nonspesifik olduğu için tanı koymak zor olabilir. Venografi, standart test olmasına karşın daha ucuz ve kolay uygulanabilir noninvaziv testler mevcuttur. Dupleks ultrasonografi tercih edilen noninvaziv bir testtir (51).

DVT şüphesi olan hastalar değerlendirilirken, hastaya ayrıntılı fizik muayene yapılmalı, klinik özellikler, objektif testler ve risk faktörleri belirlenerek DVT doğrulanmalı veya dışlanmalıdır (52).

Alt ekstremitelerde ağrı veya şişlik olan hastalarda DVT'den şüphe edilmelidir. Aktif kanser ya da devam eden kemoterapi, geçirilmiş VTE, cerrahi, hastaneye yatma veya immobilizasyon ve baldır çapının 3 cm'den fazla arttığı durumlar DVT olasılığını artırmaktadır (22).

DVT tanısında, kontrast venografi, pletismografi, ultrason teknikleri, bilgisayar destekli tomografi, manyetik rezonans görüntüleme ve fibrinojen kan testleri kullanılır. Seri pletismografisi veya ultrason testi gibi noninvaziv yöntemler, şüpheli DVT hastalarında tedaviye karar vermek için yeterince duyarlı ve spesifik testlerdir. Testler bir hafta içinde normal kalırsa antikoagulan tedavi kesilebilir. Tekrarlayan DVT durumlarında yeni non-

invaziv teknikler ile hastalar test edilmektedir. Ancak kesin objektif tanı testi kontrast venografi olmalıdır. İlk evrede bile tekrarlayan DVT'lerde aktif tromboemboliyi dışlamak için D-dimer testi ek bir test olabilir (53).

Pulmoner embolinin tanısı, klinik ve semptomları ile laboratuvar testlerinin de nonspesifik olması nedeniyle güç olmakta, bu durum tanı ve tedaviyi geciktirdiği için morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır. Ventilasyon/perfüzyon (V/Q) sintigrafisi PE şüphesi olan olguların araştırılmasında temel görüntüleme tetkiki olmasına karşın, son yıllarda bilgisayarlı tomografi pulmoner anjiyografi (BTPA) PE olgularının değerlendirilmesinde sintigrafinin yerine önerilmektedir. Bazı testler PE tanısı koymada (BTPA), bazıları dışlamada (D-dimer) uygundur. V/Q sintigrafisi her ikisini de yapabilmesine karşın nondiagnostiktir. PE tanısı için pretest belirleme yöntemleri geliştirilmiştir: Bunlardan en sık kullanılanı, ampirik olasılık belirleme sistemidir. Bu skorlama sistemine göre:

1. Düşük klinik olasılık (%1-19): Risk faktörü yok. Dispne, takipne veya plöretik göğüs ağrısı, radyolojik ve kan gazı değişiklikleri olabilir. Ancak bu anormallikler başka nedenlerle de açıklanabilir.

2. Orta klinik olasılık (%20-79)

3. Yüksek klinik olasılık (%80-100): Risk faktörü var. Başka bir nedenle açıklanamayan dispne, takipne, plöretik göğüs ağrısı ve/veya radyolojik veya kan gazı değişikliklerinin mevcut olması.

Diğer bir klinik olasılık değerlendirme skoru ise daha objektif ve kolay uygulanabilir olan Wells skorudur (Tablo 2.3).

Tablo 2.3 Pulmoner embolinin klinik olasılık değerlendirmesinde kullanılan Wells skoru (54)

Risk Faktörleri	Puan
DVT klinik bulgu ve semptomları	3
PE dışında başka tanı olasılığı düşük	3
Kalp hızı >100/dakika	1.5
Önceki dört hafta içinde ameliyat veya immobilizasyon	1.5
DVT ve PE öyküsü	1.5
Hemoptizi	1
Malignite	1
Klinik Olasılık	
Düşük	<2
Orta	2-6
Yüksek	>6

D-dimer testi: Fibrinin spesifik yıkım ürünü olan D-dimer serum düzeyi, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) veya Lateks aglütinasyon yöntemi ile ölçülür. Fibrin pıhtının plazmin tarafından parçalanması ile sistemik dolaşıma salınan D-dimer, çoğu PE hastasında plazmada artmakla birlikte MI, sepsis, kanser, cerrahi sonrası, pnömoni, gebelik, periferel vasküler hastalıklar ve inflamatuvar hastalıklarda da düzeyi artabilmektedir (16).

2.3.5.Tedavi

Antikoagülanlar, iki kan sulandırıcı formda bulunur: 1) heparin; intravenöz veya enjeksiyon, 2) varfarin; oral alınan kan sulandırıcı. Heparin başlıca iki formdan oluşur: Geleneksel fraksiyone olmayan formun normalde intravenöz uygulanması gerekir. Heparinin bu formu için belirli bir doz yoktur. Parsiyel tromboplastin zamanı ile doz ayarlaması yapılır. İlaç başlandıktan sonra bu test ilk günlerde günde birkaç kez yapılırken, daha sonraki günlerde günde bir defa olarak devam edilir. Son zamanlarda, düşük moleküler ağırlıklı heparinler (DMAH), fraksiyone olmayan heparinlerin (UFH) yerine geçmeye

başlamıştır. DMAH'ler, normalde hastanın ağırlığı ile orantılı olarak reçete edilir. Kan testi gerektirmez ve günde bir veya iki kez enjeksiyon yoluyla uygulanır. PE, varfarinle birlikte intravenöz fraksiyone olmamış heparinle (UFH) hastane şartlarında verilir. Buna karşın, varfarinle birlikte oral antikoagülasyon tedavisi ile düşük molekül ağırlıklı heparin enjeksiyonları hastaneye yatmadan başarılı bir şekilde DVT hastalarında kullanılabilir (55).

VTE tedavisinde en tartışmalı bölüm varfarin antikoagülasyonunun optimal devamlılığıdır. Günümüzde kabul gören tedavi yöntemi, en az 6 aylık antikoagülasyon tedavisidir. Ancak bazen bu süre hastanın durumuna göre uzayabilir. Antikoagülanları tolere edemeyen veya antikoagülasyon tedavisi başarısız olan hastalarda, PE'ye neden olan büyük kan pıhtılarının pulmoner arterlere ulaşmasını engellemek için inferior vena kavaya kalıcı bir metal filtre yerleştirilir (55).

2.4.Polimorfizm

Polimorfizm, genlerdeki genetik çeşitliliğe yol açan değişikliklerden biridir. Genomda tekli, ikili, üçlü nükleotid tekrar sayılarında değişiklikler ve kromozom düzeyinde bazı yapısal düzenlemeler şeklinde polimorfizmler bulunmaktadır (56). Genetik varyasyona göre kişisel fenotiplerde farklılıklar olduğu, genetik polimorfizmlerin farklı tipleri, geniş çaplı sekans varyasyonları bilinmektedir. Bu durumların fenotipe etkileri protein veya RNA seviyelerinde ifade bulur. Polipeptid kodlayan DNA'lardaki değişiklikler, protein polimorfizmine yol açan aminoasit değişimine sebep olur. Gen regülasyonundaki değişimler, allelik insan genom varyasyonlarına neden olabilir. Bu tip bir sekans varyasyonu sık görülen hastalıklar için suçlanabilir. DNA polimorfizmlerinin genel sınıflandırılması ve geniş çaplı sekans varyasyonları:

2.4.1.Tek Nükleotid Polimorfizmi [Single Nucleotide Polymorphism (SNP)]: Tek bir baz değişimi olabileceği gibi 'basit indel (insersiyon/delesyon) polimorfizm' olarak da adlandırılan insersiyon ya da delesyonlar sonucunda da ortaya çıkabilir. SNP'ler iki allele sahiptir. Bazı SNP'ler, restriksiyon sahalarında değişimlere sebep olabilirler (Restriksiyon bölgesi polimorfizmi).

İnsan genomunun %1.5'i kodlanır, çoğu SNP'ler kodlanmayan DNA bölgesinde bulunur. SNP'lerin kromozomal lokalizasyonu homojen değildir. Çok az SNP içeren kromozomal bölgeler ile çok fazla SNP içeren bölgeler yan yana bulunabilir.

2.4.2.Simple Variable Number of Tandem Repeat Polimorphism (VNTR):

Basit dizi tekrarlarını barındıran allel bölgeleri olarak tanımlanır. Simple Sequence Repeat Polimorphism (SSR P) (Mikrosatellit Polimorfizm) ve minisatellit DNA polimorfizmi olmak üzere iki şekli vardır. Mikrosatellit DNA polimorfizmi veya SSR birkaç nükleotid uzunluğunda tekrar dizileri içeren yaklaşık toplam 100 nükleotid uzunluğunda polimorfizm bölgeleridir. Minisatellit DNA polimorfizmi ise 9 veya onlarca nükleotid tekrarları içeren yüzlerce nükleotid uzunluğunda polimorfizm bölgeleridir.

2.4.3.Large Scale VNTR Polimorphism: Geniş ölçekli tandem tekrarları kopya sayısı varyasyonlarına (CNV) sebep olur. Bu, eşit olmayan krosing over veya eşit olmayan kardeş kromatid değişimleri ile meydana gelir. Bazı polipeptid kodlayan gen aileleri bu tip polimorfizm ile oluşan tandem tekrarları içerir (57).

2.5.Anjiyotensin konverting enzim (ACE)

Anjiyotensin konverting enzim; renin–anjiyotensin–aldosteron sisteminde (RAS) yer alan bir dipeptidazdır (58). Su ve tuz kaybı olduğunda veya sempatik aktivasyon durumunda böbreğin jukstaglomerular apparatusundan renin salınımı gerçekleşir. Bu da karaciğerde sentezlenen anjiyotensinojeni, anjiyotensin I'e dönüştürür. Anjiyotensin I de birçok damarın endotelinde bulunan pulmoner damarlarda ise yüksek konsantrasyonlarda varolan ACE ile anjiyotensin II'ye dönüşür. ACE endotel hücrelerinde eksprese olur. Akciğer ile beyin mikrovasküler ve kapiller hücreleri, barsak, koroid pleksus ve böbrek tübül hücreleri de ACE'den zengindir (59).

ACE, Anjiyotensin I'i, vazokonstriktör bir madde olan ve trombosit agregasyonunu ve aktivasyonunu artırarak fibrinolizi inhibe eden Anjiyotensin II'ye dönüştürür. Bu enzim aynı zamanda potansiyel vazodilatatör bir madde olan ve inflamasyon oluşmasına aracılık eden

bradikinini degrade eder (60). Bradikinin damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek nitrik oksit, prostasiklin gibi vazodilatatörlerin endotelden salınmasını inhibe eder. ACE, vazodilatatör bradikinin inaktivasyonunda primer rolü oynar (59). Kan basıncı düzenlenmesi ve elektrolit dengesi üzerinde önemli rol oynamaktadır. Enzim, vazodilatatör olan bradikinin ve anjiyotensin 1-7'yi inaktive edebilmektedir (61). Fonksiyonel olarak benzer ve birbiri ile ilişkili endokrin ve lokal olmak üzere iki tür RAS vardır. ACE, endotel hücrelerinde hücre zarına bağlı olarak bulunur. Renin, endokrin RAS'ın aktivitesinde önemli rol oynarken, lokal RAS'ın aktivitesinde benzer rol oynamaz. ACE düzeyi sağlıklı kişilerde büyük oranda sabit olmakla birlikte, aile bireyleri arasında benzerlik gösterirken farklı kişiler arasında değişkenlik gösterir (61).

ACE gen ekspresyonu hala büyük ölçüde bilinmemektedir. ACE geninin 78 polimorfizmi saptanmıştır. Bunların arasında en çok çalışılanı ACE insertion/deletion (I/D) polimorfizmidir (59). ACE geni, insan genomunda 17q23 lokusunda bulunur. 26 ekson ve 21 Kb büyüklüğünde bir gendir. 16. introndaki 287. baz çiftinin olup olmamasına bağlı olarak Insertion/ Deletion polimorfizmi oluşmaktadır. Bu polimorfizme göre DD, ID, II olmak üzere üç farklı tip fenotip vardır (62). ACE D/D ve I/I homozigot, I/D ise heterozigottur. ACE genindeki bu insersiyon ACE ekspresyonunu azaltır. Böylece II homozigotlara göre DD homozigotlar %65, ID heterozigotlar ise %31 daha fazla ACE'ye sahiptir (59).

Yapılan popülasyon çalışmalarında insersiyon allel sıklığı %44 iken delesyon allel sıklığı %56 olarak bulunmuştur. Doku ve plazma ACE düzeyi polimorfizme göre değişir. Gen polimorfizmi serum ACE düzeyi değişikliklerinin %47'sinden sorumludur. DD genotipli kişilerde ACE düzeyi en yüksek, II genotipine sahip kişilerde ise en düşüktür (62). Anjiyotensin II seviyeleri, ACE genotipleri arasında farklılık göstermezken, DD genotipine sahip vakalarda anjiyotensin 1-7 konsantrasyonunun daha yüksek ve bradikinin yarı ömrünün daha kısa olduğu bildirilmektedir (61).

Renin-anjiyotensin sistemindeki (RAS) peptidler geniş ölçüde çalışılmıştır ve çalışmalar göstermiştir ki anjiyotensin II, büyümeyi uyaran

fonksiyonları ve vazoaaktif fonksiyonları regüle eden kontrol mekanizmalarında önemli rol oynamaktadır. RAS'ın bu görevinde polimorfizmlerin rolü yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Plazma anjiyotensin düzeyleri, anjiyotensin genindeki M235T polimorfizmleriyle ilişkili bulunmuştur. Anjiyotensinojen, renin, prorenin ve ACE seviyeleri ile ilgisiz sonuçlar veren RAS ekspresyonu ile ilgili diğer markırlar daha az tutarlıdır. I/D polimorfizmlerinden ACE D alleli, renin, aldosteron ve bradikinin gibi diğer RAS yolaklarından bağımsız olarak yüksek ACE aktivitesiyle ilgilidir. ATI reseptöründeki A1166C polimorfizmi, her üç genotiple ilişkili olarak Anjiyotensin II'ye doz bağımlı cevapla ilgilidir. Genç erişkin popülasyonda RAS gen polimorfizmlerinin özellikle Anjiyotensin 1-7 olmak üzere anjiyotensin peptitlerinin genotip veya cinsiyete göre plazma seviyelerindeki değişimi üzerinde etkisine dair bir çalışma bulunmamaktadır (63).

2.6. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAİ-1) Geni 4 Guanozin /5 Guanozin (4G/5G)

Fibrinolitik sistemde homeostazın düzenlenmesinde önemli rol oynayan iki enzim sisteminden birincisi; plazminojen aktivatörleri, ikincisi ise plazminojen aktivatör inhibitörleridir (65).

Plazminojen aktivatör sistemi, fizyolojik ve patolojik süreçte, koagülasyon, fibrinoliz, inflamasyon, yara iyileşmesi, ve malignite dahil olmak üzere geniş yelpazede önemli rol oynar. Plazminojen mRNA'sı, böbrek üstü bezi, böbrek, beyin, testis, kalp, akciğer, uterus, dalak, timus ve bağırsak dahil olmak üzere birçok fare dokusundan izole edilmiştir. Plazminojen aktivatörü sisteminde, plazmin plazminojen dönüşümü çok önemli bir reaksiyondur. Plazminojen aktivatör sisteminin ana enzimi, plazmindir. Plazmin, fibrin ve ekstraselüler matriks proteinlerinin son degradasyonundan sorumlu olan, fibrinolizde anahtar rol oynayan bir serin proteazdır. Plazmin tripsine benzer. Öncülü olan plazminojen, plazminojen aktivatörleri tarafından oluşturulmaktadır (64).

Plazminojen aktivatörleri arasında doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve plazminojen aktivatör inhibitörleri arasında ise plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAİ-1) yer alır. Fibrinolitik sistemde PAİ-1 aktivasyonu fibrin

tarafından gerçekleştirilmekte ve aktive olan PAİ-1 ise t-PA'yı bağlayarak onun litik etkisini inhibe etmektedir (65).

PAİ-1, intravasküler fibrinolizin dolaşımdaki en önemli inhibitörüdür (66). Karaciğer, dalak, adipositler ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli doku ve hücre tiplerinde sentez edilir. Sentezi, insülin, lipidler, glikoz, endotoksin ve inflamatuvar sitokinler de dahil olmak üzere çeşitli ajanlar tarafından düzenlenmektedir (67). t-PA, dokunun aktif bölgesine bağlanarak, plazminojeni aktif proteaz plazmine dönüştürür ve fibrinin yıkılmasını inhibe eder (66). Fibrinoliz sırasında plazminojen, fibrin pıhtıları halinde çözünen plazmine dönüştürülür. Bu dönüşüm ürokinaz plazminojen aktivatörü (u-PA), veya doku plazminojen aktivatörü (t-PA) varlığında oluşur ve bu dönüşüm bir serin proteaz inhibitörü olan plazminojen aktivatör inhibitörü-1 tarafından düzenlenir. Fibrinolitik sürecin düzenlenmesinde önemli rol oynaması nedeniyle, PAİ-1'in aşırı ekspresyonu normal fibrin klirensi mekanizmalarını etkileyebilir ve patolojik fibrin birikimi ile trombotik olaylara sebep olabilir (67). Yüksek PAİ-1 plazma düzeyleri tromboz gelişimine katkısı nedeniyle, VTE ve Koroner Kalp Hastalığı (KKH) ile ilişkili bulunmuştur (66). PAİ-1, tümör büyümesi, invazyon ve metastaz ile ilişkili ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) / uPA reseptör (uPAR) yolağının, büyük bir inhibitörüdür. uPA ve uPAR'nın yüksek ekspresyonu, bazı kanser türlerinin kötü prognozu ile ilgilidir (66).

PAİ-1 geni 7q22'de bulunur. Bu genin promotör bölgesinde bir allelde 4G diğer allelde 5G şeklinde bir polimorfizm görülür. Her iki allelde de transkripsiyon için aktif bölgeler vardır. Ancak 5G polimorfizm bölgesinde, ayrıca baskılayıcı bir bağlanma bölgesi olduğundan PAİ-1 aktivitesinde azalmaya neden olacak şekilde transkripsiyon oranı düşüktür. Buna karşın 4G alleli, ortalamanın üzerinde plazma PAİ-1 düzeyleri ile bağlantılıdır. PAİ-1, bir akut faz reaktanıdır. Dolayısıyla bu polimorfizm dengenin korunması için cevap olarak ortaya çıkmış olabilir. 4G ve 5G arasındaki farklı PAİ-1 seviyeleri; PAİ-1 ekspresyonunu arttıran çevresel ve/veya hastalık etmenlerinin varlığında daha belirgindir. Arteriyel ve venöz tromboz riskini arttıran bu genetik varyantın etkisi ile ilgili veriler, hem çok sayıda hem de

çelişkilidir. Son zamanlarda 4G/5G polimorfizminin kardiyovasküler, iskemik inme ve venöz tromboembolizm riskine olan katkısı hakkında yayınlanmış metaanalizler bulunmaktadır (67).

Gen polimorfizmleri, etnik ve coğrafi farklılıklar göstermekle birlikte, popülasyonda yaygın görülür. Bir çok durumda, hücre metabolizması için önemli olan yollarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alırlar. Genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Bu proteinlerin fonksiyonunun bozulması çeşitli hastalıklara yol açabilmekte veya bazı hastalıklar için riski arttırabilmektedir (68). Polimorfizm çalışmalarında kullanılan hasta ve kontrol gruplarının farklı allel frekanslarının ve farklı hastalık risklerinin ortaya çıkmasına sebep olması nedeniyle önemlidir. Bu yüzden, oluşan polimorfizmlerin hastalık üzerindeki etkileri de çalışma gruplarına bağlı olarak değişebilir (69).

Bu çalışmamızda toplumumuzdaki VTE'li hastalarda PAİ-1 4G/5G ve ACE I/D polimorfizmlerinin hastalık gelişimine etkisini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Gülhane Askeri Tıp Akademisi Etik Kurulu tarafından 20 Ekim 2011 tarihinde (No:181) onaylanmıştır. Çalışma Kasım 2011- Mart 2012 tarihleri arasında Tıbbi Genetik BD'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya, Tıbbi Genetik BD'na VTE ön tanısıyla müracaat eden 80 hasta ile 79 kontrol grubu dahil edilmiştir.

3.1 DNA izolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarındaki olgulardan 4 ml EDTA'lı tüpe periferik kan alındı. Kandan DNA izolasyonu için Nucleospin DNA izolasyon kiti (MN, Germany) prosedürü uygulandı.

- 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri içine 25 µl proteinaz K ve 200 µl'ye kadar kan konuldu.
- Örnekler 200 µl Buffer B3 eklenerek kuvvetlice 10-20 saniye vortekslendi.
- Örnekler, 70°C'de 10-15 dakika inkübe edildikten sonra her bir örneğe yaklaşık 200 µl etanol (%96-100) eklendi.
- Her bir örnek için toplama tüpü içine yerleştirilmiş Nucleospin blood kolonu alındı.
- Örnekler kolona yüklendi ve santrifüj edildi.
- Buffer BW ve Buffer B5 ile yıkama işlemleri yapıldı.
- Nucleospin blood kolonu 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içine yerleştirildi ve 100 µl önceden ısıtılmış Buffer BE (70°C) eklendi. Oda ısısında 1 dakika inkübe edildi.
- Santrifüj edildi ve çalışılma zamanına kadar -20°C'de saklandı.

3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Protokolü

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi, DNA'da çoğaltılacak hedef bölgeyi belirleyen ve DNA'yı iki yandan çeviren primerler aracılığı ile yapılmaktadır. Isı yardımı ile çift sarmal DNA'nın hidrojen bağları kopararak, ısının düşürülmesi ile primerler bağlanmaktadır. Bağlanma işleminden sonra, 72°C'de Taq DNA Polimeraz, kalıp DNA bölgesini referans almaktadır.

Bağlanan primerlerin arkasına, dört deoksiribonükleotid trifosfattan birini (adenin, guanin, sitozin, timin) yeni zincire eklemektedir. Isıya dirençli DNA Polimeraz kullanılarak, her döngüde DNA polimeraz eklenmesine gerek kalmadan, 30 ile 40 döngü sonrasında, kalıp DNA'da ilgili bölgenin milyonlarca kopyası elde edilebilmektedir (70).

Bu çalışmada izole edilen DNA'larda ACE geni I/D polimorfizmini belirlemek için klasik PZR yöntemi, PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizmini belirlemek için ise "Allel Spesifik Amplifikasyon" yöntemine dayanan PZR yöntemi kullanılarak genotipleme yapıldı.

3.3 ACE geni I/D polimorfizminin analizi

ACE, anjiotensin I molekülünü fizyolojik olarak aktif anjiotensin II molekülüne çevirmektedir. ACE geni 17. kromozomun uzun kolunda bulunur. 16. intronunda 287 baz çifti (bç) uzunluğunda alu element polimorfizmi bulunmaktadır. Bu element bazı allellerde saptanırken (İnsersiyon), bazı allellerde ise saptanmamaktadır (Delesyon). Bu çalışma, Rigat ve ark. (70, 71) tarafından yapılmış çalışma metodu modifiye edilerek yapılmıştır. ACE geninin I/D polimorfizmini içeren bölgeyi çoğaltmak için

Forward: 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' ve

Reverse: 5'- GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T -3'

primerleri kullanıldı. 25 µl'lik PZR karışımı 0.2 ml'lik PZR tüpünde Tablo 3.1'deki sıra ile karıştırıldı.

Tablo 3.1. PZR reaksiyonu karışımı için kullanılan malzemeler ve miktarları.

1)dNTP (10 mM)	0.3 µL
2)10x PZR Buffer (Magnezyumlu)	2.5 µL
3)10 pmol/ml primer forward	1.0 µL
4)10 pmol/ml primer reverse	1.0 µL
5)dH ₂ O	16.0 µL
6)Hasta DNA	4.0 µL
7)Taq polimeraz enzimi (5 ünite/µl)	0.1 µL

ACE geninin I/D polimorfizmi için PZR döngü programı olarak tablo 3.2'de belirtilen sıcaklık ve süreler kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. ACE geninin I/D polimorfizmi için PZR döngü programı

Kapak sıcaklığı, (cihaz tipine özel)	103°C,
1)Başlangıç denatürasyonu	94°C, 5 dakika
2)Denatürasyon	94°C, 1 dakika
3)“Annealing”	57°C, 1 dakika
4)“Extention”	72°C, 1 dakika
5)Son “Extention”	72°C, 10 dakika
(2,3 ve 4 işlemler sırasıyla 38 siklus)	

3.4 PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizminin analizi

PAİ-1 geni, 7. kromozomda yer alır ve 9 ekzon ile 8 introndan oluşmaktadır. Genin promotor bölgesinde 4G/5G polimorfizmi olarak adlandırılan ve Guanin (G) nükleotid sayı farklılığı ile oluşan bir polimorfizm bulunmaktadır. Çalışmamızda bu polimorfizmi belirlemek için Muetze ve ark. (71, 72) tarafından geliştirilen “allel spesifik amplifikasyon” PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde 4G ve 5G alleleri için ayrı ayrı tüplerde reaksiyon kuruldu.

4G allelini belirlemek için internal kontrol primerleri;

Forward: 5'-TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA G-3' ve

Reverse: 5'-AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT-3' ve

4G alleleline spesifik 5'-GTC TGG ACA CGT GGG GA-3' primeri kullanıldı.

5G allelini belirlemek için internal kontrol primerleri;

Forward: 5'-TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA G-3' ve

Reverse: 5'-AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT-3' ve

5G alleleline spesifik 5'-GTC TGG ACA CGT GGG GG-3' primeri kullanıldı.

Her hasta için 4G ve 5G allellerini belirlemek amacıyla 0.2 ml'lik iki ayrı tüpte PZR kuruldu. 25 µl'lik PZR karışımı 0,2 ml'lik PZR tüplerine Tablo 3.3'teki sıra ile karıştırıldı.

Tablo 3.3 PZR reaksiyonu karışımı için kullanılan malzemeler ve miktarları.

1)dNTP (10mM)	0.5 µL
2)10x PZR Buffer (Magnezyumlu)	2.5 µL
3)10 pmol/ml internal kontrol reverse primer	1.0 µL
4)10 pmol/ml internal kontrol reverse primer	1.0 µL
5)10 pmol/ml 4G yada 5G aleline spesifik primer	1.0 µL
6)dH ₂ O	15.0 µL
7)Hasta DNA	4.0 µL
8)Taq polimeraz enzimi (5 ünite/µl)	0.1 µL

PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizmi için PZR döngü programı olarak tablo 3.4'te belirtilen sıcaklık ve süreler kullanılarak PZR gerçekleştirildi.

Tablo 3.4. PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizmi için PZR döngü programı

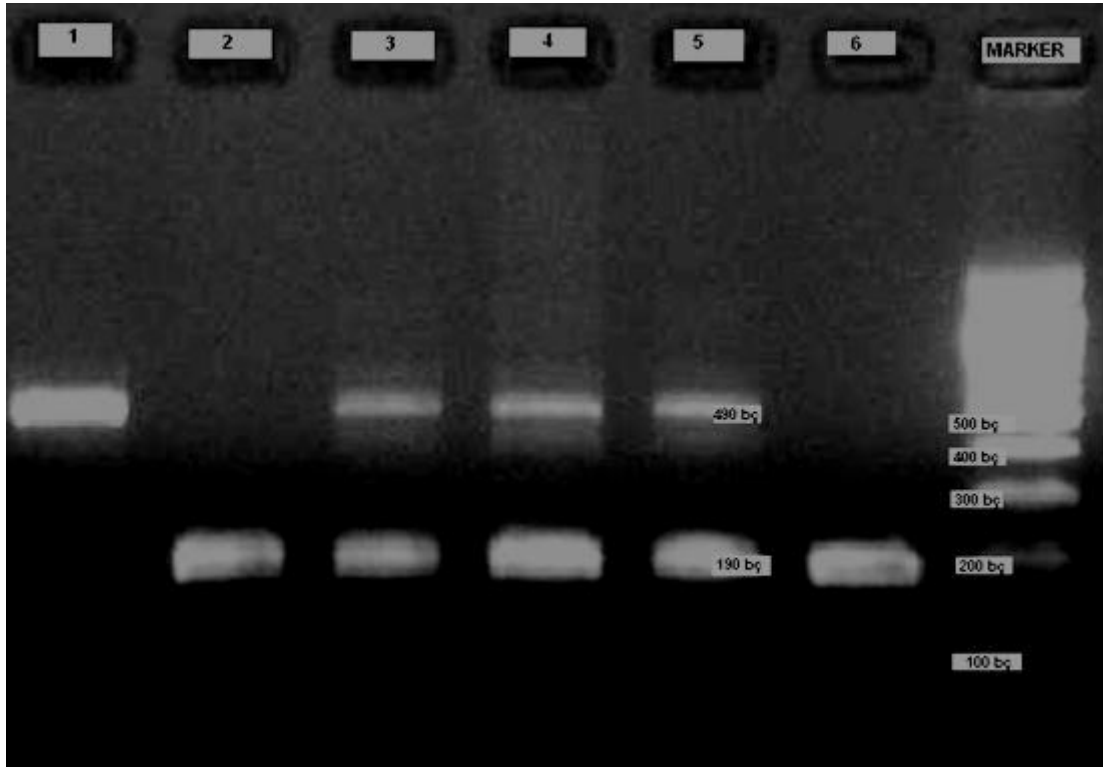
Kapak sıcaklığı, (cihaz tipine özel)	103°C,
1)Başlangıç denatürasyonu	94°C, 5 dakika
2)Denatürasyon	94°C, 1 dakika
3)“Annealing”	57°C, 1 dakika
4)“Extention”	72°C, 1 dakika
5)Son “Extention”	72°C, 10 dakika
(2,3 ve 4 işlemler sırasıyla 40 siklus)	

3.5 Agaroz Jel Elektroforez Protokolü

Agaroz Jel Elektroforezi, DNA ve PZR ürünlerinin ayrılması ve tanımlanması için kullanılan standart metodlardan biridir. Bu çalışmada PZR ile çoğaltılmış ürünlerin tanımlanması için %2'lik agaroz jel elektroforezi uygulandı. %2'lik jel hazırlanması için 5 mL 20xTris-Borik Asit-EDTA (TBE)

solüsyonu 95 ml dH₂O ile beher içinde karıştırıldı. Karışımın içine 2 gr agaroz eklendi. Çözelti mikrodalga fırında agaroz çözününceye kadar ısıtıldı. Eriyen jel içine 5 µL etidyum bromid eklenerek karıştırıldı. Jel elektroforez aparatına dökülerek soğumaya bırakıldı. Elektroforez tankı 0,5xTBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirildi. PZR ürünleri brom-fenol mavisi ile muamele edilerek agaroz jele yüklendi. 150V akımda 15 dk kadar yürütüldü.

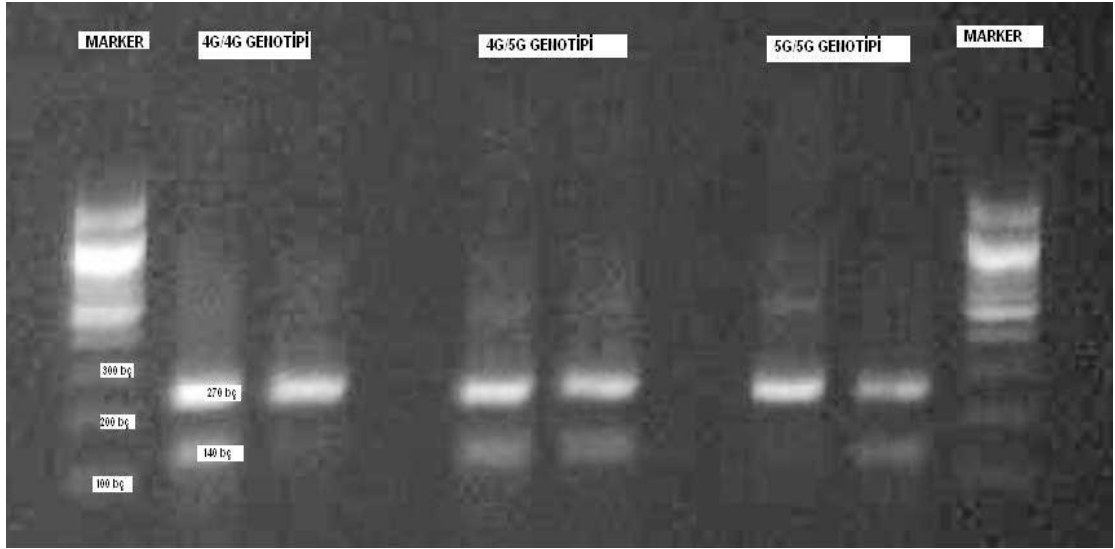
PZR reaksiyonu sonunda agaroz jelde yürütülen ürünler Ultraviyole (uv) transillüminatör kullanılarak analiz edildi. ACE geninin I/D polimorfizmindeki D allelinin 190 bç uzunluğunda PZR ürünü, I alleli için ise 490 bç uzunluğunda ürün oluşturması beklenmektedir. İncelenen agaroz jelde sadece 190 bç uzunluğunda bir bant varsa D/D genotipi, 190 bç ve 490 bç uzunluğunda bantlar varsa I/D genotipi ve sadece 490 bç uzunluğunda bir bant varsa I/I genotipi şeklinde genotiplenmeler yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: ACE geni PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Son kuyucuk 100 bç DNA ladder (Marker); 1 nolu kuyucuk I/I genotipine, 2 nolu ve 6 nolu kuyucuklar D/D

genotipine (190 bç) ve 3 nolu, 4 nolu ve 5 nolu kuyucuklar ise I/D genotipine (190bç, 490 bç) sahip olguları göstermektedir.

PAI-1 geni 4G/5G polimorfizmindeki 4G ve 5G allelleri için 140 bç uzunluğunda PZR ürünü ve 270 bç uzunluğunda internal kontrolün PZR ürünü oluşması beklenmektedir. İnternal kontrol ürünün olmadığı durumlarda PZR reaksiyonu tekrarlandı (Şekil-3.2).



Şekil 3.2: 4G/4G, 4G/5G ve 5G/5G genotipli olguların PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görünümü. (MARKER; 100 bç DNA ladder)

3.6 İstatistiksel Analizler:

Hasta ve kontrol gruplarının ACE I/D ve PAI-1 4G/5G polimorfizmlerinin karşılaştırılmasında Hardy Weinberg testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmeler Windows uyumlu SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences) istatistik programı ile bilgisayar ortamında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler kesikli veriler için sayı (%), sürekli veriler için ortalama±standart sapma olarak gösterildi. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyumları tek örnek Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirildi ve buna uygun test seçimi yapıldı. Grupların yaş karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi, gruplar arasında polimorfizm sıklıklarının karşılaştırılmasında

Ki-kare testleri kullanıldı. İstatistiksel kararlarda $p \leq 0.05$ düzeyi anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

3.7. Kullanılan Cihazlar

1. Buzdolabı (Arçelik-Türkiye)
2. Derin dondurucu (Arçelik-Türkiye)
3. Güç Kaynağı (Hofer-ABD)
4. Hassas terazi (Precisa-İsviçre)
5. Isı bloğu (Boeco-Almanya)
6. Manyetik karıştırıcı (Corning-Almanya)
7. Masaüstü vorteks cihazı (Retsch Mixer-Almanya)
8. Mikrodalga fırın (Bosch-Almanya)
9. Minisantrifüj cihazı (Sigma-ABD)
10. Santrifüj cihazı (ICE 4R-ABD)
11. UV transilüminatör (Synegene-ABD)
12. Yatay elektroforez cihazı (Serva-Almanya)
13. "Thermal cyclers" (Biorad-ABD)

3.8. Ticari kit ve kimyasallar

1. 100 bç DNA Leader (Bioron, Almanya)
2. Agaroz (Serva-Almanya)
3. Borik asit (Sigma-ABD)
4. DNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel-Almanya)
5. dNTP (deoksiribonükleotid) miks (Bioron-Almanya)
6. EDTA (Sigma-ABD)
7. Etanol (Merck- Almanya)
8. Etidyum bromür
9. $MgCl_2$ (Bioron-Almanya)
10. Primer sentezleri (Genosys Sigma)
11. PZR tamponu (Bioron-Almanya)
12. Taq DNA polimeraz (Bioron-Almanya)
13. Tris base (Sigma-ABD)

BULGULAR

Hasta grubunun yaş ortalaması 35.90 ± 15.98 ve kontrol grubunun yaş ortalaması 36.35 ± 7.47 idi. Hasta grubunda 58 (%72.5) erkek hasta ve 22 (%27.5) kadın hasta vardı. Kontrol grubu ise 54 (%68.4) erkek birey ve 25 (%31.6) kadın bireyden oluşmaktaydı.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ve cinsiyete göre dağılımı.

	Sayı (n=159)	Cinsiyet	P değeri	Yaş** Ort±SS	P değeri
Hasta grubu	80	58 E (%72.5)	0.567*	35.90±15.98	0.818***
		22 K (%27.5)			
Kontrol grubu	79	54 E (%68.4)		36.35±7.47	
		25 K (%31.6)			

* Ki-kare test; E=Erkek; K=Kadın **Ortalama±Standart Sapma ***Mann Whitney U test

Hasta ve kontrol grubu yaş ve cinsiyet açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla, $p=0.818$, $p=0.567$) (Tablo 4.1).

Hardy Weinberg denkleminde göre beklenen değerler ve gözlenen değerler Tablo 4.2'de görülmektedir. ACE I/I genotipinin beklenen değeri 33 iken, gözlenen değer 25'tir. ACE I/D genotipinin beklenen değeri 79, gözlenen değer ise 86'dır. ACE D/D genotipinin beklenen ve gözlenen değeri ise 48'dir. PAİ-1 polimorfizmi açısından 4G/4G genotipinin beklenen değeri 35, gözlenen değeri 32'dir. 4G/5G genotipi açısından beklenen ve gözlenen değeri 79'dur. 5G/5G genotipi için beklenen değer 45 iken gözlenen değer 48'dir. Hardy Weinberg denkleminde göre ACE ve PAİ-1 polimorfizmi açısından beklenen ve gözlenen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (sırasıyla, $p=0.479$, $p=0.891$) (Tablo4.2).

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubunun Hardy Weinberg denkleminde göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

		Beklenen	Gözlenen	P değeri
ACE geni I/D Polimorfizmi	I/I genotipi	33	25	0.479*
	I/D genotipi	79	86	
	D/D genotipi	48	48	
Toplam		159	159	
PAI-1 geni Polimorfizmi	4G/4G genotipi	35	32	0.891*
	4G/5G genotipi	79	79	
	5G/5G genotipi	45	48	
Toplam		159	159	

* Ki-kare test

Hasta ve kontrol grubunun ACE I/D gen polimorfizmi açısından değerlendirilmesi sonucunda; hastaların 15'i (%18.8) ACE I/I genotipine sahipken bu sayı kontrol grubunda 10 kişi (%12.7)'dir. ACE I/D genotipine hasta grubunda 44 (%55) kişi sahipken, kontrol grubunda 42 kişi (%53.2) ACE I/D genotipindedir. Hasta grubunda ACE D/D genotipine sahip 21 kişi (%26.3) bulunurken, bu genotip kontrol grubunda 27 kişi (%34.2)'dir.

ACE I/D polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması sonucunda aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. ACE geni I/D polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun değerlendirilmesi.

		Hasta Grubu (n=80)	Kontrol Grubu (n=79)	P değeri
ACE geni I/D Polimorfizmi	I/I genotipi	15 (%18.8)	10 (%12.7)	0.409*
	I/D genotipi	44 (%55.0)	42 (%53.2)	
	D/D genotipi	21 (%26.3)	27 (%34.2)	
* Ki-kare test				

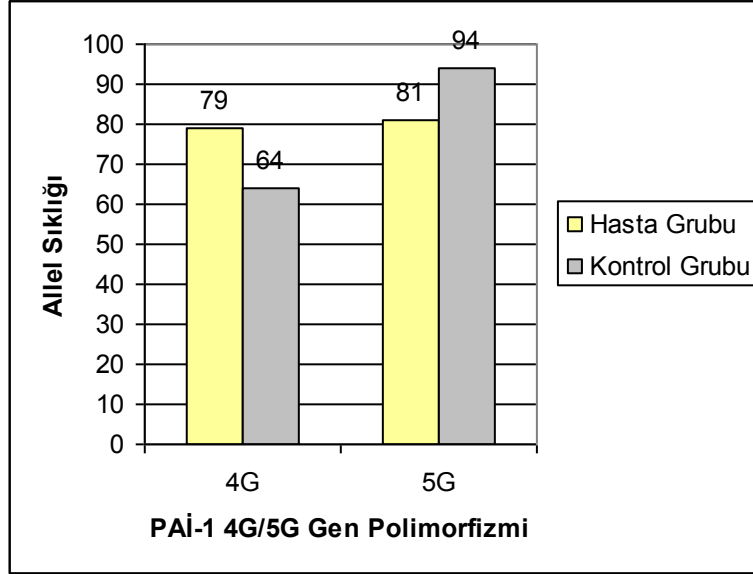
Hasta ve kontrol grubunun PAİ-1 polimorfizmi açısından karşılaştırılması sonucunda, hasta grubunda 4G/4G genotipine sahip 18 kişi (%22.5) bulunurken, kontrol grubunda 14 kişi (%17.7) bulunmaktadır. 4G/5G genotipi hasta grubunda 43 kişide (%53.8) varken, kontrol grubunda 36 kişide (%45.6) bulunmaktadır. 5G/5G genotipi ise hasta grubunda 19 kişide (%23.8), kontrol grubunda ise 29 kişide (%36.7) bulunmaktadır.

PAİ-1 polimorfizmi açısından, hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizmi açısından hasta ve kontrol grubunun değerlendirilmesi.

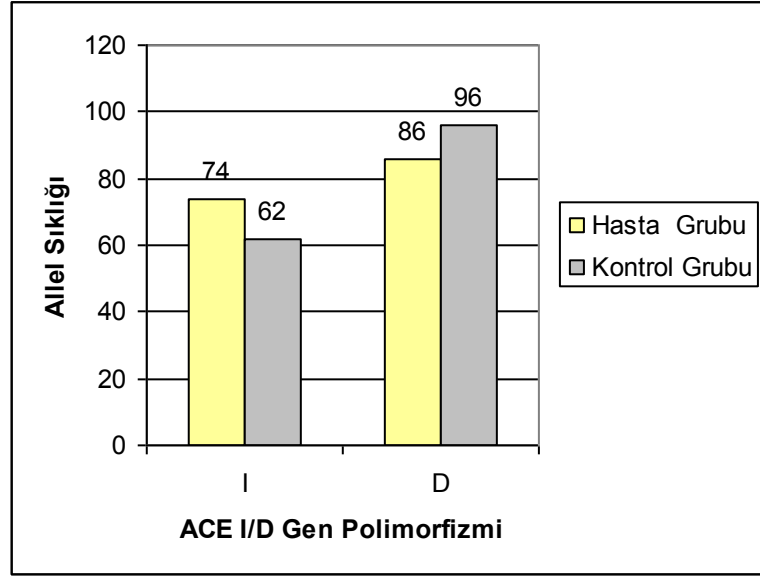
		Hasta grubu (n=80)	Kontrol Grubu (n=79)	P değeri
PAİ-1 geni 4G/5G Polimorfizmi	4G/4G genotipi	Sayı 18 (%22.5)	14 (%17.7)	0.202*
	4G/5G genotipi	Sayı 43 (%53.8)	36 (%45.6)	
	5G/5G genotipi	Sayı 19 (%23.8)	29 (%36.7)	
* Ki-kare test				

Hasta ve kontrol grubu, 4G/5G polimorfizmleri allel frekansları açısından incelendiğinde, hasta grubunda 4G alleli 79 (%49.4), 5G alleli 81 (%50.6) olarak saptandı. Kontrol grubunda ise 4G alleli 64 (%40.5), 5G alleli 94 (%59.5) olarak saptandı. Hasta ve kontrol grubu arasında 4G ve 5G allel frekansları açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.121$).



Şekil 4.1: Hasta ve kontrol gruplarında PAI-1 geni 4G/5G polimorfizminin allel sıklıklarının dağılımı.

Hasta ve kontrol grubu, I/D polimorfizmleri allel frekansları açısından incelendiğinde, hasta grubunda, I alleli 74 (%46.3), D alleli 86 (%53.7) olarak saptandı. Kontrol grubunda ise I alleli 62 (%39.2), D alleli 96 (%60.8) olarak saptandı. Hasta ve kontrol grubu arasında ACE I/D allel frekansları açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0.207$).



Şekil 4.2: Hasta ve kontrol gruplarında ACE geni I/D polimorfizminin allel sıklıklarının dağılımı.

TARTIŞMA

Venöz tromboembolizm (VTE), kalıtsal ve edinsel predispozan faktörlerin yanında, ileri yaşa, uzun süreli immobilizasyona, cerrahi girişimlere, malignitelere, antifosfolipid sendromuna, oral kontraseptif kullanımına ve hormon replasman tedavisine bağlı olarak oldukça yaygın görülen multifaktöriyel bir hastalıktır (73). Polimorfizmlere bağlı VTE gelişme riski, genetik zemin ve gen-çevre etkileşimi ile bağlantılı olabilir. VTE gelişiminde, birden çok genetik faktörün rol aldığı düşünülmektedir (74). Günümüzde VTE'nin etiyolojik değerlendirmesinde; FVL mutasyonu, Protrombin G20210A mutasyonu, MTHFR C677T (metilen tetrahidrofolat redüktaz) mutasyonu, MTHFR A1298C mutasyonu, MTHFR enzim eksikliği, açlık serum homosistein düzeyi, lupus antikoagülan (LA), antikardiyolipin antikoları (ACA), antitrombin eksikliği (AT), protein S eksikliği (PS) ve protein C eksikliğine (PC) bakılmaktadır (33, 75).

ACE ve PAİ-1, sırasıyla trombosit agregasyonu ve fibrinolizde fonksiyon gören önemli proteinlerdendir. Bu nedenle ACE ve PAİ-1 polimorfizmleri, trombotik risk oluşumundaki rolleri nedeniyle VTE'li olgularda araştırılan genetik belirteçler arasında yer almaktadır. Bu çalışmamızda, koagülasyon mekanizması üzerindeki etkilerinden dolayı, Türk popülasyonunda ACE I/D ve PAİ-1 4G/5G polimorfizmlerinin VTE gelişimindeki etkilerini ortaya koymayı amaçladık.

PAİ-1, hem doku plazminojen aktivatörünü hem de ürokinaz plazminojen aktivatörünü inaktive eden, plazmada bulunan bir inhibitördür. PAİ-1'in serum seviyeleri genetik faktörler ile ilişkili olup, yüksek serum seviyeleri, trombotik yatkınlığı arttırarak hipofibrinolitik durum oluşumuna katkıda bulunur. PAİ-1 geni 7. kromozomda lokalize olup, promotor bölgesinde yer alan 4G/5G polimorfizmi ile VTE arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur (3, 76, 77-80). Bu çalışmaların bazılarında PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizmi VTE ile ilişkili olarak saptanmışken, bir kısmında ise bu ilişki gösterilememiştir (76).

Tsantes ve ark.na göre, PAİ-1 4G/5G polimorfizmi, tromboza ailesel yatkınlığı olan hastalarda trombotik risk için önemli bir rol oynamaktadır (67).

Bu çalışmaya göre, 4G/5G polimorfizmi diğer predispozan genetik risk faktörleri ile birlikte olduğunda klinik belirtiler daha belirgin hale gelmektedir ve PAİ-1 4G/5G polimorfizmi, inme veya MI'a göre VTE gelişme riskini daha fazla arttırmaktadır.

Tsantes ve ark.nın yaptıkları bir diğer meta-analiz çalışmasında, 2644 VTE hastası ve 3739 kontrol vakası değerlendirilmiş olup, 4G alleli, yüksek PAİ-1 seviyesi ile bağlantılı bulunmuş ve 4G allel varlığının, özellikle diğer genetik risk faktörleri olmayan kişilerde venöz tromboz riskini artırdığı gösterilmiştir (76).

DVT'li hastalarda, PAİ-1 seviyesi ve PAİ-1 4G/5G polimorfizminin ilişkisini gösteren farklı popülasyonlarda yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Hindistan ve beyaz popülasyonlarda, DVT olguları ve PAİ-1 4G/5G polimorfizmleri arasındaki ilişkinin incelendiği iki farklı çalışmada, hasta gruplarında 4G allel sıklığı, kontrol gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur (81, 82).

Segui ve ark.nın 190 DVT hastası ve 152 sağlıklı kontrol grubunda yaptıkları PAİ-1 4G/5G polimorfizm çalışması sonucunda, hasta ve kontrol grupları arasında 4G ve 5G allel dağılımı açısından anlamlı bir fark gözlenmezken, 4G allel varlığının; diğer trombofilik defektleri olan hastalarda tromboz riskini önemli ölçüde arttırdığını saptamışlardır (79).

Ridker ve ark.nın, 374 MI, 121 VTE hastası ve 14.916 kontrol vakasından oluşan çalışmasında yukarıda bahsedilen çalışmalardan farklı olarak PAİ-1 4G/5G genotipi ve venöz tromboembolizm arasında anlamlı bir ilişki olmadığını saptamışlardır (77).

Türkiye'de de VTE'li hastalarda PAİ-1 gen polimorfizmini araştıran çalışmalar mevcuttur. Küpeli ve ark.nın 80 VTE (DVT ve PE) hastası ile 104 kontrol grubunda yaptıkları çalışmada, PAİ-1 genotipi açısından bir farklılık bulamamışlardır (83).

Oğuzülgen ve ark.nın, 143 pulmoner tromboemboli hastası ve 181 kontrol üzerinde yaptıkları çalışmada da PAİ-1 geni yönünden bir ilişki gözlememişlerdir (3).

Akar ve ark. 136 DVT ve 133 kontrol grubu üzerinde yaptıkları PAİ-1 4G/5G polimorfizm çalışması sonunda, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 4G/5G polimorfizminin trombotik risk üzerinde bir etkisi olmadığını saptamışlardır (84).

Gürgey ve ark. 50 Behçet hastası üzerinde yaptıkları PAİ-1 4G/5G polimorfizm çalışması sonucunda, tromboz gelişimi ile PAİ-1 4G/5G polimorfizmi arasında istatistiksel olarak bir ilişki saptamamışlardır (85).

Bizim, 80 VTE hastası ve 79 kontrol grubu üzerinde yaptığımız PAİ-1 gen polimorfizm çalışması sonucunda, hasta grubunda, 4G allel sıklığının daha fazla çıkmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi. Çalışma sonuçlarımız, diğer literatür çalışmaları ile birlikte değerlendirildiğinde, PAİ-1 4G/5G polimorfizminin diğer toplumlardan farklı olarak VTE gelişiminde bir rolü olmadığını düşündürmektedir. Bu sonuç, gen polimorfizmlerinin hastalık etiyopatogenezinde gen çevre etkileşimlerine bağlı olarak farklı etkiler oluşturabildiği savımızı destekler niteliktedir.

ACE, RAS'ta yer alan bir enzimdir. ACE, Anjiotensin I'i, vazokonstriktör bir madde olan, trombosit agregasyonunu ve aktivasyonunu arttırarak fibrinolizi inhibe eden Anjiyotensin II'ye dönüştürür. Bu enzim aynı zamanda potansiyel vazodilatatör bir madde olan ve inflamasyon oluşmasına aracılık eden bradikinini degrade eder (60).

ACE polimorfizmi ilk kez Rigat ve ark. tarafından tanımlanmış olup, D/D, I/D ve I/I olmak üzere üç farklı genotipi vardır (71, 73). ACE polimorfizminin VTE ile ilişkisi hakkında literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların bazılarında PAİ-1 geni 4G/5G polimorfizmi ile benzer şekilde VTE ve ACE I/D polimorfizmi arasında ilişki saptanmışken, bir kısmında ise bu ilişki gösterilememiştir.

Hsieh ve ark. 176 VTE hastası ve 321 kontrol grubunda, ACE I/D polimorfizmini karşılaştırdıkları çalışmada, ACE I/D polimorfizminin genotip dağılımında, VTE hastası ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark bulamamışlardır. Yine aynı çalışmada, D allel varlığının VTE gelişimine karşı koruyucu olabileceğini öngörmüşlerdir (86).

Hsiao ve ark. ACE ID polimorfizmi ile VTE arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla, 7000 birey üzerinde yapılmış 14 çalışmayı kapsayan bir meta analiz çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmaların 5'inde, ACE DD genotipi ile VTE gelişimi arasında ilişki saptanırken üç çalışmada DD genotipinin VTE'ye karşı koruyucu olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer 6 çalışmada ise istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar saptayamamışlardır (74). Çalışma grupları arasındaki bu farklılıkların, etnik heterojenite, çalışma düzeni farklılıkları, çalışmaya dahil olan hastaların geniş spektrumlu özellikleri, gen-gen ve gen-çevre etkileşimlerinden kaynaklanabileceğini ifade ederek, ACE ID polimorfizmi ile VTE riski arasında pozitif bir ilişki olmadığı tespitinde bulunmuşlardır.

Lu ve ark.nın 72 PE hastası ve eşit sayıda kontrolden oluşan Çin popülasyonunda ACE I/D polimorfizmini araştırdıkları çalışmada, DD genotip taşıyan bireyler için pulmoner tromboemboli riskini artırdığını saptamışlardır. Aynı çalışmada, Asyalı bireyler arasında II genotipinin diğer etnik gruplara göre yüksek prevalansa sahip olduğunu göstermişlerdir (87).

Fatini ve ark. 336 VTE hastası ve 378 sağlıklı kontrol grubundan oluşan İtalyan popülasyonunda yaptıkları çalışmada, ACE DD gen polimorfizmi ile VTE arasında anlamlı bir ilişki saptamışlardır (2).

Philipp ve ark. 85 kalça artroplastili VTE hastası ile 43 kontrol olgusunda yaptıkları araştırmada, trombotik olayların ACE D/D genotipli olgularda ACE I/I genotipine göre 10 kat, ACE I/D genotipine sahip olgularda ise ACE I/I genotipli olgulara göre 5 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, ACE polimorfizminin kalçaya yönelik artroplastisi yapılan olgularda tromboz yönünden bir risk olabileceğini bildirmiştir (88).

Köppel ve ark. VTE tanılı 330 hasta ile 354 kontrol üzerinde yaptıkları çalışmada, ACE I/D polimorfizminin derin ven trombozu için önemli bir risk faktörü olmadığını tespit etmişlerdir (89).

Ay ve ark. 100 VTE hastası ve 125 kontrol grubunda yaptıkları ACE I/D polimorfizm çalışması sonucunda, serum ACE düzeyleri ile ACE I/D polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki saptayamamışlardır (90).

Pulmoner emboli olgularında ACE polimorfizmi, başlıklı uzmanlık tez çalışmasında, 73 pulmoner emboli hastası ve 73 sağlıklı kontrol, ACE gen polimorfizmi ile PE arasındaki ilişki yönünden araştırılmış ve ACE I/D gen polimorfizmi ile PE arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (5).

Berdeli ve ark. 1063 sağlıklı birey üzerinde ACE I/D polimorfizm sıklığını araştırdıkları çalışma ile ACE II genotip sıklığını %16.1, ID genotip sıklığını %47.7, ve DD genotip sıklığını %36.2 bulmuşlardır. ACE I/D gen polimorfizm sıklığının benzer olduğunu saptamışlardır (91). Çalışmamızda yer alan kontrol grubu hastalarında Berdeli ve ark. çalışması ile benzer şekilde, ACE II genotip sıklığı %12.7, ACE ID genotip sıklığı %53.2, ACE DD genotip sıklığı ise %34.2 olarak tespit edilmiştir. İki çalışma arasındaki sapmalar, olgu sayılarının farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bununla birlikte benzer sonuçların elde edilmiş olması sağlıklı popülasyonda ACE I/D polimorfizminin sıklığı hakkında bilgi verici niteliktedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

VTE'li olgularda ACE I/D ve PAİ-1 4G/5G polimorfizmlerini incelediğimiz çalışmamızda;

1. ACE I/D polimorfizmi ile VTE arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).
2. PAİ-1 4G/5G polimorfizmi ile VTE arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tıbbi literatürde yaptığımız araştırma sonucunda, bildiğimiz kadarıyla toplumumuzda VTE olgularında hem ACE I/D hem de PAİ-1 4G/5G polimorfizminin birlikte çalışıldığı bir literatür verisi bulunmamaktadır. Çalışmamız bu yönüyle farklılık göstermektedir.

Çalışma sonuçlarımız ACE I/D ve PAİ-1 4G/5G polimorfizmleri ile VTE gelişimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını gösterse de daha yüksek ölçekli hasta ve kontrol grubu ile bu çalışmanın genişletilerek yapılması, toplumumuzda görülen VTE olguları ile ilgili polimorfizmlerin ilişkisinin ortaya konulmasında daha sağlıklı verilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Altay, Ş., Venöz Tromboembolizm Tanı ve Tedavisinde Yenilikler, İç Hastalıkları Dergisi, 03-2006.
2. Fatini, C., Gensini, F., Sticchi, E. Battaglini, B., Prisco, D., Fedi, S., Brunelli, T., Marcucci, R., Conti, A A., Gensini, G F., Abbate, R. ACE DD genotype: an independent predisposition factor to venous thromboembolism. European Journal of Clinical Investigation. 33, 642–647, 2003.
3. Oğuzülgen, K., Demirtaş, S., Erkeköl, F O., Ekim, N., Demir, N., Numanoglu, N., Özel, D., Ulu, A., Akar, N., The Role of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Polymorphism, Factor-V-Leiden, and Prothrombin-20210 Mutations in Pulmonary Thromboembolism. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis Volume 15, Number 1, 73-77, 2009.
4. Mitchell RN, Cotran RS. Hemodynamic disorders, thrombosis and shock. In: Cotran RS (ed). Robbins pathologic basis of disease. 6th edition. Philadelphia: WB Saunders. 13–130, 1999.
5. Yeşilkaya, S., Pulmoner Tromboemboli Olgularında Anjiyotensin Konverting Enzim Gen Polimorfizmi. Göğüs Hastalıkları AD Uzmanlık Tezi. Uludağ Üni. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD. Bursa, 2009.
6. Kumar, V., Cotran, R S., Robbins, S L., Basic Pathology (Temel Patoloji), 7. Edisyon Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2003.
7. Mustafa, S., Stein, PD., Patel, KC., Otten, TR., Holmes, R., Silbergleit, A., Upper Extremity Deep Venous Thrombosis. Chest. 123(6), 1953-1956 2003.
8. Martinelli, I., Battaglioli, T., Bucciarelli, P., Passamonti, SM., Mannucci, PM., Risk Factors and Recurrence Rate of Primary Deep Vein Thrombosis of the Upper Extremities. Circulation. 110(5), 566-570, 2004.
9. Anderson, FA., Wheeler, HB., Goldberg, RJ., ve ark. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. Arch Intern Med. 151, 933-938, 1991.

10. Forster, AJ., Wells, PS., The rationale and evidence for the treatment of lower-extremity deep venous thrombosis with thrombolytic agents. *Curr Opin Hematol.* (9) 437-442, 2002.
11. Yenerman, M., Genel patoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 526–34, 1994.
12. Fedullo, PF., Pulmonary Thromboembolism. In: Murray JF, Nadel JA (eds). *Textbook of Respiratory Medicine*. 3th edition. Philadelphia: Saunders Company. 1503–30, 2000.
13. Dalen, JE., Pulmonary embolism: What have we learned since Virchow? *Chest* 122, 1440-6, 2002.
14. Sandler, DA., Martin, JF., Autopsy proven pulmonary embolism in hospital patients: are we detecting enough deep vein thrombosis? *J R Soc Med.* 82, 203-5, 1989.
15. Kistner, RL., Ball, JJ., Nordyke, RA., Freeman, GC., Incidence of pulmonary embolism in the course of thrombophlebitis of the lower extremities. *Am J Surg.* 124, 169-76, 1972.
16. Goldhaber, SZ., Elliott, CG., Acute pulmonary embolism: Epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Circulation.* 108, 2726-9, 2003.
17. Özsu, S., Özlü, T., Bülbül, Y., Ulusal verilerle pulmoner tromboemboli. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi.* 57-4, 466-82, 2009.
18. Hooper, WC., De Staercke, C., The relationship between FV Leiden and pulmonary embolism. *Respir Res.* 3, 8, 2002.
19. Herold ve ark. Pulmonary embolism: pulmonary vascular disorders, vasculitides, and hemorrhage. *Comprehensive respiratory medicine.* Philadelphia: Mosby. 1-12, 1999.
20. Arseven, O., Venöz Tromboembolizm. *TTD Akciğer Hastalıkları Temel Bilgiler Kitabı.* 2006.

- 21.** Turan M. Pulmoner tromboemboli olgularında genetik risk faktörlerinin araştırılması, Göğüs Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üni. Tıp Fakültesi, İzmir, 2010.
- 22.** Emadi, A., Streiff, M., Diagnosis and Management of Venous Thromboembolism: An Update A Decade into the New Millennium. Archives of Iranian Medicine, Volume 14, Number 5, 2011.
- 23.** Silverstein, MD., Heit, JA., Mohr, DN., Petterson, TM., O'Fallon, WM., Melton, LJ., Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. Arch Intern Med. 158, 585–593, 1998.
- 24.** Lindblad, B., Sternby, NH., Bergqvist, D., Incidence of venous thromboembolism verified by necropsy over 30 years. BMJ. 302(6778), 709-711, 1991.
- 25.** Nordstrom, M., Lindblad, B., Bergqvist, D., Kjellstrom, T., A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. J Intern Med. 232(2), 155-160, 1992.
- 26.** Torbicki, A., Van Beek, EJR., Charbonnier, BM., ve ark. Task Force Report. Guidelines on Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism. Eur Heart J. 21,1301–36, 2000.
- 27.** Goldhaber, SZ., Pulmonary Embolism. Lancet 363, 295–305, 2004.
- 28.** Montagnana, M., Favaloro, EJ., Franchini, M., Guidi, GC., Lippi, G., The role of ethnicity, age and gender in venous thromboembolism. J Thromb Thrombolysis. 29(4), 489-496, 2010.
- 29.** Cheuk, BL., Cheung, GC., Cheng, SW., Epidemiology of venous thromboembolism in a Chinese population. Br J Surg. 91(4), 424-428, 2004.
- 30.** Kishimoto, M., Lim, HY., Tokuda, Y., ve ark. Prevalence of venous thromboembolism at a teaching hospital in Okinawa, Japan. Thromb Haemost. 93(5), 876-879, 2005.

- 31.** White, RH., Zhou, H., Romano, PS., Incidence of idiopathic deep venous thrombosis and secondary thromboembolism among ethnic groups in California. *Ann Intern Med.* 128(9), 737-740, 1998.
- 32.** Keenan, CR., White, RH., The effects of race/ethnicity and sex on the risk of venous thromboembolism. *Curr Opin Pulm Med.* 13(5), 377-383, 2007.
- 33.** Şişli, E., VTE'li olguların klinik nitelik, risk faktörleri ve genetik mutasyonlar açısından değerlendirilmesi, Kalp ve Damar Cerrahisi AD Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üni. Kalp ve Damar Cerrahisi AD., İzmir, 2010.
- 34.** McGlennen, RC., Key, NS., Clinical and laboratory management of the prothrombin G20210A mutation. *Arch Pathol Lab Med.* 126(11), 1319-1325, 2002.
- 35.** Romero, A., Alonso, C., Rincon, M., ve ark. Risk of venous thromboembolic disease in women a qualitative systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 121(1), 8-17, 2005.
- 36.** Oger, E., Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost.* 83(5), 657-660, 2000.
- 37.** Toglia, MR., Weg, JG., Current concepts: Venous thromboembolism during pregnancy. *N Engl J Med.* 335, 108–14, 1996.
- 38.** Herold ve ark. Pulmonary embolism: pulmonary vascular disorders, vasculitides, and hemorrhage. *Comprehensive respiratory medicine.* Philadelphia: Mosby, 1-12, 1999.
- 39.** Atahan, E., Çağlar, E., Şarkış, C., Uğurlu, S., Venöz tromboemboli ve kalıtsal trombofili. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg.* 17, 302-311, 2009.
- 40.** Nizankowska-Mogilnicka, E., Adamek, L., Grzanka, P., Domagala, T.B., Sanak, M., Krzanowski, M., Szczeklik, A., Genetic polymorphisms associated with acute pulmonary embolism and deep venous thrombosis. *Eur Respir J.* 21, 25-30, 2003.

41. Price, TD., Ridker, MP., Factor V Leiden Mutation and the Risks for Thromboembolic Disease. *Ann Intern Med.* 127, 895–903, 1997.
42. Poort, S., Rosendaal, F., Reitsma, P., Bertina, R., A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 88(10), 3698-3703, 1996.
43. Tirado, I., Mateo, J., Soria, J., ve ark. Contribution of prothrombin 20210A allele and factor V Leiden mutation to thrombosis risk in thrombophilic families with other hemostatic deficiencies. *Haematologica.* 86(11), 1200-1208, 1996.
44. Ho, WK., Hankey, GJ., Quinlan, DJ., Eikelboom, JW., Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with common thrombophilia: a systematic review. *Arch Intern Med.* 166(7), 729-736, 2006.
45. Den Heijer, M., Lewington, S., Clarke, R., Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost.* 3(2), 292-299, 2005.
46. Kluijtmans, LA., Heijer, M., Reitsma, PH., Heil, SG., Blom, HJ., Rosendaal, FR., Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost.* 79(2), 254-258, 1998.
47. Türk Toraks Derneği Pulmoner Tromboembolizm Tanı Ve Tedavi Uzlaşı Raporu. *Türk Toraks Dergisi Cilt 10, Ek 11,* 2009.
48. Lane, D., Olds, RR., Thein, SL., Antitrombin and its deficiency states. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 3, 315, 1992.
49. Cooper, PC., Coath, F., Daly, ME., Makris, M., The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. *International Journal of Laboratory Hematology.* 33, 227–237, 2011.
50. Cushman, M., Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol.* 44(2), 62-69, 2007.

- 51.** Douketis, JD., Ginsberg, JS., Diagnosis of deep vein thrombosis. *Can Fam Physician.* 42, 497-503, 1996.
- 52.** Peterson, CW., Venous thrombosis: an overview. *Pharmacotherapy.* 6(4, 2), 12-17, 1986.
- 53.** Janssen, MC., Wollersheim, H., Diagnosis of deep vein thrombosis, an overview. *Neth J Med.* 48 (3), 109-21. 1996.
- 54.** Gülcü, A., Akkoçlu, A., Pulmoner emboli tanısında klinik olasılıkların bilgisayarlı tomografi pulmoner anjiyografi bulguları ile karşılaştırılması. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi.* 55 (2), 174-181, 2007.
- 55.** Goldhaber, S., Ruth, B., Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. *Circulation-Journal association.* 2002.
- 56.** Ekmekçi, A., Konaç, E., Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık Marmara Medical Journal. cilt 21, sayı 3, 2008.
- 57.** Strachan, T., Read, P., A. Human Molecular Genetics 3, Third ED, Garland Science London and New York, 316-321, 2004.
- 58.** Muller, M., Gruhn, K., Lange, S., Franke, FE., Müller, KM., Angiotensin Converting Enzyme in the Regular Pulmonary Vasculature. *Pathology.* 25, 141-6, 2004.
- 59.** Turgut ,S., Anjiotensin dönüştürücü enzim ve I/D polimorfizmi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 12 (4), 53-57, 2005.
- 60.** Fu-Chih, H., Lung-An, H., Meta-analysis of association between insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene and venous thromboembolism. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 17 (1), 51-57, 2005.
- 61.** Lin, L., Finn, L., Angiotensin-converting Enzyme, Sleep-disordered Breathing, and Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical care Medicin.* 170-12, 2004.
- 62.** Bostan, C., Karcier, S., Anjiyotensin dönüştürücü enzim geni polimorfizmi ve kardiyovasküler hastalıklar. *Türk Kardiyoloji Dern. Arş.* 30, 441-448, 2002.

- 63.** Engel, A., Morcillo, L., Influence of Gender and Genetic Variability on Plasma Angiotensin Peptides. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* 7, 92, 2006.
- 64.** Cesari, M., Pahor, M., Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): A key factor linking fibrinolysis and age related subclinical and conditions. *Cardiovasc Ther.* 28(5), 72–91, 2010.
- 65.** Özener, Ç., Karışık, E., Kronik diyaliz hastalarında anjiyotensin dönüştürücü enzim gen polimorfizmi ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 ile ilişkisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi / Official Journal of the Turkish Nephrology Association.* 3,151-156, 2000.
- 66.** Haas, E., Zwart, N., Association of PAI-1 Gene Polymorphism With Survival and Chemotherapy-Related Vascular Toxicity in Testicular Cancer. 2010.
- 67.** Tsantes, A., Nikolopoulos, G., Bagos, PG., Bonovas, S.,Kopterides, P., Vaiopoulos, G., The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. *Thrombosis Research.* 122, 736–742, 2008.
- 68.** Deligezer, U., Akışık, E., Gen Polimorfizm Analizinde LightCycler Floresan PCR Tekniğinin Kullanılması: Myeloid Lösemili Çocuk ve Yetişkin Hastalarda MTHFR C677T Gen Polimorfizm Dağılımının Belirlenmesi. *Türk Onkoloji Dergisi.* Cilt 19, Sayı 4, 2004.
- 69.** Karaca, E. Koroner Arter Hastalarında İnterlökin 10 Gen Polimorfizminin Araştırılması, Ege Üni. Sağlık Bilimleri Enst., Doktora Tezi, İzmir, 2007.
- 70.** Buğan, B., Genç Erişkin (<45 yaş) Akut Koroner Sendrom Hastalarında Hiperkoagülopati ile İlişkili Gen Mutasyonları, Kardiyoloji AD. Uzmanlık Tezi, GATA Kardiyoloji AD., Ankara, 2010.
- 71.** Rigat, B., Hubert, C., Corvol, P., Soubrier, F., PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res.* 20(6), 1433, 1992.

- 72.** Muetze, S., Eggermann, T., Leeners, B., Birke, C., Kuse, S., Ortlepp, JR., Rudnik-Schoeneborn, S., Zerres, K., Rath, W., The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with HELLP syndrome. *J Thromb Thrombolysis*. 27 (2), 141-5, 2009.
- 73.** Munhoz, T.P., Scheibe, R M., Schmitt, V.M., Angiotensin converting enzyme (ACE) DD genotype: relationship with venous thrombosis. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 27(2), 87-90, 2005.
- 74.** Hsiao, FC., Hsu, LA., Meta-Analysis of Association Between Insertion/Deletion Polymorphism of the Angiotensin I-Converting Enzyme Gene and Venous Thromboembolism. *Clin Appl Thromb Hemost.* 17, 51, 2011.
- 75.** Caprini, JA., Goldshteyn, S., Glase, CJ., Hathaway, K. Thrombophilia testing in patients with venous thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 30(5), 550-5, 2005.
- 76.** Tsantes, AE., Nikolopoulos, GK., Bagos, PG., Rapti, E., Mantzios, G., Kapsimali, V., ve ark. Association between the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 97, 907–13, 2007.
- 77.** Ridker PM, Hennekens CH, Lindpainter K, Stamfer 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.* 95, 59–62, 1997.
- 78.** 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.* 79 (5), 975-979, 1998.
- 79.** Segui, R., Estelles, A., Mira, Y., Espana, F., Villa, P., Falco, C., ve ark. PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *Br J Haematol.* 111 (1), 122-8, 2000.

- 80.** Sartori, MT., Danesin, C., Saggiorato, G., Tormene, D., Simioni, P., Spiezia, L., ve ark. The PAI-1 gene 4G/5G polymorphism and deep vein thrombosis in patients with inherited thrombophilia. *Clin Appl Thromb/Hemost.* 9, 299–307, 2003.
- 81.** Akhter, MS., Biswas, A., Ranjan, R., Meena, A., Yadav, BK., Sharma, A., Saxena, R., Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene 4G/5G Promoter Polymorphism is Seen in Higher Frequency in the Indian Patients With Deep Vein Thrombosis *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* Volume 16 Number 2, 184-188, 2010.
- 82.** Mansfield, MW., Stickland, MH., Grant, PJ., Environmental and genetic factors in relation to elevated circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1 in Caucasians patients, with non insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost.* 74, 842-847, 1995.
- 83.** Kupeli, E., Verdi, H., Şimşek, A., Ataç, F., Eyuboglu, F., Genetic Mutations in Turkish Population With Pulmonary Embolism and Deep Venous Thrombosis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 17 (6), 87-94, 2011.
- 84.** Akar, N., Yilmaz, E., Akar, E., Avcu, F., Yalçın, A., Cin, S. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thrombotic patients with and without FV1691 G-A. *Thromb Res.* 97 (4), 227-30, 2000.
- 85.** Gurgey, A., Balta, G., Boyvat, A. Factor V Leiden mutation and PAI-1 gene 4G/5G genotype in thrombotic patients with Behcet's disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 14 (2), 121-4, 2003.
- 86.** Hsieh, CA., C., Ko, YL., Hsu, TS., Chang, CJ., Teng, MS., Wu, S., Hsu, LA., Angiotensin-I Converting Enzyme Gene Polymorphisms and the Risk of Venous Thromboembolism in an Ethnically Chinese Population Living in Taiwan. *Acta Cardiol Sin.* 27, 2528, 2011.

- 87.** Lu, Y., Hui, R., Zhao, Y., Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene and pulmonary thromboembolism in Chinese population. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 24, 265-8, 2001.
- 88.** Philipp, CS., Dilley, A., Saidi, P., Evatt, B., Austin, H., Zawadsky, J., Harwood, D., Ellingsen, D., Barnhart, E., Phillips, DJ., Hooper, WC., Deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene as a thrombophilic risk factor after hip arthroplasty. *Thromb Haemost.* 80 (6), 869-73, 1998.
- 89.** Köppel, H., Renner, W., Gugl, A., Cichocki, L., Gasser, R., Wascher, TC., Pilger, E. The angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism is not related to venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 91 (1), 76-9, 2004.
- 90.** Ay, C., Bencur, P., Vormittag, R., Sailer, T., Jungbauer, C., Vukovich, T., Mannhalter, C., Pabinger, I., The angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and serum levels of angiotensin-converting enzyme in venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 98 (4), 777-82, 2007.
- 91.** Berdeli, A., Çam, S. Prevalence of the Angiotensin I Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism in a Healthy Turkish Population. *Biochem Genet.* 47 (5-6), 412–420, 2009.