

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

**GEN DEĞİŞİMLERİNİN PULMONER EMBOLİDEKİ
ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Numan Numanoglu

Yardımcı araştırmacılar:

Prof. Dr. Nejat Akar

Uzm. Dr. Ferda Öner

Proje No: 2001-08-09-060

Başlama Tarihi: 15 Eylül 2001

Bitiş Tarihi: 15 Eylül 2003

Rapor Tarihi: 15 Aralık 2003

**Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara 2003**

PULMONER EMBOLİDE TROMBOFİLİK RİSK FAKTÖRLERİNİN ROLÜ

ÖZET

Giriş: Venöz tromboemboli, tüm dünyada mortalite ve morbiditenin önemli nedenlerinden biridir. Risk altındaki grubun belirlenmesinde kullanılabilecek risk faktörlerinin tanımlanması mortalitenin azaltılmasında önemli olacaktır.

Bu çalışmada, faktör V Leiden, protrombin G20210A mutasyonlarının ve artmış faktör VIII ve IX düzeyinin pulmoner embolide risk faktörü olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Metot ve sonuçlar: 64 pulmoner emboli ve 64 kontrol olgusu çalışmaya dahil edilmiştir. Pulmoner emboli olguları izole pulmoner emboli olguları (n: 26) ve derin ven trombozu ile birlikte pulmoner embolisi olan olgular (n: 38) olmak üzere iki grupta ele alınmıştır.

Kontrol ve pulmoner emboli olguları arasında faktör V Leiden, protrombin G20210A mutasyonları varlığı ve artmış faktör IX düzeyleri açısından farklılık tespit edilmemiştir. Kontrol olgularının 90 persentili cutoff değeri (168 U/dL) olarak kullanıldığında, faktör VIII düzeyinin 168U/dL'nin üzerinde olmasının bu değer altında olmaya göre hem izole pulmoner emboli hem de pulmoner emboli ve derin ven trombozu gelişimi açısından yaklaşık 11 kat risk oluşturduğu görülmüştür. Bu risk, diğer olası risk faktörlerine (yaş, cinsiyet, faktör V Leiden, protrombin G20210A varlığı, artmış faktör IX düzeyi) göre düzeltme yapıldıktan sonra da devam etmektedir.

Sonuç: Artmış faktör VIII düzeyi pulmoner emboli gelişimi için önemli ve bağımsız bir risk faktörüdür.

THE ROLE THROMBOPHILIC RISK FACTORS IN PULMONARY EMBOLISM

SUMMARY

Objective: Venous thromboembolism is one of the most common causes of morbidity and mortality in the world. The identification of hemostatic variables that could identify those at risk would be important in reducing mortality.

In this study we aimed to investigate whether factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, elevated levels of factor VIII and factor IX are associated with pulmonary embolism.

Method and results: Sixty-four patients with objectively documented pulmonary embolism and 64 control subjects were included in this study. We divided 64 subjects with PE by separately analysing those with PE and DVT (n: 26) and those with PE and without DVT (n: 38).

There was no significant difference between the pulmonary embolism patients and the control subjects with regard to the presence factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations and elevated levels of factor IX. Using the 90th percentile measured in control subjects (P₉₀: 168 U/dL) as a cutoff point for factor VIII levels, we found a 11 fold increased risk for both isolated pulmonary embolism patients and pulmonary embolism and deep vein thrombosis patients who have factor VIII levels above 186 U/dL compared with individuals having factor VIII levels below this cutoff point. The risk was not effected by adjustment for other possible risk factors. (age, sex, presence of factor V Leiden and prothrombin G20210A, high levels of factor IX).

Conclusion: Elevated plasma levels of factor VIII are a significant, independent risk factor for pulmonary embolism.

2. AMAÇ VE KAPSAM

Venöz tromboemboli (VTE) her 1000 kişiden 1-2'sinde görülen oldukça sık karşılaşılan bir hastalıktır. Kardiyovasküler hastalıklar arasında iskemik kalp hastalıkları ve inmeden sonra 3. sırayı alır. ABD'de yılda 300.000 hastane yatışının ve 50.000 ölümün nedenidir. Genel klinik ortaya çıkışı alt ekstremitte venlerinde oluşan derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner embolidir (PE). Daha nadir olarak retinal venler, intraabdominal venler, üst ekstremitte venleri, santral sinir sistemi venleri de tutulabilir. (1,2)

VTE gelişimine zemin hazırlayan kazanılmış risk faktörleri (İleri yaş, immobilizasyon, kanser, ameliyat, gebelik, vb) oldukça iyi tanımlanmıştır. Ancak bu risk faktörlerini taşıyan herkeste VTE gelişmemesi ve bu risk faktörleri olmayan bireylerde de VTE gelişebilmesi kalıtsal olabilecek risk faktörlerinin varlığına dikkat çekmiştir. Moleküler patoloji tekniklerinin son 20 yılda ilerlemesi sayesinde, moleküler değişikliklerin tromboz oluşumundaki rolünün aydınlatılması çalışılması hız kazanmıştır. Bu konuda incelenen genetik farklılıklar arasında en iyi bilinenler faktör V Leiden ve protrombin G20210A mutasyonlarıdır. Kuagülasyon faktörleri arasında ise faktör 8 ve 9 yükseklikleri üzerinde çalışmalar mevcuttur.

Faktör V geninde nükleotid 1691 pozisyonunda oluşan tek nokta mutasyonu aktive Protein C resistansının büyük çoğunluğundan sorumludur. Bu mutasyonda Adenin yerine Guanin geçmesi, 506. aminoasit pozisyonundaki arjinin aminoasidinin glutamin ile yer değiştirmesi ile sonuçlanır. Mutant faktör V, faktör V Leiden olarak bilinir, veya FVR506Q, FV:Q506 olarak adlandırılır (3) Faktör V Leiden, ilk kez DVT geçiren olguların %18'inde (4) tespit edilmiştir. Bu oran ailevi trombofili olgularında %40'a kadar artmaktadır. (3) Bir çok çalışma faktör V Leiden ve

tromboz gelişimi arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Elde olan verilerden genel olarak faktör V Leiden heterozigotluğunun VTE riskini 3-8 kat arttırdığı söylenilebilir (5,6,78). Homozigotlar için bu risk 80 kattır (4). Faktör V Leiden DVT için risk faktörü olmanın yanı sıra serebral ven trombozu (9) ve yüzeysel ven trombozu (10) ile de ilişkilendirilmiştir. Ancak ilginç olarak izole PE (DVT olmaksızın) ile ilgili belirgin bir ilişki ortaya konulamamıştır (11,12,13,14)

Prothrombin (Faktör II) karaciğer tarafından üretilen ve fibrinojenin fibrine dönüşümünde kilit rol oynar. Prothrombin mutasyonu 20210 pozisyonunda oluşan bir nokta mutasyonudur (G→A) ve serum faktör II düzeyinde artışa yol açar. VTE olgularının %6-18'inde gözlenir. Yapılan çalışmalarda VTE riskini 2-5 kat arttırdığı konusunda çalışmalar olmakla birlikte bu konu netlik kazanmamıştır. (15,16,17)

Artmış faktör 8 düzeyi VTE için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Artmış faktör 8 ve tromboz arasındaki ilişki ilk kez 1995 yılında Koster ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur. Bu çalışmada 150 IU/dL'nin üzerindeki faktör 8 düzeylerinin venöz tromboz riskini 4.8 kat arttırdığı ortaya konulmuştur (18). Venöz trombozu olan kişilerde artmış faktör 8 düzeyi oranının %19-33 olduğu düşünülmektedir (18,19).

Faktör 9 düzeyindeki artışın venöz tromboemboli ile ilişkisini olup olmadığı, bu konuda yeterli çalışma olması nedeni ile netlik kazanmamıştır. van Hylekama ve arkadaşları, 426 DVT olgusu ve sağlıklı 473 kontrol vakasından oluşan çalışmalarında faktör 9 düzeyi 129 IU/dl'nin üzerinde olan olgularda faktör 9 düzeyi bu değer altında olan olgulara göre VTE riskini 3 kat fazla bulunmuştur (20).

Bu alışma, PE oluşumu için faktör V Leiden ve protrombin G20210A mutasyonlarının ve artmış faktör 8 ve 9 düzeylerinin Türk toplumunda risk oluşturup oluşturmadığını ortaya koymaya yönelik planlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra Helsinki Deklarasyonu Kuralları'na uygun olarak yapılmıştır. Çalışmaya katılan bütün olgulardan bilgilendirilmiş onay alınmıştır.

3.1. Olgular

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Anabilim Dalı'nda yatarak tetkik edilen ve PE tanısı konulan 64 olgu ve 64 sağlıklı kontrol olgusu çalışmaya dahil edilmiştir.

PE tanısı; Ankara Üniversitesi Radyodiagnostik Anabilim Dalı tarafından spiral toraks BT (Bilgisayarlı tomografi) anjiyografide PE bulgusunun olması ve/veya V/P (Ventilasyon/perfüzyon) sintigrafisinde yüksek olasılıklı PE tespit edilmesi ile konulmuştur. PE olguları DVT olup olmamasına göre 2 gruba ayrılarak incelenmiştir. DVT tanısı; bu çalışmada Ankara Üniversitesi Radyodiagnostik Anabilim Dalı tarafından alt ekstremitte venöz renkli doppler ultrasonografide tromboz bulgularının tespit edilmesi ile konulmuştur.

Kontrol grubu; VTE hikayesi olmayan sağlıklı kişilerden oluşturulmuştur.

3.2. Örneklerin Toplanması ve Laboratuvar Analizleri

3.2.1 Mutasyonların İncelenmesi

3.2.1.1. DNA ekstraksiyonu

Olguların kanları 0.5 M EDTA'lı (Ethylenediaminetetraacetic acid) (Sigma ABD) tüp içerisine 10cc alındıktan sonra 25cc RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1.1M EDTA) ile 15 dakika buzda bekletildi. +4°C,

4000rpm'de 15 dakika santrifüj (Heraeus Sepatech) edildikten sonra süpernatant atıldı ve bu işleme tüm eritrositler patlatılana kadar devam edildi. Kırmızı küreler elimine edildikten sonra çekirdekli hücreler; 20µg/ml olacak şekilde Proteinaz K (Worthington, ABD), son konsantrasyonu %0.5 olacak şekilde 10%'luk SDS (Sodium Dodecyl Sulphate, Lauryl Sulphate) (Sigma, ABD) ve beyaz küre hacminin 2.5 katı olacak şekilde Nuclease solüsyonu (10mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 2mM EDTA) ilave edilerek bir gece 37°C'de su banyosunda (SBS; İtalya) bekletildi. Ertesi gün bire bir oranda Fenol/ Kloroform [25:24:1 oranında sırayla Fenol (Merck; Almanya), Kloroform (Merck; Almanya), İzomilalkol (Merck; Almanya)] ilave edilerek 10 dakika elde iyice çalkalandı. 15 dakika buza gömüldükten sonra 4°C, 5000rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Süpernatant başka bir tüpe aktarıldıktan sonra 1/10 kadar 2M Sodyum asetat (Sigma; ABD) ve totalin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel; Türkiye) ilave edildi. Tüp nazikçe çalkalandıktan ve DNA görünür hale geldikten sonra -20°C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün -4°C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan ve DNA dipte pellet halinde görüldükten sonra 15 dakika kurutuldu. Daha sonra %70'lik etanolle tekrar santrifüj edildi. Kurutulduktan sonra TE solüsyonunda (10mM Tris-HCl ve 1nM EDTA) bir gece bekletilerek çözüldü.

3.2.1.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Bu çalışmada PCR işlemi sonunda, faktör V geninin 10. eksonu ve protrombin geni amplifiye edildi. Her iki işlemde de her birinin konsantrasyonu 0.1 µg/ml olacak şekilde 2 primer seti kullanıldı. Faktör V Leiden için;

F: 5'TCAGGCAGGAACAACACC3',

R: 5' GTTACTTCAAGGACAAA ATACCTGTAAAGCT3',

Protrombin G20210A için;

F: 5' TCTAGAAACAGTTGCCTGGC 3',

R: 5' ATAGCACTGGGAGCA TTGAAGC kullanıldı.

Son konsantrasyon 2mM olacak şekilde dATP, dGTP, dTTP, dCTP (Promega, Madison; ABD), TaqDNA Polimeraz (Promega, Madison; ABD), 10mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9.0), 50nM KCl ve %0.1 Triton®, son hacim 100µl olacak şekilde 25 mM MgCl₂ konularak zincir reaksiyonu gerçekleştirildi.

PCR sıcaklık şartları ise:

Faktör V için 94°C'de 7 dk, 94°C'de 1 dakika, 58°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika ve son siklusta 72°C'de 6 dakika olarak gerçekleştirildi.

Protrombin için 94°C'de 7 dk, 94°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika ve son siklusta 72°C'de 6 dakika olarak gerçekleştirildi.

PCR sonrasında faktör V için 241 bp uzunluğunda, protrombin için 344 bp uzunluğunda oligonükleotit ürünler elde edildi. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

3.2.1.3 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz (Sigma;ABD) 2.25g/ 75ml (%3) olacak şekilde tartıldı. Üzerine 1x TBE (Tris-HCl, Borik asit, EDTA) solüsyonu ilave edildi. 1xTBE solüsyonu stok olarak 5xTBE solüsyonundan su ile 1/5 oranında seyreltilerek hazırlandı. 5xTBE solüsyonu Trizma® (Sigma; ABD) 54g, borik asit (Carlo Erba,; İtalya) 27.5g, 0.5 M EDTA (Sigma; ABD) 20 ml olarak 1 lt deiyonize suya (ddH₂O) tamamlanarak

hazırlandı. Agaroz istenilen yüzdede hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatıldı (Vestel, Türkiye). Üzerine (%0.5'likstoktan) 2µl Etidyum bromit (Sigma; ABD) ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra jel tabağına (Owl Scientific; ABD) döküldü. Agaroz donması için yaklaşık 30 dk bekletildi. PCR ürünlerinden 18 µl jele yüklendi. 75 V akımda 30 dakika yürütüldü (Biometra; ABD). Ultraviyole ışıkta (Spectroline; ABD) incelendi. Image Analyset'de (Alpha Imager; ABD) fotoğraflandı.

3.2.1.4 PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz ile muamelesi

Faktör V geninin 10. ekson ve protrombin geninin PCR'ları yapıldıktan ve agaroz jelde incelendikten sonra eğer reaksiyon yürümüş ise Hind III (37°C) restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim yapıldı. 33mM Tris-asetat, 10mM magnezyum asetat, 66mM potasyum asetat, 0.1mgr/ml BSA'dan (Oda sıcaklığında; ph: 8.0) oluşan restriksiyon endonükleaz tamponu, 10 U restriksiyon endonükleaz enzimi, PCR ürünleriyle muamale edilerek enzimin optimum çalışma sıcaklığında 14-16 saat inkübe edildi.

3.2.1.5 Faktör V Leiden ve prothrombin G 20210A mutasyonlarının Hind III ile incelenmesi

PCR sonrası FV geninin 10. eksonuna ait 241 bp'lik bir bölge ve prothrombin genine ait 344 bp'lik bir bölge çoğaltılmış oldu. Bu örnekler Hind III (5'-AAGCTT-3') (Promega; ABD) ile muamele edildi. (Hind III restriksiyon enzimi faktör V geninin 1691 noktasındaki, prothrombin geninin 20210 noktasındaki mutant sekansı tanıyarak kesim yapan bir enzimdir. Eğer işlem yapılan örnek mutant değilse kesim

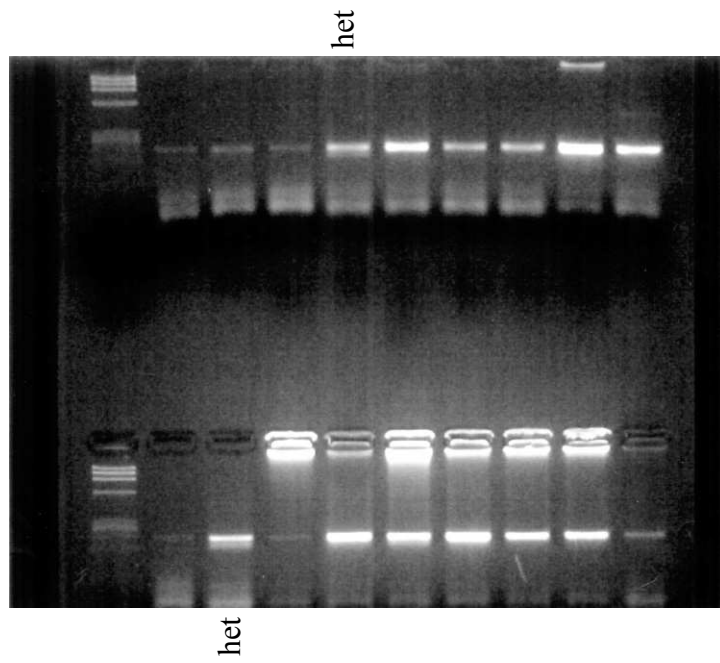
oluşmaz. Kesilen örneklerde iki fragman oluşturur.) Bu işlemin sonunda %3'lük agaroz jelde yürütülerek etidyum bromit boyaması ile inceledi. (Resim 3.I., 3.II)

3.2.2 Faktör Düzeylerinin İncelenmesi

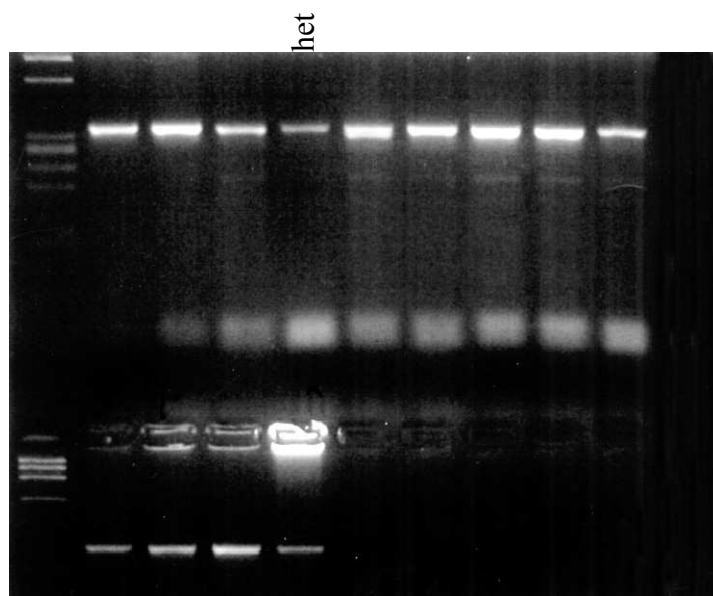
Kan örnekleri semptomların ortaya çıkışından en az 4 ay sonra alındı. Olguların hiç biri kan alındığı dönemde antikuagülan tedavi kullanmamaktaydı. Kan örnekleri 0.105mmol/L trisodium citrate içeren tüplere alındı. Plazma, oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj (2000g) edilerek elde edildi.

Faktör VIII ve IX düzeyleri enzim bağlı immünosorbant ölçüm (ELİSA) (SF80-1 Factor VIII 6x1 ML Sigma Diagnostic Inc. St Louis, MO, USA, SF9D-1 FACTOR IX 6x1 ML Sigma Diagnostic Inc. St Louis, MO, USA) ile değerlendirildi.

Faktör VIII ve faktör IX yüksekliği için cut-off değerleri kontrol grubunun %90 persentili olarak kabul edildi. (18, 20)



Resim 3.I. Faktör V Leiden



Resim 3.IV. Protrombin G20210A (PCR)

3.3. İstatistiksel Analizler

Çalışmanın istatistikleri SPSS (Statistical package for social sciences) paket programı kullanılarak yapıldı. (SPSS, version 9.0; SPSS; Chicago, IL)

Çalışmada ikili gruplar arasında çapraz tablolar oluşturuldu. Çapraz tablolardan OR (odds ratio) hesaplamasına gidildi ve güven aralığı (confidence interval; CI) hesapları %95 güvenilirlik düzeyinde hesaplandı. Daha sonrasında lojistik regresyon modelinde risk faktörleri bir arada değerlendirildi.

Faktör VIII düzeyi ile pulmoner emboli riski arasındaki ilişkinin doz bağımlı olup olmadığını görmek amacı ile faktör VIII düzeyi gruplanarak tekrar değerlendirmeye alındı.

4. ANALİZ VE BULGULAR

Çalışmaya 38 izole PE, 26 PE+DVT (PE ve DVT birlikteliği) tespit edilen olgu ve 64 sağlıklı kontrol olgusu dahil edilmiştir.

Kontrol grubunun yaş ortalaması 52 ± 12.56 (ortalama \pm SD), izole PE grubunun 51.00 ± 12.36 (ortalama \pm SD), PE+DVT grubunun ise 53.577 ± 13.55 (ortalama \pm SD) olarak bulunmuştur. Cinsiyet dağılımı açısından gruplar karşılaştırıldığında kadın erkek oranı; kontrol grubunda 26/38, izole emboli grubunda 16/22, PE+DVT grubunda ise 10/16 olarak dağılmaktadır. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel farklılık yoktur ($p>0.05$). (Tablo 4.I)

Tablo 4.I. Çalışma grubunun demografik ve klinik özellikleri

	KONTROL (N:64)	İZOLE PE (N:38)	PE/DVT (N:26)
Yaş (yıl)* Ortalama \pm SD (min-maks)	52.25 ± 12.56 (25-72)	51.00 ± 12.36 (26-78)	53.57 ± 13.55 (25-75)
Cinsiyet* (Kadın/Erkek)	26/38	16/22	10/16

PE: Pulmoner emboli

PE/DVT: Pulmoner emboli ve derin ven trombozu birlikteliği

SD: Standart sapma

*Gruplar arasında yaş, cinsiyet dağılımı ve ek risk faktörü varlığı açısından anlamlı farklılık yoktur. ($p>0.05$)

Faktör V Leiden prevalansı 64 kontrol olgusunda %9.4 (6/64) , 38 izole PE olgusunda %7.9 (3/38) olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasında prevalans açısından istatistiksel anlamlılık tespit edilememiştir. Yirmi altı DVT+PE olgusunda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında faktör V Leiden prevalansı, %26.9 (7/38) (OR: 3.56; 95%CI: 1.06-11.9) gibi istatistiksel anlamlılığı olan değerde bulunmuştur. (Tablo 4.II) Tüm çalışma grubunda 1 tek homozigot olgu tespit edilmiştir. Diğer faktör V Leiden pozitiflikleri heterozigottur.

Prothrombin G20210A; 64 kontrol olgusunda bir olguda (%1.6), yirmi altı DVT+PE grubunda 2 olguda (% 7.7) tespit edilmiştir. İzole PE grubunda ise prothrombin G20210A mutasyonuna rastlanmamıştır. (Tablo 4.II)

Faktör VIII ve faktör IX değerlendirmesi, 50 olgu üzerinde yapılabilmıştır. (10 olguya ulaşılamamıştır. 4 olgu ise uzun süreli kumadinizasyon ihtiyacı nedeni ile faktör VIII ve IX açısından değerlendirilememiştir)

Faktör VIII için cut-off değeri 168U/dL (Kontrol grubunun %90 persentili) olarak belirlenmiştir. Olgular, faktör VIII düzeyleri 168U/dL'nin üzerinde ve altında olanlar olarak incelendiğinde; faktör VIII'in bu cut-off değeri üzerinde olmasının pulmoner emboli gelişimi için 11.34 kat (95% CI: 4.14-31.08) risk oluşturduğu görülmüştür. Bu risk izole pulmoner emboli grubu için 11.04 kat (95% CI: 3.65-33.35), DVT+PE grubu için 11.81 kat (95% CI: 3.49-39.92) olarak bulunmuştur. (Tablo 4.II)

Faktör IX için cut-off değeri 156/dL (Kontrol grubunun %90 persentili) olarak belirlenmiştir. Olgular, faktör IX düzeyleri 156U/dL'nin üzerinde ve altında olanlar olarak incelendiğinde; faktör IX'un bu cut-off değeri üzerinde olmasının pulmoner emboli gelişimi için bir risk oluşturmadığı görülmüştür. (Tablo 4.II)

4.II. Çalışma olgularının faktör V Leiden, protrombin G20210A mutasyonları ve faktör VIII, faktör IX düzeylerine göre dağılımı

	Faktör V Leiden		Protrombin G20210A	Faktör VIII > 168		Faktör IX > 156
	Pozitifliği		Pozitifliği	Pozitifliği		Pozitifliği
	n (%)	OR (95%CI)	n (%)	n (%)	OR (95%)	n (%)
Kontrol	6/64 (%9.4)		1/64 (%1.6)	6/64 (%9.4)		3/64 (%4.7)
İzole PE	3/38 (%7.9)		0/38	16/30 (%53.3)	11.04 (3.65-33.35)**	5/30 (%16.7)
DVT+PE	7/26 (%26.9)	3.56 (1.06-11.9)*	2/26 (%7.7)	11/20 (%55)	11.81 (3.49-39.92)**	1/20 (%5.0)

PE: Pulmoner emboli

PE/DVT: Pulmoner emboli ve derin ven trombozu birlikteliği

*p<0.05 (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

**p<0.001 (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

OR, odds ratio

95%CI, %95 güven aralığı

Faktör V Leiden, prothrombin G20210A, faktör VIII, faktör IX düzeyleri çok değişkenli istatistiksel model üzerinden incelendiğinde; faktör VIII'in tanımlanmış cut-off değeri üzerinde, izole PE ve DVT+PE grupları için risk faktörü olma özelliğini koruduğu, ancak faktör V Leiden mutasyonunun DVT+PE grubu için risk faktörü olma özelliğini kaybettiği görülmüştür.

Faktör VIII'in yaşı, cinsiyet, faktör V Leiden pozitif veya negatifliği, protrombin G20210A pozitifliği veya negatifliği açısından düzeltildikten sonra gruplar için oluşturduğu risk oranları tablo 4.III'de gösterilmiştir.

Tablo 4.III. Çalışma gruplarının faktör VIII düzeylerine göre incelenmesi

	Faktör VIII		OR (95% CI)	Düzeltilmiş** OR (95%)
	>168	≤168		
Kontrol	58/64	6/64	-	
İzole PE	14/30	16/30	11.04 (3.65-33.35)*	20.36 (4.8-85.23)*
DVT/PE	9/20	11/20	11.81(3.49-39.92)*	13.41 (3.31-54.29)*

PE: Pulmoner emboli

PE/DVT: Pulmoner emboli ve derin ven trombozu birlikteliği

*p<0.001 (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

** Yaşı, cinsiyet, faktör V Leiden pozitif veya negatifliği, protrombin G20210A pozitifliği veya negatifliği açısından düzeltilmiş OR

OR, odds ratio

95%CI, %95 güven aralığı

Faktör VIII tromboz ilişkisinin lineer mi yoksa yalnızca eşik değerin üzerinde mi oluştuğunu ortaya koymaya yönelik olarak, tüm pulmoner emboli grubunda (izole PE ve DVT+PE grupları birleştirilerek ele alınmıştır) faktör VIII'in farklı değerleri için rölatif risk hesaplaması yapılmıştır. (Tablo 4.IV)

Tablo 4.IV. Faktör VIII düzeylerine göre pulmoner emboli gelişim riski

Faktör VIII Düzeyi	Persentil	Hasta	Kontrol	OR (95% CI)	Düzeltilmiş** OR (95%)
≤86	≤25	3	17	1*	1*
86-139	25-75	11	32	1.95 (0.47-7.94)	1.76 (0.40-7.65)
140-168	75-90	9	9	5.66 (1.21-26.33)	5.49 (1.12-26.74)
>168	>90	6	6	25.50 (5.61-115.77)	28.33 (5.72-140.27)

*Referans kategori

** Yaş, cinsiyet, faktör V Leiden pozitif veya negatifliği, protrombin G20210A pozitifliği veya negatifliği açısından düzeltilmiş OR

OR, odds ratio

95%CI, %95 güven aralığı

5. SONUÇ VE YORUM

Bu çalışma; PE ile trombofilik risk faktörleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymak ve bu konuda Türk popülasyonunda yapılabilecek olan çok merkezli çalışmalara basamak oluşturmak amacı ile planlanmıştır.

Bilindiği gibi DVT ve PE arasında sıkı bir ilişki vardır. Alt ekstremitelerinde DVT gösterilen olguların yaklaşık %50'sinde PE geliştiği gösterilmiştir. Ek olarak PE olgularının da %70-80'inde DVT bulunduğu bildirilmiştir (11). Bu yakın birliktelik nedeni ile PE ve DVT'nin aynı hastalığın iki farklı klinik prezentasyonu olduğu ve PE ve DVT olgularındaki kalıtsal ve kazanılmış risk faktörlerinin benzer olduğu düşünülmektedir. Ancak bu konu henüz net olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada genetik risk faktörleri incelenirken PE olguları DVT olup olmasına göre 2 gruba ayrılarak incelenmiştir.

Literatürde tromboz gelişimi ile ilişkili olduğuna dair veriler olan faktör V Leiden, prothrombin G20210A mutasyonları ve faktör VIII ve IX düzeyleri çalışmaya dahil edilmiştir. Prothrombin G20210A mutasyonu varlığı ve faktör IX düzeyi yüksekliği açısından emboli grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel farklılık tespit edilmemiştir.

Faktör V Leiden prevalansı açısından gruplar incelendiğinde; prevalans kontrol grubunda %9.4, izole emboli grubunda %7.9 olarak bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel anlamlılık yoktur. PE+DVT grubu incelendiğinde ise faktör V Leiden prevalansı %26.9 (OR:3.5; 95%CI: 1.06-11.9) gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. Tek değişkenli istatistiksel modelde risk hesaplaması yapıldığında; faktör V Leiden pozitifliği, izole PE için bir risk olarak gözükmezken, PE+DVT birlikteliğinde bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sonuç, bu güne kadar

literatürde bu konuda bildirilen çalışmaların sonuçları ile büyük bir benzerlik göstermektedir. (11,12,13,14,21,22) (Tablo 5.I.)

Tablo 5.I. İzole Derin Ven Trombozu, İzole Pulmoner Emboli Ve Derin Ven Trombozu Pulmoner Emboli Birlikteliğinde Değişik Çalışmalarda Tespit Edilmiş Faktör V Prevalansları

Çalışma	İzole DVT		İzole PE		DVT/PE	
	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)	Sayı (n)	Yüzde (%)
Manten ve ark (21)	211	17.5	45	8.9	23	13.0
Martinelli ve ark (12)	106	22.6	41	4.9	65	16.9
Baglin ve ark (22)	471	19.5	207	12.1	-	-
Turkstra ve ark (14)	-	-	67	7.5	25	24
Moerloose ve ark (13)	83	15.7	57	10.5	42	19.1
Margaglione ve ark (11)	346	24.3	126	7.1	175	16.6
Bizim çalışmamız	-	-	38	7.9	26	26.9

DVT: Derin ven trombozu

PE/DVT: Pulmoner emboli ve derin ven trombozu birlikteliği

PE: Pulmoner emboli

Literatürdeki çalışmalar ve bizim çalışmamız bu aşamada değerlendirildiğinde faktör V Leiden mutasyonunun DVT+PE için önemli bir risk faktörü olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Ancak, bizim çalışmamızda incelenen tüm trombofilik risk faktörleri birlikte ele alındığına faktör V Leiden mutasyonunun risk faktörü olma özelliğini kaybettiği, çoğul değişkenli modelde pulmoner emboli

gelişimi için tek risk faktörünün faktör VIII düzeyindeki yükseklik olduğu ve pulmoner emboli faktör VIII yüksekliği arasındaki ilişkinin doz bağımlı olduğu ortaya konulmuştur. (Tablo 4.III, 4.IV)

Kraaijenhagen ve arkadaşları (19) çalışmalarında, faktör VIII düzeyinin venöz tromboembolizm için bağımsız, sık görülen ve doz bağımlı bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuşlardır. Kyrle ve arkadaşları (23) faktör VIII düzeyi ile rekürrens arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında; faktör V Leiden ve protrombin G20210A mutasyonları ile rekürrens arasında ilişki bulunmazken, faktör VIII düzeyinin rekürrens için önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuşlardır. Oğuzülgen ve arkadaşları (24) pulmoner emboli ciddiyeti ile trombofilik risk faktörleri arasındaki ilişkiyi incelediklerinde; faktör VIII düzeyinin hastalık şiddeti ile korele olduğunu, faktör V Leiden mutasyonu ile böyle bir ilişkinin olmadığı göstermişlerdir. Çalışmamızın sonuçları ve literatür bilgileri bir arada değerlendirildiğinde faktör VIII düzeyinin bağımsız bir trombofilik risk faktörü olduğu, faktör V Leiden mutasyonunun risk oluşturmadığı gruplar ve durumlar için önemli bir risk faktörü olabileceğini ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada faktör VIII yüksekliği izole PE olgularının %53.3'ünde, DVT+PE olgularının ise %55'inde tespit edilmiştir. Bu oranlar literatürde bildirilen %19-33 oranlarına (18,19) göre yüksek değerlerdir. Bu uyumsuzluğun çalışma gruplarının farklılığından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Bizim çalışma grubumuzun tamamının PE olgularında oluşuyor olmasına rağmen diğer çalışmalarda incelenen olguların büyük çoğunluğu izole DVT olgularıdır. Aynı zamanda ülkemizden bildirilen çalışmalarda faktör VIII'in trombozu olan olgularda

150U/dL değerinden yüksek olma oranı %59.5 ve % 53.1 olarak bildirilmiştir. Bu değerler bizim çalışmamız ile uyumlu gözükmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada faktör VIII'in pulmoner emboli gelişimi için sık görülen, bağımsız ve doz ilişkili bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Faktör VIII'in diğer risk faktörlerinin ilişkili tespit edilemediği durumlar için (izole PE'de olduğu gibi) bir risk faktörü olabileceği ve trombofilik risk faktörlerinin birlikte değerlendirilmesinin tromboz riskleri konusunda daha güvenilir sonuçlar verebileceği ortaya konulmuş.

Bu sonuçlar doğrultusunda pulmoner emboli olgularında moleküler risk faktörleri incelenirken önceliğin faktör VIII'e verilmesi gerektiğini, faktör V Leiden mutasyonun Türk toplumunda pulmoner emboli riski açısından faktör VIII yksekliliğinin gerisinde kaldığını dşnmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Franca RF, Reitsma PH. Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet.* 2001; 109: 369-84
2. Robetoyre RS, Rodgers GM. Update on selected inherited venous thrombotic disorders. *Am J Hematol.* 2001; 68: 256-68.
3. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994; 369: 64-7
4. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance) *Blood.* 1995; 85: 1504-8
5. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342; 1503-1506
6. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1995; 332: 912-7
7. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med.* 1994; 330: 517-22
8. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood.* 1993; 82: 1989-93

9. Martinelli I, Landi G, Merati G, Cella R, Toso A, Mannucci PM. Factor V gene mutation is a risk factor for cerebral venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1996; 75: 393-4.
10. de Moerloose P, Wutschert R, Heinzmann M, Perneger T, Reber G, Bounameaux H. Superficial vein thrombosis of lower limbs: influence of factor V Leiden, factor II G20210A and overweight. *Thromb Haemost.* 1998; 80: 239-41.
11. Margaglione M, Brancaccio V, De Lucia D, Martinelli I, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G. Inherited thrombophilic risk factors and venous thromboembolism: distinct role in peripheral deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Chest.* 2000; 118: 1405-11.
12. Martinelli I, Cattaneo M, Panzeri D, Mannucci PM. Low prevalence of factor V:Q506 in 41 patients with isolated pulmonary embolism. *Thromb Haemost.* 1997 ; 77: 440-3
13. De Moerloose P, Reber G, Perrier A, Perneger T, Bounameaux H. Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. *Br J Haematol.* 2000; 110: 125-9
14. Turksta F, Karemaker R, Kuijper PM, Prins MH, Büller HR. Is the prevalence of factor V Leiden mutation in patients with pulmonary embolism and deep vein thrombosis really different? *Thromb Haemost* 1999; 81: 345-47
15. Leroyer C, Mercier B, Oger E, Chenu E, Abgrall JF, Ferec C, Mottier D. Prevalence of 20210A allele of the prothrombin gene in venous thromboembolism patients. *Thromb Haemost* 1998; 80: 49-51

16. Margaglione M, Brancaccio V, Guiliani N, D'Andrea G, Cappucci G, Iannaccone L, Vecchione G, Grandone E, Di Minno G. Increased risk for venous thrombosis in carriers of the prothrombin G→A²⁰²¹⁰ gene variant. *Ann Intern Med* 1998; 129: 89-93
17. Souto JC, Coll I, Llobet D, et al. The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 366-69
18. Koster T, Blann AD, Briet E, Vandembroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995; 345: 152- 155
19. Kraaijenhagen RA, in't Anker PS, Koopman MMW, Reitsma PH, Prins MH, van den Ende A, Buller HR. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2000; 83: 5-9
20. Van Hylckama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2000; 95: 3678-3682
21. Manten B, Westendorp RG, Koster T, Reitsma PH, Rosendaal ER. Risk factor profiles in patients with different clinical manifestations of venous thromboembolism: a focus on the factor V Leiden mutation. *Thromb Haemost* 1996; 76: 510-513
22. Baglin TP, Brown K, Williamson D, Baker P, Luddington R. Relative risk of pulmonary embolism and deep vein thrombosis in association with factor V Leiden mutation in a United Kingdom population. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1219

23. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M et al. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000; 343: 457-62
24. Oğuzülgen IK, Ekim NN, Akar N et al. The role of thrombophilic risk factors in the severity of pulmonary thromboembolism. *Eur Respir J* 2002; 19: 709-711

7. EKLER

7.1. Mali Bilanço ve Açıklamalar

Bu proje kapsamında aşağıda belirtilen tarihlerde toplam 11.134.000.000 TL tutarında alım yapılmıştır.

- 26/12/2001 4.680.330.000
- 09/10/2002 2.123.480.000
- 25/11/2002 3.422.000.000
- 05/09/2003 653.012.000

Projenin veriliş aşaması ve alımların yapıldığı dönem arasında dolar kurunda olan değişiklikler nedeni ile planlanan tüm alımlar yapılamamış ve proje başlangıcında planlanan olgu sayısı olan 200'e ulaşamamıştır.

7.2. Sunumlar

1. Pulmoner emboli olgularında faktör V Leiden ve protrombin G20210A mutasyonlarının incelenmesi **Toraks Derneği 6. Yıllık Kongresi: Mini sempozyum konuşması**
2. The role of factor v leiden and prothrombin G20210A mutations in pulmonary embolism patients **17th Asia Pacific Congress on Disease of the Chest: Sözel sunum**

7.3. Yayınlar

1. Pulmoner emboli olgularında faktör V Leiden ve protrombin G20210A mutasyonlarının incelenmesi **Ferda Öner'in göğüs hastalıkları uzmanlık tezi**
2. Faktör VIII ve faktör IX düzeyleri yeni çalışılmıştır ve çalışmanın tüm sonuçları makale haline dönüştürülme aşamasındadır.