T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

22/11/02

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKTİVE PROTEİN C REZİSTANSININ ABO KAN GRUPLARIYLA İLİŞKİSİ

Biyolog Ayça Dilara KASAPOĞLU

İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Muhit ÖZCAN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
123807

123807

2002 - ANKARA

DOKTORA / YÜKSEK LİSANS TEZ SINAV TUTANAĞI

Öğrencinin Adı Soyadı : Bio. Ayça Kasapoğlu
Öğrenci No :
Anabilim Dalı : Hematodiagnostik
Programı : Yüksek Lisans (x) Doktora ( )
Tez Konusu : Aktive Protein C Rezistansının ABO kan gruplarıyla ilişkisi
Sınav Tarihi : 6.11.02
Sınav Başlama Saati : 9:00
Sınav Bitiş Saati : 10:00

Karar : Tez sınavı sonucunda, yukarıda konusu belirtilen tezin, aşağıdaki gerekçeler doğrultusunda;

[X] Kabulüne

[ ] Düzeltilmesine

[ ] Reddine

Oybirliği / oyçokluğu ile karar verilmiştir.

Gerekçe :

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Hamdi AKAN

Üye Prof. Dr. Osman İlhan

Üye Prof. Dr. Meral Beksaç

Üye Sabri KEMAHLI

Üye Doç. Dr. Muhit Özcan

Ekler:
-Tez jürisi bireysel raporları
-Dinleyici listesi.

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında yardımları ve bilgileriyle katkılarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Muhit ÖZCAN'a, örneklerin sağlanmasında büyük katkısı bulunan Doç. Dr. Önder ARSLAN'a, örnek takibini yapan A.Ü.T.F. Kan Merkezinde görevli Biyolog ve Doktor arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmaları sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Uzm. Dr. Klara DALVA'ya, istatistiklerin yapılmasında yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Pervin TOPÇUOĞLU'na, Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyeleri ve uzman hekimlerine, çalışmanın yürütülmesi için gerekli malzemeyi sağlayan Ayten SARAÇGİL'e, çalışma arkadaşlarıma ve Biyolog Mustafa YAZMAN'a, manevi desteğinden dolayı Uzm. Biyolog Erkan YILMAZ'a ve aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay ii
Önsöz iii
İçindekiler iv
Simgeler ve Kısaltmalar v
Şekiller ve Tablolar vi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Protein C Antikoagülan Yolu 3
1.2 Trombofili 7
1.2.1. Kalıtsal Trombofili 8
1.2.2. Aktive Protein C Rezistansı ve Faktör V Leiden 9
1.2.2.1 APCR'ye Yol Açan FVL dışı FV Mutasyonları 15
1.2.3 ABO Kan Gruplarının Trombozla İlişkisi 16
1.2.4 Aktive Protein C Rezistansı Tayin Yöntemleri 17

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Gereç 19
2.2 Yöntem 19
2.2.1. ProC®Global Standart Ölçüm Yöntemi 20
2.2.2. ProC® Global Modifiye Ölçüm Yöntemi 24
2.2.3 İki Yöntem için Referans Aralıkları 25
2.2.4. ProC® Global Kiti Reaktifleri 26
2.3. İstatistiksel Analiz 29
3. BULGULAR
4. TARTIŞMA VE SONUÇ
5. ÖZET
6. SUMMARY
7. KAYNAKLAR

SİMGELER VE KISALTMALAR

APL	Antifosfolipid Antikorları
APC	Aktive Protein C
APCR	Aktive Protein C Rezistansı
APCR-NO	Aktive Protein C Rezistansı Normalize Oranı
APTZ	Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı
Arg	Arjinin
BCS	Behring Coagulation System
BD	Becton Dickonson
DD	Duyarlılık Değeri
DFYİ	Doku Faktörü Yolu İnhibitörü
DVT	Derin Ven Trombozu
EGF	Epidermal Growt Factor
EPCR	Endotelyal Protein C Reseptörü
FV	Faktör V
FVL	Faktör V Leiden
Glu	Glutamin
Gly	Glisin
KF	Kalibrasyon Faktörü
PCA	Protein C Aktivatörü
PCAZ	Protein C Aktivasyon Zamanı
PC	Protein C
PS	Protein S
SİP	Standart İnsan Plazması
Thr	Threonin
TM	Trombomodulin
VT	Venöz Tromboz
WHO	World Health Organisation

ŞEKİLLER VE TABLOLAR

Şekiller

Şekil 1.1. Koagülasyon reaksiyonlarını kontrol eden mekanizmalar
Şekil 1.2. Protein C Antikoagülan Yolu Mekanizması
Şekil 1.3. Faktör V 10, ekson gen dizisi.
Şekil 2.1. Standart ölçüm yöntemi
Şekil 2.2. Modifiye ölçüm yöntemi
Grafik 1.1 APCR ve FVIII seviyeleri ilişkisi
Grafik 3.1. Standart yöntemde APCR(-) olgularda APCR-NO'larının kan gruplarına göre dağılımı
Grafik 3.2. Modifiye yöntemde APCR(-) olgularda APCR-NO'larının kan gruplarına göre dağılımı

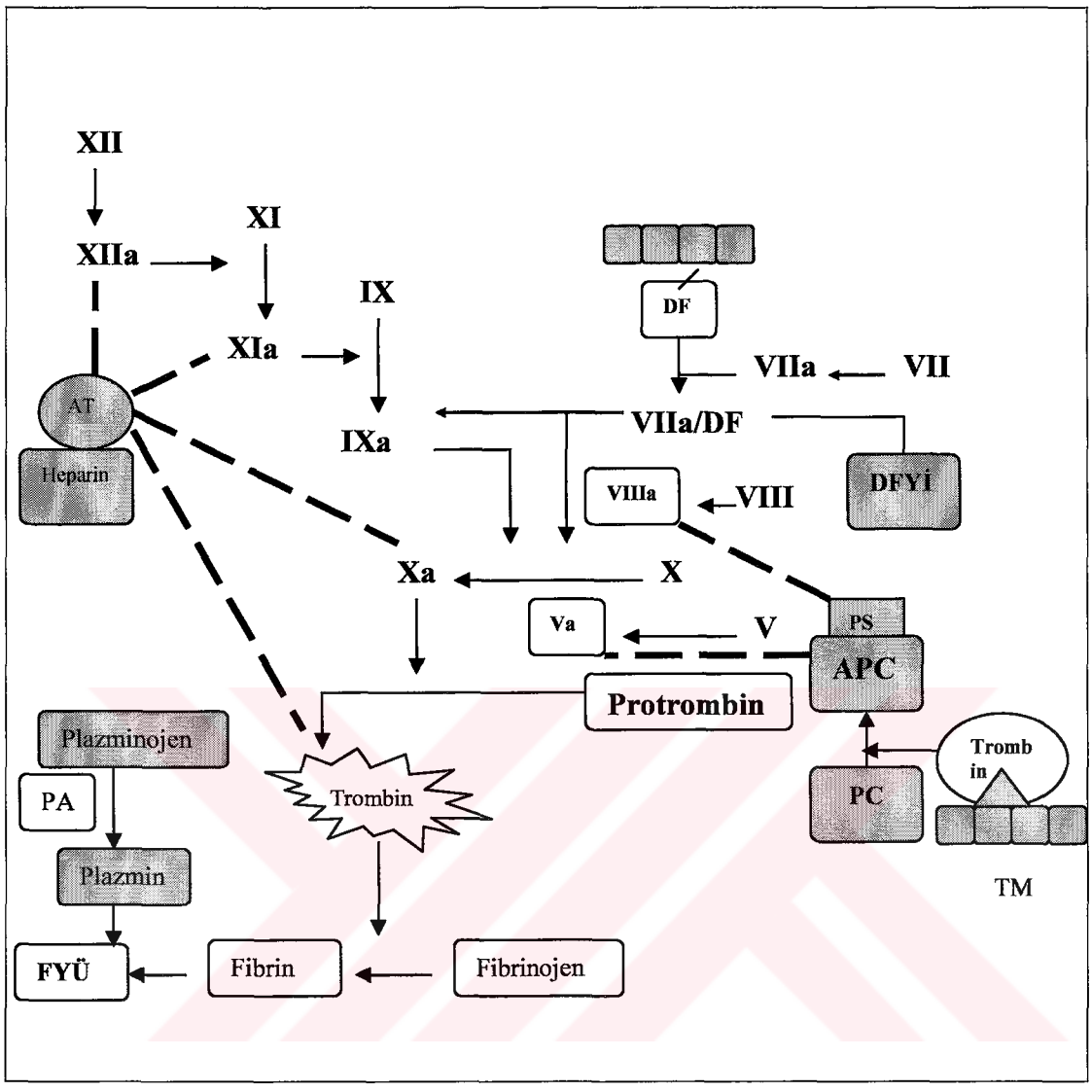
Tablolar

Tablo 1.1. Kalıtsal risk faktörleri
Tablo 2.1. Standart yöntem pipetleme şeması
Tablo 2.2. Modifiye yöntem pipetleme şeması
Tablo 2.3. ProC Global standart ve modifiye yöntemler için referans aralıkları
Tablo 2.4. ProC®Global kiti viallerinin hacmi ve kompozisyonları
Tablo 2.5. Kitlerin dayanıklılıkları
Tablo 3.1. ProC Global standart ve modifiye yöntem ile çalışılan 250 sağlıklı kan vericisine ait bilgiler ve sonuçlar
Tablo 3.2. Kan gruplarına göre her iki yöntemle saptanan APCR(+) olgu sayısı
Tablo 3.3. APCR(-) olgularda farklı iki yöntemle bulunan APCR-NO değerlerinin kan gruplarına göre dağılımı
Tablo 3.4. Standart yöntemde APCR(-) olgularda APCR-NO'larının kan gruplarına göre dağılımı
Tablo 3.5. Modifiye yöntemde APCR(-) olgularda APCR-NO'larının kan gruplarına göre dağılımı
Tablo 3.6. O ve O dışı kan grubundaki olgularda APCR (+)'liği sıklık riski
Tablo 3.7. O ve O-dışı kan grubundaki tüm olgularda APCR-NO'larının karşılaştırılması
Tablo 3.8. O ve O-dışı kan grubundaki APCR(-) olgularda her iki yöntemle APCR-NO'larının karşılaştırılması
Tablo 3.9. Standart yöntemle alt sınır değişikliğinde APCR(+)'lik sıklığı

1. GİRİŞ

Normal hemostazda, prokoagülan ve antikoagülan proteinler kanın akışkanlığını sağlamak amacıyla dengeli bir şekilde görev yaparlar. Hasar meydana geldiği zaman fizyolojik örtü oluşturmak amacıyla denge prokoagülan kuvvetler yönüne çevrilir. Koagülasyon sistemi trombin oluşumunu başlatan bir seri komplex proteolitik reaksiyonlar ihtiva eder ve sonuç olarak venöz trombozun da esas komponenti olan trombin meydana gelir. Zıt gibi görünse de, trombin aynı zamanda bir antikoagülandır ve antikoagülan proteinlerle etkileşerek pıhtı oluşumunu bir noktada kontrol eder ve sınırlar. Bireyde kalıtsal veya hasarla birlikte edinsel patolojik durumların bulunması prokoagülan aktivitenin artmasına neden olabilir ve patolojik tromboz riski yaratabilir (Hooper ve Evatt,1998).

Koagülasyon sistemi enzimlerinin kontrollü aktivite göstermesi için, bir zimojen, bir protein kofaktör ve bir çevirici enzim, fosfolipid yüzeyler üzerinde makromoleküler bir komplex oluştururlar. Çevirici enzim inhibe edildiğinde, protein kofaktörün aktivitesi engellendiğinde veya makromoleküler komplexin meydana geldiği yüzey reseptörleri bloke edildiğinde koagülasyon engellenir. Doğal antikoagülan mekanizmaları engelleyici aktiviteleriyle koagülasyon kaskadının her basamağına müdahele edebilmektedirler. Bunlar heparin-antitrombin III mekanizması, protein C antikoagülan yolu, doku faktörü yolu inhibisyonu (DFYİ) mekanizmalarıdır. Bunların dışında, heparin kofaktör II, α_2-makroglobulin, α_2-antiplazmin, PAI v.b plazma proteaz ihhibitörleri de bulunmaktadır. Protein C antikoagülan yolu, diğerleri arasında en etkin olan mekanizmadır (Şekil 1.1) (Griffin, 2001, s.: 1435).



Şekil 1.1. Koagülasyon reaksiyonlarını kontrol eden mekanizmalar. DF: Doku faktörü, DFYİ: Doku faktörü yolu inhibitörü, AT: Antitrombin, PC: Protein C, PS: Protein S, APC: Aktive protein C, PA: Plazminojen aktivatörü, FYÜ:Fibrinojen/fibrin yıkım ürünleri, TM: Trombomodulin, a: aktif (Özsan, 2000, s.:61)

Protein C antikoagülan yolunda meydana gelen bir defekt olan ve trombozun en önemli risk faktörü olarak aktive protein C rezistansının (APCR), en sık görülen nedeni Faktör V Leiden (FVL) mutasyonudur ve APCR'li olguların yaklaşık %95' inde bulunmaktadır. Nadir görülen diğer FV defektleri yanında, lupus antikoagülan varlığı, oral kontraseptif kullanımı, yüksek FVIII seviyeleri ve hiperprotrombinemi gibi bazı durumların da kazanılmış APC rezistansına neden olduğu bilinmektedir. APCR'li bireylerde tromboz riski, bazı genetik ve edinsel faktörlerin birlikte bulunmasıyla artmaktadır (Clark ve Walker, 2001).

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

AMAÇ:

ABO kan gruplarıyla trombofilinin en yaygın sebebi olan APCR ilişkisi konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda sebebi henüz tam olarak açıklanamamakla birlikte O-dışı kan grubuna sahip bireylerin O grubuna göre tromboz riskinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Kan gruplarının trombozla ve Faktör V Leiden ile ilişkisini tanımlayan çalışmalar yapılmış ancak APCR(+)'liği sıklığı ve APCR normalize oranlarıyla (APCR-NO) ilgisi belirtilmemiştir. Bu çalışmada amaç, sağlıklı kan vericilerinde ABO kan gruplarına göre APCR tarama testi olarak kullanılan APCR normalize oranının (APCR-NO) ve APCR(+)'liği sıklığının farklı olup olmadığını irdelemektir.

1.1. Protein C Antikoagülan Yolu

Protein C antikoagülan yolu, trombin üretimini ve dolayısıyla pıhtı oluşumunu düzenleyen bir mekanizmadır. Bu mekanizmada reseptörler ve plazma proteinleri görev yapmaktadır. Mekanizmanın elemanları; protein C (PC), protein S (PS), trombin, trombomodulin (TM), epitelyal protein C reseptörü (EPCR) dür (Şekil 1.2.).

Trombin, prokoagülan veya antikoagülan aktivite gösterebilmesiyle koagülasyon kaskadının en önemli proteinidir. Serbest alfa-trombin formu trombositleri aktive eder, fibrinojeni fibrine çevirir ve inaktif koagülasyon faktörleri olan FV, FVIII, FXI ve FXIII'ü aktif formlarına dönüştürür. Alfa-trombin bir hücre yüzey transmembran proteini olan trombomoduline bağlanınca, prokoagülan fonksiyonları nötralize olur ve antikoagülan bir enzime dönüşür. Membrana bağlı trombinin PC'yi aktive etmesi, serbest trombine oranla 20.000 kat daha fazladır. (Chrobak ve Dulicek, 1996).

Protein C (Aktive Protein C'nin zimojeni), endotelyal hücrelerin yüzeyinde TM-trombin kompleksi ile aktive edilerek aktive protein C (APC)'ye dönüşür.

Yüzeye bağlı gerçekleşen bu reaksiyonda EPCR arttırıcı role sahiptir; TM varlığında trombinin PC'yi aktive etmesi hızlanır (Esmon, 2001).

Trombin, TM ile birebir komplex oluşturarak hızlı bir şekilde PC'yi APC'ye dönüştürebilmektedir. Vasküler endotelyal hücrelerin her birinde yaklaşık 100,000 trombomodulin molekülü bulunur. Mikrodolaşımda, endotelin kanla temasta olan yüzeyi geniş damarlara oranla daha fazladır. Buna göre, PC aktivasyonunun özellikle mikrodolaşımda meydana gelmesi muhtemeldir. TM-trombin kompleksi, trombinde dönüşümlü bir şekilsel değişikliğe yol açar ve iki değerli iyonların varlığında PC'nin aktive olmasını sağlar. Kompleks, bir yandan bu etkiyi sağlarken aynı zamanda da trombinin prokoagülan aktivitelerini kısmen inhibe etmektedir (Griffin, 2001).

Aktive protein C antikoagülan etkisini, aktif prokoagülan faktörler olan FVa ve FVIIIa'yı inaktive ederek gösterir. FVa ve FVIIIa, inaktif formlarına oranla 5-10 kat daha hızla inaktive edilirler. Bunun sonucunda Tenaz komplexi ile Protrombinaz kompleksinin birliktelikleri bozulmuş olur. APC, Faktör Xa için reseptör görevi gören membrana bağlı Factor Va'nın peptid bağlarını keser ve Xa'nın protrombini aktive etmesini engellemiş olur. FXa, FVa'ya bağlandığı zaman FVa'yı APC'nin proteolitik aktivitesinden korumaktadır. APC ayrıca hücre membranlarında FVIIIa'nın da biyolojik aktivitesini bozarak, Faktör IXa bağlantılı FXa oluşumunu engellemiş olmaktadır (Özcan, 2002).

Protein S ve FV sinerjik çalışarak APC'ye kofaktörlük yaparlar. PS, negatif yüklü fosfolipid yüzeyler için yüksek afiniteye sahiptir ve APC'nin trombosit ve endotel hücre yüzeylerindeki fosfolipid yüzeylere bağlanmasını arttırır. FV'in FVIIIa nın yıkılmasında rol oynadığı bulunmuştur. PS ve FV varlığında APC, FVIIIa'yı etkili bir şekilde inaktive etmektedir. Tek başına veya sadece FV'le birlikte APC'nin aktivitesi oldukça azdır. FVa ise tek başına antikoagülan kofaktör olarak etki gösteremez (Chrobak ve Dulicek, 1996).

Fizyolojik koşullarda, APC yokluğunda FVIIIa'nın inaktivasyonu, "A_2 domaini"nin ayrılmasıyla olurken, FVa'nın proteolitik olarak parçalanması için

mutlaka APC gereklidir. FVa'nın APC tarafından inaktivasyonundaki düzensizlikler protrombin aktivasyonunun sürdürülmesine ve trombotik olayların meydana gelmesine neden olur. Trombotik olayların şiddeti ise defektin moleküler temeli ile ilintili olabilir. Protein C antikoagülan yolunun fizyolojik bütünlüğü önemlidir. Ailesel tromboz olguları PC, PS ve trombomodulin eksikliklerivle ilgilidir. Nihayetinde FV'deki bir mutasyon APC'ye direnç oluşturur ve ailesel tromboz ile yakından ilgilidir (Heit, 2000).

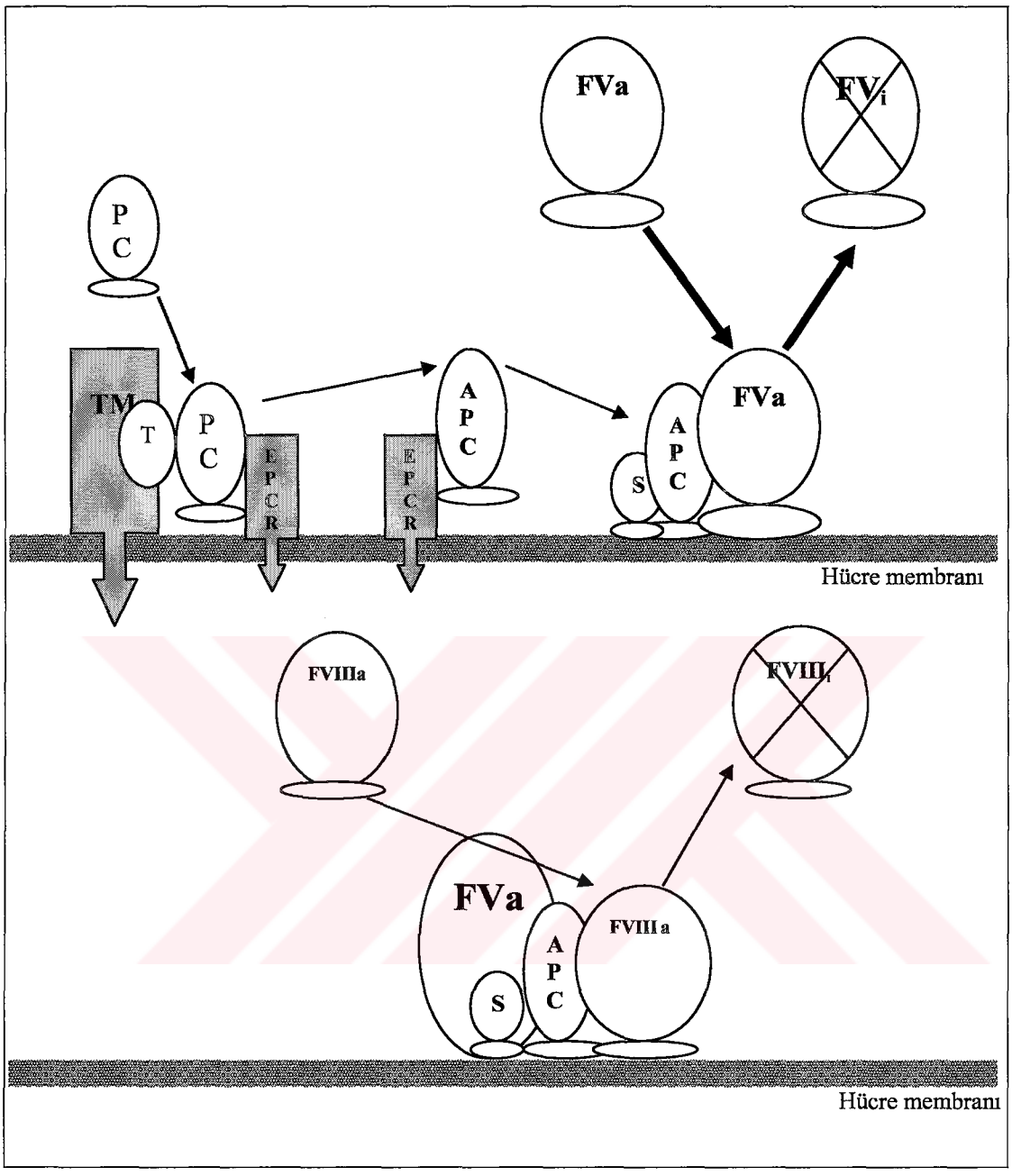
EPCR de, trombomodulin gibi spesifik bir endotelyal hücre transmembran proteinidir. Hücre yüzeylerinde protein C ve APC'yi yaklaşık 30 nM Kd ile bağlamaktadır (Simmonds ve Lane, 2001). APC çözülebilir EPCR'ye bağlı olduğu zaman antikoagülan aktive gösterememektedir. Bu da EPCR'nin, APC'nin lipid yüzeylere bağlanmasını bloke etmesine ve APC'nin yapısında bir değişiklik meydana getirmesine bağlı olabilir. Bu nedenle APC, aktivite gösterebilmek için EPCR'den ayrılmalıdır. Ayrılma gerçekleşince APC, PS'e bağlanarak FVa ve FVIIIa'yı inaktive eder (Esmon, 2001).

İnsan protein C'si, 62.000 kDa ağırlığında olan vitamin K'ye bağımlı bir plazma proteinidir. cDNA'sının klonlanmasıyla 461 aminoasitlik yapısı gösterilmiştir. PC, 41.000 kDa'lık bir ağır zincirden ve 21.000 kDa'lık bir hafif zincirden oluşmaktadır ve iki zincir birbirine tek bir disülfit bağ ile bağlanmaktadır. Karaciğer hücrelerinde sentezlenir ve insan plazmasında 3-5 μg/ml konsantrasyonunda bulunmaktadır (Chrobak ve Dulicek, 1996). Dolaşımdaki total PC'nin %20'lik kısmı tek-zincir formu halindedir. Bu da zimojenin tek polipeptid zinciri olarak sentezlendiğini daha sonra iki zincirli forma dönüştüğünü göstermektedir. Protein C molekülünün α ve β olmak üzere iki formu vardır. Bu farklılık N'ye bağlı karbonhidrat kısmın değişik miktarlarda olmasından kaynaklanır. Tüm formlar aktive protein C'ye dönüşebilir ve antikoagülan aktivite gösterebilir (Griffin, 2001).

Hem PC hem de APC, hafif zincirlerinin aminoterminal uçlarında γ-karboksi glutamik asit (Gla) kolları ihtiva ederler. Bu kollar proteinlerin kalsiyuma bağlı

olarak hücre yüzeyi membranlarına bağlanmalarını sağlar. Gla kollarından sonra hidrofobik kol kümesi, iki epidermal growth faktor (EGF) tekrarları ve proteaz bölümü yer alır. Vasküler TM'ne bağlı trombin kalsiyum iyonları varlığında, protein C'yi aktive ederek antikoagülan aktivitesini göstermesini sağlar. Protein C'nin aktivasyonu vitamin-K'ya bağımlı Gla bölgesinden çok, EGF bölgesindeki kalsiyum bağlanma bölgesine bağlıdır. Tek bir kalsiyum bağlanma bölgesinin işgali, molekülde konformasyonal değişikliğe yol açarak TM-trombin kompleksi tarafından kolayca aktive edilmesini sağlar ancak trombinin tek başına PC'yi aktive etmesini zorlaştırır. APC'deki aktif serin merkezi ağır zincir üzerinde bulunmaktadır. Diğer tripsin-benzeri proteazlarda olduğu gibi APC de, FVIIIa ve FVa gibi Arjinin-ihtiva eden bölgeleri olan sentetik substratlara özgünlük gösterir (Griffin, 2001).

İnsan protein S'si, 70.000 kDa ağırlığında vitamin-K'ya bağımlı bir glikoproteindir. Hepatositlerde, vasküler endotel hücrelerde ve megakaryositlerde sentezlenir. PS, 3. kromozom üzerinde bulunan α ve pseudo β genleri tarafından kodlanır. İnsan plazmasında PS normalde 20-25 μg/ml konsantrasyonunda bulunur. PS'nin yaklaşık %60'ı, klasik kompleman yolun düzenleyici bir komponenti olan C4b-bağlanma proteinine (C4b-bp) dönüşümlü şekilde bağlı olarak, % 40'ı ise plazmada serbest olarak bulunur. Sadece serbest form APC'ye kofaktörlük yapabilir. C4b-bp, normal plazmada yaklaşık 150 μg/ml konsantrasyonunda bulunur. C4b-bp, PS ile birebir sitoizomerik nonkavalan kompleks oluşturur. Kompleks PS'nin APC ile etkileşimini engelleyerek, serbest PS'nin antikoagülan aktivitesini sınırlandırmış olmaktadır. cDNA'sının klonlanmasıyla PS'nin yapısı gösterilmiştir. Diğer vitamin-K'ya bağımlı proteinlerin aksine PS bir zimojen değildir. Amino ucu diğerleriyle aynıdır ve 11 Gla bölgesi ihtiva eder. Gla bölgesinden sonra, trombine hassas bölge ve 4 EGF tekrarları bulunmaktadır. PC'nin EGF-benzeri bölgelerinin aksine, PS kalsiyumu daha yüksek afiniteyle bağlar; stabilitesi ve molekülün konformasyonu için bu oldukça önemlidir (Rosen ve Bergamaschi, 2001).



Şekil 1.2. Protein C Antikoagülan Yolu Mekanizması (PC: protein C, PS: protein S, APC: aktive protein C, TM: trombomodulin, T: trombin, EPCR: epitelyal protein C reseptörü, a: aktif, i: inaktif (Esmon, 2001).

1.2 Trombofili

Trombozun patolojisi, 150 yıldan fazla bir süre önce Rudolph Virchow tarafından tarif edilmiştir ve hala geçerliliğini korumaktadır. Damar duvarında hasar, kan akımında yavaşlama ve kanın koagülasyonundaki değişiklikler Virchow üçlüsü olarak bilinmektedir. Kanın koagülasyonundaki değişikler hiperkoagülan durumlar olarak yeniden adlandırılmıştır.

Tromboz, hemostaz sisteminin anormal zamanda ve yerde aktive edilmesine neden olan patolojik bir süreçtir. Normal koşullar altında hemostazın elemanları, kan akımının düzenli bir şekilde sürekliliğini düzenleyerek vasküler hasara karşı hızlı bir cevapla koruyucu hemostatik örtüyü oluştururlar. Tromboza, trombojenik faktörlerle hemostazın koruyucu mekanizmaları arasındaki dengesizlik neden olmaktadır (Carvalho, 2000, s.: 219).

Hiperkoagülan durumlar kalıtsal ve edinsel olarak ikiye ayrılabilir. Trombofili genellikle, tromboz gelişimine neden olan kalıtsal yatkınlığı tanımlamaktadır. Tromboz gelişiminde, arteryal sistemde endotel hasarın ve trombosit fonksiyonel bozukluklarının, venöz sistemde ise daha çok staz ve pıhtılaşma sistemine ait bozuklukların önemli rol oynadığı bilinmektedir. Kan basıncı, kan akışı, koagülasyon, enflamasyon ve aterogenezis gibi biyolojik faktörler de tromboz gelişiminde risk faktörleridir (Küçükkaya, 1999, s.: 27).

1.2.1. Kalıtsal Trombofili

Trombofili kalıtsal ve edinsel nedenlere bağlı olarak gelişebilir. Klinik çalışmalar ve toplum araştırmaları kalıtsal trombofilinin genellikle venöz tromboza (VT) eğilim yarattığını göstermektedir (Küçükkaya 1999, s.: 27).

Trombofilinin edinsel risk faktörleri: Yaşlılık, hareketsizlik, şişmanlık, cerrahi girişimler, travma ve yanık, oral kontraseptifler, hormon değişim terapisi, hamilelik, antifosfolipid sendromu, konjestif kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, nefrotik sendrom, hipervizkosite, enfeksiyonlar ve miyeloproliferatif hastalıklardır (Özsan, 2000, s.:61). Kalıtsal trombofiliye neden olan 6-7 genetik risk faktörü bilinmektedir. Bu risk faktörlerinin toplumdaki ve trombozlu olgulardaki sıklıkları yapılan aile çalışmalarıyla tanımlanmıştır (Tablo 1.1).

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Venöz tromboz, derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner emboliyi içeren, kalıtsal ve edinsel risk faktörlerinin çok çeşitli şekillerde etkileşimleriyle meydana gelen bir hastalıktır. VT'ye eğilim yaratan kalıtsal koagülasyon anormalliklerinden FV ve protrombindeki mutasyonların ve yüksek FVIII seviyelerinin önemli risk faktörleri olduklarının bildirilmesi VT etiyolojisinin anlaşılmasına büyük katkıda bulunmuştur. Kalıtsal trombofili, VT'li olguların %50'sinden fazlasını açıklamaktadır (Heit, 2000).

Tablo 1.1. Kalıtsal risk faktörleri (Reyhan, 1999, s.:28).

Bozukluk	**Toplumdaki sıklığı (%)**	**Trombozlu hastalardaki sıklığı (%)**
Antitrombin eksikliği	0.02	1
Protein C eksikliği	0.2	3
Protein S eksikliği	0.1	1-2
APCR/FVLmutasyonu	**3-6**	**20**
Hiperhomosisteinemi	5-10	10-25
Protrombin 20210 alleli	1-2	6
FVIII yüksekliği	11	25

1.2.2. Aktive Protein C Rezistansı ve Faktör V Leiden

Aktive protein C rezistansı (APCR), ilk kez Dahlback ve ark. (1993) tarafından rapor edildi ve plazmanın aktive protein C' (APC) ye zayıf antikoagülan cevabı olarak tanımlandı. Dahlback bireysel ve ailesel tarihçeleriyle açıklanamayan venöz trombozlu hastalar olduğunu saptadı ve bu hastaların aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTZ) testlerinde, dışardan aktive protein C (PC) eklenmesiyle beklenen uzama görülmemekteydi. Bu hastaların ailelerinde de plazmada zayıf antikoagülan cevap olduğunu saptayarak, bu anormalliğin ailesel olabileceğini öne sürdü ve trombozlu ailelerle yapılan bu çalışmalarla aktive protein C rezistansının tromboz için yüksek bir risk faktörü olabileceği öne sürüldü (Dahlback ve ark., 1993). Elde

edilen ilk verilere göre APCR, ilk tromboz episodlu rastgele seçilen olguların %20' sinde, ailesel trombozlu olguların %50'sinde, diğer antikoagülan proteinlerinde defekt ve antifosfolipid antikoru olmayan trombotik olguların %60'ında görülmüştür. Avrupa ve A.B.D.'deki diğer gruplar da venöz trombozlu olgularda APC rezistansının sık görülen bir anormallik olduğunu onaylamışlardır (Elisabeth ve ark., 1998).

Sık rastlanan bu laboratuvar fenomenine çoğu hastada faktör V'deki bir defektin neden olduğu bildirilmiştir. Bertina ve ark. (1994) nın çalışmasında, faktör V geninde APC'nin kesim noktası olan Arg506'daki (Faktör V Leiden) bir mutasyonunun APCR'ye neden olduğu ve mutant FV'in (Şekil 1.3) meydana geldiği gösterilmiştir. Arg506, APC'nin FVa'yı ilk olarak kestiği noktadır ve Arg yerine Glutamin (1691 G-A değişimi) gelmesiyle oluşan sekans değişimi mutant FVa molekülünün normal FVa molekülüne göre çok daha yavaş inaktive edilmesine neden olur (Şekil 1.3). Bertina ve ark., APC rezistansı olan bireylerin %80'ninin faktör V Leiden heterozigot veya homozigot olduklarını, mutasyonu taşıyan tüm bireylerin ise APC'ye rezistans gösterdiğini rapor etmişlerdir. (Bertina ve ark.,1994). Bilinen bir malign hastalığı olmayan ve ilk derin ven tromboz episodu olan 70 yaşın altında 474 ayaktan hasta ve yaşları ve cinsiyetleri eşleştirilen 474 kontrol grubunda olan sağlıklı bireyin dahil edildiği Leiden trombofili çalışmasında (LETS), 301 hasta ve konrolde APC rezistansına bakılmıştır. Elde edilen ilk verilere göre hastaların %21'inde ve sağlıklı kontrol grubunun ise %5'inde aktive protein C rezistansı saptanmıştır. Bir sonraki çalışmada, 472 hasta 422 kontrol grubunun tamamında APCR'ye bakıldığında, hastaların %28'inde ve kontrollerin %5,8'inde rezistans görülmüş ve 97 APCR'li bireyden 95'inde FV Leiden mutasyonu varlığı saptanmıştır. Bu çalışmalarda venöz trombozla APCR varlığı birlikte hesaplandığında risk oranı 6,6 olarak bulunmuştur ve APCR'nin venöz tromboz için bir risk faktörü olduğu rapor edilmiştir. İlk verilerden farklı olarak, APCR'li vakaların %90-95'inde A506G mutasyonu varlığı saptanmıştır (Bertina ve ark., 1995; Van der Meer ve ark.,1997).

Faktör V Leiden'nin neden olduğu APC rezistansının tromboz yaratma riski Leiden trombofili çalışmasının sonuçlarına göre belirlenmiştir. FVL heterozigot bireylerde venöz tromboz riski 3 ila 8 kat fazla iken, kontrol grubunda homozigot bireye rastlanmamasına dayanarak homozigot hastalarda risk yaklaşık 80 kat fazla bulunmuştur (Rosendaal ve ark., 1995).

Tüm populasyon içerisinde sağlıklı bireylerde FVL, %2-11 sıklıkla Avrupa'da en yüksek oranda görülmektedir. İngiltere'de %3,5, İspanya'da %3,3, Hollanda'da %2, İsveç'te % 7 bulunmuştur. Amerikan populasyonunda yapılan bir çalışmaya göre, beyaz ırkta bu oran %5.27, Afrikalı Amerikalılarda %1.23 ve Asyalı Amerikalılarda ise %0.45'dir (Hooper ve Evatt, 1998). Akar ve ark.(1997) nın yaptığı çalışmada, Türk toplumunda FVL mutasyonu görülme sıklığı % 9.8 olarak saptanmıştır.

FVa molekülünün APC tarafından kesimi, 306, 506 ve 679 pozisyonlarında olmaktadır ancak 506'daki kesim 10-20 kat daha sıktır. 306 kesim noktasında iki yeni mutasyon saptanmıştır ve bunlar FV Cambridge ve FV Hong Kong adını almıştır. Kesim noktası olan 679'da ise henüz tanımlanmış bir mutasyon bulunmamaktadır. Yalnızca FV Cambridge'in APC rezistansına neden olduğu bilinmektedir (Chitolie ve ark., 2001).

Faktör V Leiden ile birlikte diğer genetik risk faktörlerinin bulunup bulunmadığı klinik açısından önem taşımaktadır. FVL homozigotluğu, PC ve PS homozigotluğuna göre daha az risk taşımasına rağmen FVL ile birlikte diğer genetik faktörlerinin bulunmasının venöz tromboz riskini daha da arttırdığı bilinmektedir (Hooper ve Evatt., 1998)

APCR'li vakaların çoğu (%95) FVL ile açıklanırken, APC testlerinde rezistans gösteren ancak FVL mutasyonu taşımayan vakalar da görülmektedir. FVL'ye bağlı olmayan APC rezistans fenotipi gösteren vakaların çoğunda kazanılmış durumlara rastlanabilmekte ancak bazılarında belirli bir neden bulunamamaktadır (De Visser ve ark.,1999). Ledien trombofili çalışmalarında da böyle bireylere rastlanmış ve yapılan

aile taramalarında başka kalıtsal defektlere rastlanmamıştır (Bertina ve ark., 1995). De Visser ve ark. (1999) nın yaptığı çalışmada FVL'ye ve diğer kalıtsal ya da kazanılmış durumlara bağlı olmayan APCR'nin venöz tromboz (VT) için yüksek bir rik faktörü olduğu gösterilmiştir. Bu bağlantı doz-cevap ilişkisi şeklinde tanımlanmıştır ve normalize APC oranı düştükçe VT riskinin de orantılı olarak arttığı kaydedilmiştir. En düşük APC rezistansı oranı gösterenlerin en yüksek oranlara sahip olanlara göre tromboz riski 2,5 kat fazla olduğu saptanmıştır. Tosetto ve ark. (2000) APC rezistansı fenotipinin kalıtsallığını irdelemiş ve 227 ebeveynde FVL ile açıklanamayan APCR'ye rastlamıştır. Hem ebevenyn hem de ailedeki çocuk veya çocuklarda APCR gösteren 32 cocuk-ebeveyn bulmuştur. Bunların 64'ünde diğer FV defektlerine rastlanmamış ve FVIII ve vWF seviyeleri normal bulunmuştur. Tosettove ark.nın, daha önceki çalışmalarında toplum genelinde APCR'nin % 15 olduğu saptanmıştır ve bu çalışma ile FVL'ye bağlı olmayan APCR fenotipinin genel populasyonda %1-2 civarında bulunabileceği belirtilmiştir.

Hamilelik, oral kontraseptif kullanımı da kazanılmış APCR'ye neden olabilmektedir. Akut trombotik olaylarda akut faz reaksiyonuna bağlı olarak zayıf APC yanıta rastlanmaktadır. Lupus antikoagülan, FVIII yüksekliği gibi laboratuvar fenotipleri de APCR testlerinde APC'nin düşük saptanmasına neden olabilmektedir. (De Visser ve ark., 1999). Vanderbroucke ve ark. (1994) nın menopoz öncesi venöz tromboz geçiren 155 kadında ve 169 kontrolde yaptığı çalışmada, oral kontraseptif (OK) kullananların kullanmayanlara oranla 3,8 kat, FV Leiden taşıyıcılarında ise taşımayanlara oranla 8 kat fazla tromboz riski taşıdıkları gösterilmiştir. Hem OK kullanan hem de FVL taşıyıcısı olanların, OK kullanmayan FVL taşımayanlara oranla tromboz riskinin 35 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir. Hamilelik ve OK kullanımı FVL'ye bağlı olmayan in vitro APCR ile de alakalıdır. Yedi ila onaltı haftalık hamilelik safhasındayken APC rezistansı olanların preeklempsi geliştirdikleri saptanmıştır (Clark ve ark., 2001). Olivieri ve ark (1995), OK kullanan 50 sağlıklı kadınla kullanmayan 50 sağlıklı kadında APCR'nin, OK kullananlarda kullanmayanlara göre düşük bulunduğunu saptamıştır. APCR'li 8 kadından 2'si FVL heterozigot bulunmuş, 2 kadın OK kullanmayı bıraktıktan sonra APCR değerleri iki ay içerisinde normale dönmüştür. Bu çalışmayla, OK kullanımının genetik

mutasyondan bağımsız olarak kazanılmış APCR'ye sebep olabildiği gösterilmiştir. APC rezistansı tarama testi olan ProC Global standart yöntemiyle (Dade Behring, Marburg, Germany), düşük yapmış ve protein C antikoagülan yolunda defekti olan kadınlarda düşük APC yanıta rastlanmıştır. Bu kadınlardan 12'sinin FVL mutasyonu taşıdığı, 7'sinin FVL'ye bağlı olmayan APCR'si olduğu, 1'inin düşük protein C ve 15'inin de düşük protein S seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir (Sarig ve ark., 2002).

Kazanılmış APCR, antifosfolipid sendromunda da görülebilmektedir. Bazı hastalarda antifosfolipid antikorlar (APL), APC: fosfolipid veya PS: fosfolipid komplexleriyle reaksiyona girerek FVa'nın APC tarafından inaktivasyonunu engelleyebilmektedir. Bu mekanizmayla APL'lerin kazanılmış APCR'ye sebep olabildikleri ve tromboz patojenezinde rol oynayabildikleri düşünülmektedir (Chrobak ve Dulicek, 1996).

FVL mutasyonu olmayan ancak trombotik komplikasyonu olan vakaların % 75'inde artmış FVIII seviyelerinin fenotipik APCR'ye neden olduğu gösterilmiştir ve bu vakalarda FVIII seviyelerinin 125IU/dl'nin üzerinde olduğu görülmüştür (Tosetto ve ark., 2000). Standart metodla yüksek FVIII seviyelerinin, APCR ile direkt bağlantılı olduğu ve bunun doza bağlı olduğu saptanmıştır (Laffan ve Manninig., 1996) (Grafik 1.1).

FVIII yüksekliği gibi hiperprotrombineminin de APCR testlerinde rezistansa neden olduğu düşünülmektedir (Tripodi ve ark., 2000). Protrombin G20210A mutasyonu taşıyan bireylerde orta seviyede APCR rapor edilmiştir. Artmış plazma protrombin seviyelerinin APC rezistansına neden olabileceği protrombinin APC'ye bağlı FVa inaktivasyonunu engelleyebileceği öne sürülmüştür (Curvers ve ark., 2002).

Aktive Protein C fenotipinin plazma Faktör V seviyelerinden etkilendiği; FV Leiden ve heterozigot FV eksikliği olan bireylerde, APC rezistansının FVL homozigot bireylerdeki gibi bulunduğu gösterilmiştir. Bu fenomen yalancı-APC

rezistansı homozigotluğu olarak adlandırılmıştır (Greengard ve ark., 1995). Luddington ve ark. (2000) in vitro modelde, FV seviyelerinin %20'nin altına düşmedikçe APCR'ye neden olmadığını saptamışlardır.

5'-TATTTATTATCATGAAATAACTTTGCAAATGAAAACAATTTTGAATATA

TTTTCTTT**TCAGGCAGGAACAACACC**ATGATCAGAGCAGTTCAACCAGG

GGAAACCTATACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG

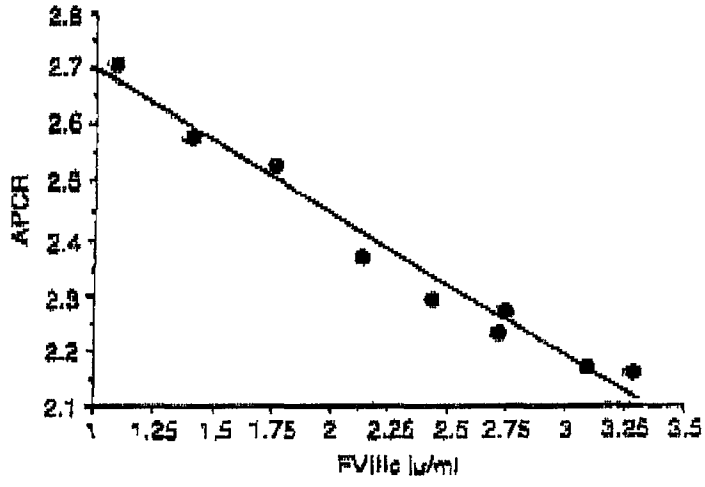
AAAATGATGCCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACAT

CATGAGAGACATCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGA

GCAGATCCCTGGACAGG**CGAGGAATACAGGTATTTTGTCCTTGAAGTA**

ACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTT-3'

Şekil 1.3. Faktör V 10, ekson gen dizisi. 319 bp'den oluşur ve Faktör V enziminin A2 alanını kodlar. APC'nin 3 tane bağlanma bölgesi bu alan üzerinde bulunmaktadır. 506. kodondaki Guanin nükleotidi Adenin'e dönüşünce Arjinin olan aminoasit Glutamin'e dönüşmektedir. Böylece APC'nin bağlanma bölgesi değişmekte ve APC bu bölgeye bağlanamamaktadır. Şekilde bu bölgeye uyan primer dizileri kalın karakterlerle ve mutasyonun olduğu baz ise çerçeve içerisinde ve altı çizili olarak gösterilmiştir (www.ncbi.nlm.nih.gov/ genbank).



Grafik 1.1 APCR ve FVIII seviyeleri ilişkisi

1.2.2.1 APCR' ye Yol Açan FVL dışı FV Mutasyonları

A) FV Hong Kong ve FV Cambridge

Chan ve ark. (1998) nın Hong Kong Çinlileri üzerinde yaptıkları araştırmada, Exon 7, 10 ve 13 üzerindeki Arg306, Arg506 ve Arg679 kodonları çalışılmış ve 1691G-A mutasyonu tespit edilmemiştir. Buna karşın 7. Eksonda 1090 A-G mutasyonunu bulmuşlardır. Bu noktada Arjinin 306- Glisin değişimi meydana gelir. Bu mutasyon 2 hastada ve 1 asemptomatik olguda gösterilmiştir. Hastalarda bu mutasyonu taşıma oranı %4.5 iken, sağlıklı kontrollerde %3.1 bulunmuş ancak istatistiksel olarak aradaki fark anlamsız olduğu saptanmıştır. 306. kodon, APC'nin kesim noktasında olduğu için önem kazanmıştır ancak APCR'ye neden olmadığı anlaşılmıştır.

Williamson ve ark.(1998) 306 Treonin mutasyonunu tanımlamışlar ve klinik olarak APC'nin etki bölgesinin ortadan kalkdığını göstermişlerdir. Bu mutasyon FV Cambridge adını almıştır ve APCR'ye neden olduğu bilinmektedir .

Faktör V Cambridge yalnızca beyaz ırkta, FV Hong Kong ise yalnızca beyaz ırkta ve Çinlilerde saptanmıştır ve mutasyonlardan etkilenen bireylerin sayısının azlığı heterozigotluk için bir saptama yapılmasını engellemektedir (Franco ve ark., 1999).

B) FV His1299Arg (4070 A-G) Mutasyonu (R2 Alleli)

Faktör V geninin 13. eksonunda, B alanının 1299. pozisyonunda Histidin yerine Arjinin gelmesiyle A4070G plimorfizmi ortaya çıkar ve HR2 haplotipi olarak adlandırılır. Bernardi ve ark. (1997) HR2 haplotipi ile belirlenen FV geninin tek başına zayıf APCR yaratabileceğini ve R506Q mutasyonu ile birlikte güçlü bir rezistansa neden olabileceğini rapor etmiştir. Luddington ve ark. (2000) larının çalışmasında ise R2 allelinin zayıf faktör V eksikliklerivle alakalı olabileceği ancak bunun belirgin bir APC rezistansı yaratmadığı rapor edilmiştir. Standart ve modifiye

yönteme bağlı olmaksızın HR2 haplotipinin APC rezistansına neden olmadığı ise çok yeni bir çalışmada rapor edilmiştir (Folsom ve ark., 2002).

1.2.3 ABO Kan Gruplarının Trombozla İlişkisi

Trombotik olaylarla ABO kan grubunun bağlantısı ilk kez 1969'da araştırılmıştır. Bu çalışmada oral kontraseptif kullanımı veya hamilelik esnasında tromboz geçiren kadınlarda O grubunda düşük bir sıklık olduğu görülmüştür. Genel hasta populasyonunda O- dışı kan gruplarıyla venöz tromboz (VT) arasında bir bağlantı olduğu öne sürülmüştür (Jick H. 1969). Bu konuda yapılan araştırmalar oldukça sınırlıdır. Westerholm ve ark. (1971) aynı sonuçları destekleyen bir çalışma yapmışlardır. Mourant ve ark.(1971) benzer bir çalışmada tromboembolik düzensizliklerde A grubunda belirgin bir sıklık ve O grubunda da düşük sıklık olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlara zıt olarak Nicolaides ve ark.(1975), 487 trombozlu hastada yaptıkları çalışmada kan gruplarıyla tomboz arasında bir ilişki kaydetmemişlerdir. Belçika populasyonunda yapılan bir çalışmada ise derin ven trombozlu hastalarda ABO kan gruplarının dağılımına bakılmıştır. 367 hastanın 176 (%48) sı A, 59 (%16,1) u B, 24 (%6,5) ü AB ve 108 (% 29,4) i O grubundadır. Belçika populasyonundaki kan grubu dağılımıyla karşılaştırıldığında B ve AB gruplarında fazla sıklık ve A ve O gruplarında da düşük sıklık olduğu görülmüştür. Bu çalışmada da tromboembolik düzensizliklerle ABO kan gruplarının bağlantısı diğer raporları desteklemektedir (Wautrecht, 1998).

Kan gruplarının trombozla ve FVL'yle ilişkisini tanımlayan çalışmalar yapılmış ancak APCR(+)'liği sıklığı ve APCR normalize oranlarıyla (APCR-NO) ilgisi belirtilmemiştir. Kan gruplarıyla tromboembolik hastalıklar arasındaki bağlantıya neden olan patofizyolojik mekanizmalar henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Bu ilişkiler hasta ve kan grupları dağılımı bazında araştırılmıştır. Ancak O- dışı kan gruplarında FVIII ve von Willebrand seviyelerinin, O grubuna göre daha yüksek seviyelerde olduğu bilinmektedir. O-dışı kan gruplarının ve yüksek FVIII seviyelerinin tromboz riskini belirgin bir şekilde arttırdığı ve kan grubu tipinin etkisinin FVIII seviyeleriyle kısmen alakalı olabileceği rapor edilmiştir. Yüksek

FVIII seviyeleri post-trombotik fenomen olabileceği için ABO kan grubu tipinin trombozda bağımsız bir etkisi olduğu düşünülmektedir (Bloemenkamp ve ark., 1999;O'Donnel ve ark., 2000). Yüksek FVIII seviyelerinin APC rezistansına neden olduğu ve bunun doz- cevap ilişkisi şeklinde olduğu rapor edilmiştir (De Visser ve ark.,1998).

1.2.4 Aktive Protein C Rezistansı Tayin Yöntemleri

FV Leiden mutasyonunun trombozlu hastaların % 20'sinde görülmesi ve yüksek venöz tromboz riski yaratması aktive protein C rezistansı tarama testlerinin çok sayıda laboratuvarda trombofili taramasının ilk basamağı olmasına neden olmuştur. APCR taramasında kullanılan çok sayıda ticari kit ve yöntem mevcuttur. Bunlar çoğunlukla aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTZ) ölçümüne dayanan testlerdir. Dahlback (1993) tarafından tanımlanan standart (orjinal) yöntemde APCR, APTZ testinde APC'nin etkisinin ölçülmesine dayanır. Bu ölçümde, hasta plazmasına dışardan aktive protein C eklenerek ve eklenmeyerek yapılan eş zamanlı iki APTZ sonucu oranlanır. Bu oran çeşitli firmaların kitlerine göre belli bir değerin altında olduğu zaman APCR pozitifliğini tanımlar. Bu yöntemde koagülasyon faktörlerinin normal seviyelerde olması bir gereksinimdir ayrıca lupus antikoagülanı olan veya oral antikoagülan terapi alan hastalarda da kullanımında güvenilir değildir. Daha sonraları bu yöntemin FVL için spesifik olmadığı görülerek faktör V'den yoksun plazma ile hasta plazmasının dilüe edilerek çalışıldığı modifiye yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem ile koagülasyon faktör seviyeleri normalleştirilmektedir. (Chitolie ve ark., 2001). Modifiye yöntemin FVL için yüksek hassasiyetine (%100' e yakın) karşın standart yöntem, APCR'nin FVL'ye bağlı olmayan çok çeşitli nedenlerini tanımlamada daha hassastır (Clark ve Walker, 2001).

Üçüncü bir yöntem ise DNA analizi ile mutasyon taramasıdır. Ancak DNA analizi sadece FV deki mutasyonları tanımlamakta kullanılmaktadır. Bilindiği gibi FV Leiden, APCR'nin en sık görülen nedeni olmakla beraber tüm APCR'li olguları açıklamaz. APCR'nin FVL'den bağımsız olarak da bir risk faktörü olduğu

bilinmektedir, dolayısıyla APCR'nin standart ve modifiye yöntemle taranarak pozitif ve sınırdaki değerlerin DNA analizleriyle doğrulanması tavsiye edilemektedir (Tripodi ve Mannucci, 2001).

Çalışmada kullandığımız yöntem olan ProC®Global'in duyarlılığı ve özgünlüğü yapılan çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (Ruzicka ve ark., 1997;Toulun ve ark., 2001; Dragoni ve ark., 2001). Bu çalışmalarda yöntemin, FVL ve PC defektleri için yüksek, PS defektleri için ise daha düşük duyarlılıkta olduğu bildirilmiştir. Dışarıdan aktive protein C eklenen diğer yöntemlerden farklı olarak ProC®Global yönteminde, protein C "Agkistrodon contortrix contortrix" yılanından elde edilen zehir ekstraktı ile endojen olarak aktive edilir. Standart ve modifiye ölçüm yöntemiyle elde edilen sonuçlar normalize oran (APCR-NO) olarak ifade edilir (Gardiner ve ark., 2002).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışma, A.Ü.T.F Kan Merkezi'ne Mart-Haziran 2002 tarihinde gelen gönüllü kan vericileriyle yapılmıştır. Lokal Etik Kurul onayı alınarak çalışma başlatılmıştır. Vericilerin sağlık durumları stabildir ve gönüllü kan ürünü verebilme kriterlerini (yaş ve ağırlık dışında) tutmaktadır. Çalışma gereği, daha önce trombotik atak geçirmemiş ve hiperkoagülan durumlarla ilgili defektleri olmayan bireyler çalışmaya dahil edilmiştir. Gönüllü vericilere, çalışma hakkındaki bilgileri içeren ve kendi rızalarıyla katılmaları istenen "Gönüllü verici bilgilendirme formu" sunularak onayları alınmıştır. Gönüllü vericilerden ürün toplanmasını takiben, 2 adet sitratlı tüpe kan alınmış ve en geç 45 dk. içerisinde laboratuvara ulaşmıştır. Laboratuvara ulaşan kan örneklerinin, kan grubu, yaş ve cinsiyet kayıtları yapılarak santrifüj ve plazma ayırımı işlemine geçilmiştir. Ayrılan plazmalar en geç bir hafta içerisinde çalışılmak üzere – 80 C de hızlı dondurulmuştur.

2.2 Yöntem

Kan örnekleri 0.129 M'lık ve 4.5 ml'lik sodyum sitratlı BD Vacutainer tüplere (REF367704 Lot:1P222 2002-08 STERILE) alınmıştır. Her sağlıklı vericiden 2'şer adet venöz kan örneği, kan alma koşullarına uygun şekilde alındıktan sonra kayıt işlemleri yapılmıştır. Hemolizli, pıhtılı ve hatalı hacimdeki örnekler, testlerin sonuçlarını etkilediği için çalışma grubundan çıkarılmıştır. Sağlıklı vericiler, kan grubu, yaş ve cinsiyet açısından düzenli bir sırayla gruplanmıştır. Laboratuvara en geç 45 dk. içinde ulaşan örnekler plazmaları ayrılmak üzere santrifüj aşamasına geçilmiştir.

Kan örneklerinden trombositten yoksun plazma elde etmek amacıyla, örnekler oda ısısında 3000 RPM'de 15 dk. kez santrifüj edilmiştir. Elde edilen plazma kısmı, dibe çöken trombositlere temas etmeden pipetle 500'er µl'lik hacimlerde 1500 µl kapasitedeki ependorf tüplere aktarılmıştır. Tüplerin üzerlerine sıra numaraları ve tarih yazılarak –80 C'de hızlı dondurulmuştur.

-80 C'de dondurulmuş plazma örnekleri, 37 °C'lik su banyosunda 15 dk bekletilerek hızla çözülmüş; plazmalar Behring koagülasyon tüplerine aktarılmıştır. Hala mevcut olabilecek trombositlerden arındırmak için oda ısısında 5 dk 3000 RPM'de santrifüj işlemi tekrarlanarak, plazmalar cihazda çalışmaya hazır hale getirilmişlerdir.

APCR'yi ölçmek için kullandığımız ProC®Global testi (Dade Behring, Marburg, Germany), insan plazmasında Protein C antikoagülan yolunun antikoagülan kapasitesini değerlendirmek ve kazanılmış veya kalıtsal defektlerin neden olduğu APCR'nin tespit edilmesi için geliştirilmiş bir kittir. Testin faktör V Leiden ve protein C eksikliğine yüksek, protein S eksikliğine ise orta derecede hassas olduğu bilinmektedir (Rimmer ve ark.,2000; Gardiner ve ark., 2002). Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTZ) ölçümüne dayanan ve endojen PC'nin aktive edilmesini takiben pıhtılaşma zamanındaki uzamayı kaydeden yöntemin FVL için spesifik amaçlı kullanımı söz konusuysa, modifiye ölçüm yöntemi (FV'den yoksun plazma ile dilüsyon) kullanılır. (Quincampoix ve ark., 2001). Çalışma boyunca standardizasyonun sağlanması için, ProC Global kiti içine dahil olan ve dahil olmayan kitlerde aynı lot numaraları kullanılmıştır. APCR(+) olan ve sınırdaki değerler 2 kez çalışılarak tekrar edilmiştir.

2.2.1. ProC®Global Standart Ölçüm Yöntemi

A) Prensip

Protein C (PC) sistemi aktive edilirken aynı anda koagülasyon süresi hesaplanmaktadır. Plazma örneğinin, protein C aktivatörü (PCA) ve kontak faz

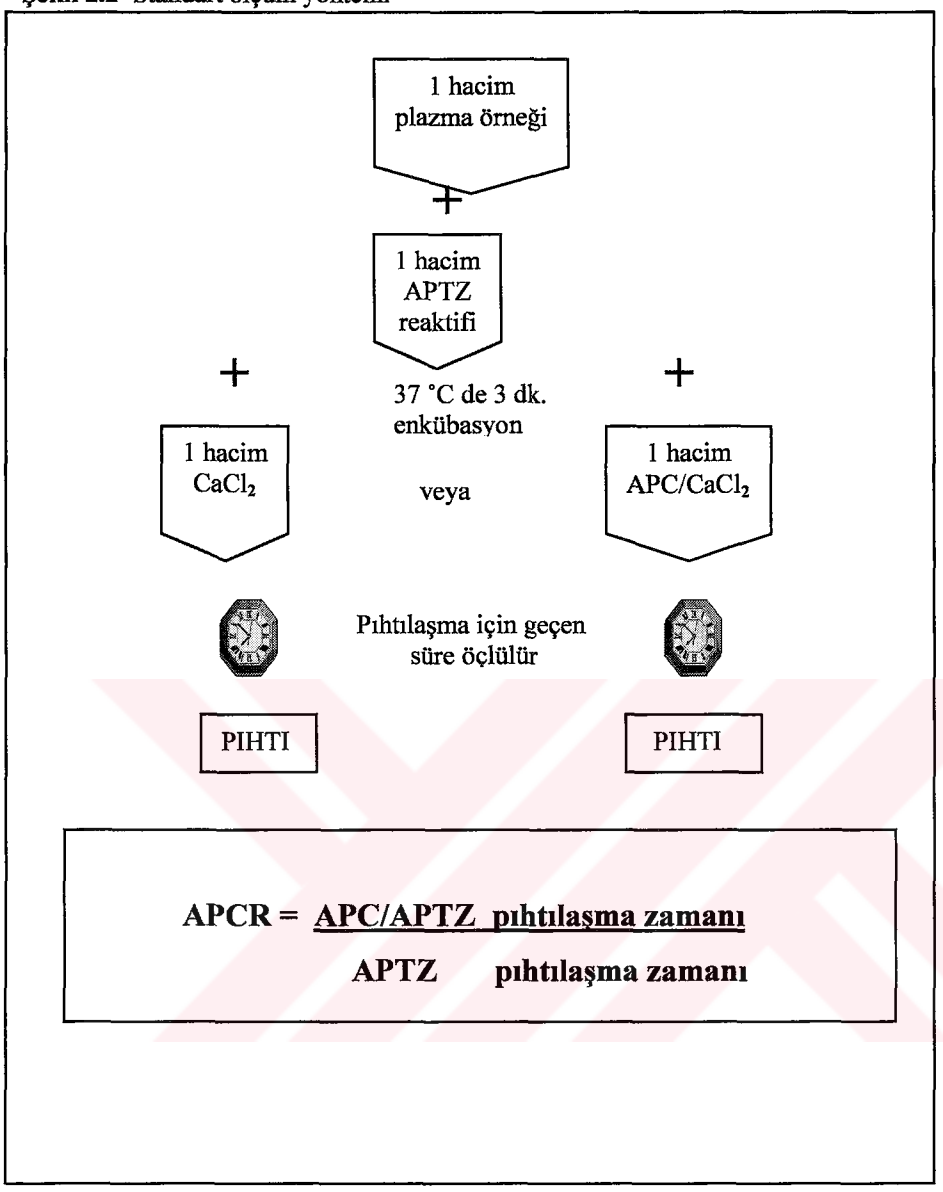
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

aktivatörü ile inkübe edilmesi PC'nin ve intrensek yolun aktivasyonunu sağlar. Koagülasyon, kalsiyum iyonlarının ilave edilmesiyle tetiklenir. Aktive Protein C (APC), protein S'nin kofaktörlüğünde VIIIa ve Va'yı inaktive eder. İnaktivasyon pıhtı oluşumunu erteler ve pıhtı oluşumu için geçen süre hesaplanır (PCAZ= Protein C Aktivasyon Zamanı). Prokoagülan faktörlerdeki bir eksiklik veya yüksek seviyelerdeki heparin varlığı elimine edilmelidir çünkü bu faktörler koagülasyon süresinde yalancı uzamalara sebep olmaktadır. Bu amaçla, PCAZ/0 kontrolü kullanılır ki, bu değer <60 sn olmalıdır. Plazma örneğinde 1 U/ml'ye kadar bulunabilecek heparin varlığı reaktif içerisindeki heparin inhibitörü ile normalize edilebilmektedir (ProC Global kit prospektüsü, Dade Behring).

ProC®Global ölçüm yöntemi, aynı anda çalışılan iki APTZ ölçümüne dayanır. İlk ölçümde, APTZ reaktifi eklenmeden önce, PCAZ'nin ölçülmesi için hasta plazmasına PCA eklenir. İkinci ölçümde PCA yerine tampon eklenerek PCAZ/0 hesaplanır. PCAZ/0 ortamda 0 miktarda aktivatör olduğunu ifade etmektedir. Plazma örneğinin kalitesinin gösterilmesinde gereklidir. Saklama koşullarından, plazmada faktör eksikliğinden ve faktör tüketiminden kaynaklanan olumsuz durumlar, PCAZ/0'ın 60sn üzerinde olmasıyla gösterilir. 60 sn üzerindeki değerlerde çalışma geçersiz sayılır ve çalışma yeni kan örneğiyle tekrarlanmalıdır. PCAZ/0'ın ölçülmesinin ikinci nedeni de çıkan sonuçların normalize oran (APCR-NO) olarak verilebilmesidir. Ortama APTZ reaktifi eklenmesiyle intrensek yol aktive edilir. Burada kullanılan APTZ reaktifi kit içerisinde mevcuttur. Böylece lot farklılıklarından doğabilecek olumsuzluklar elimine edilmiştir. Koagülasyon kalsiyum klorürün de eklenmesiyle tetiklenir (Şekil 2.1.).

Protein C antikoagülan yolunun fonksiyonelliğinin bozulmadığı durumlarda PCAZ, PCAZ/0'ın en az 3 katıdır. Faktör V Leiden mutasyonu, protein C veya protein S eksikliklerinde beklenen uzama gerçekleşmeyecektir.

Şekil 2.2 Standart ölçüm yöntemi



B) Değerlendirme

APCR değerlendirmesi, eş zamanlı olarak çalışılan PCA eklenen ve eklenmeyen iki APTZ sonucunun birbirine oranlanmasıyla yapılır. Elde edilen oran, belli katsayılarla çarpılarak "Normalize Oran (NO) " hesaplanır. Reaktif üreticisinin tavsiye ettiği üzere sonuçları NO olarak vermek, laboratuvarlar arası değerlendirmenin kolaylığı bakımından gereklidir. Farklı cihazlarda çalışmanın ve farklı lot numaralarının yaratabileceği olumsuzluklar böylece engellenir.

Normalize oranın hesaplanması için, standart insan plazmanın (SİP) duyarlılık değeri (DD) kullanılır. SİP, cihazda hasta plazması gibi çalışılır ve bu örnekteki PCAZ/0 değeri PCAZ değerine bölünerek buradan bir oran elde edilir. Elde edilen bu oran yöntem için belirlenmiş olan duyarlılık değerine bölünerek kalibrasyon faktörü (KF) hesaplanır. KF, plazma örneklerinden elde edilen PCAZ/PCAZ/0 değeriyle çarpılarak örneklerdeki NO'lar hesaplanır.

$$KF = \frac{DD_{SİP}}{(PCAZ / PCAZ/0)_{SİP}}$$

$$NO_{örnek} = (PCAZ / PCAZ/0)_{örnek} * KF$$

Standart insan plazmasının duyarlılık değeri her lot numarasında değiştiği için, kalibrasyon faktörü her yeni lot numarasına, her ölçüm yöntemine ve cihaza göre hesaplanmalıdır.

C) İşlem

ProC®Global standart ölçüm yöntemi, tam otomatize koagülasyon analizöründe (BCS, Dade Behring, Marburg) uygulanmıştır. Bu cihaz pıhtı oluşumu ile meydana gelen bulanıklığı kaydeder (nefelometrik yöntem). Reaktif hazırlanması dışında tüm dilüsyonlar ve inkübasyonlar cihazda otomatik olarak yapılmaktadır (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Standart yöntem pipetleme şeması

ProC Global standart yön.	PCAZ/0	PCAZ
Sitratlı Plazma	50 µl	50 µl
PCA	-------	50 µl
ProC Global tamponu	50 µl	------
ProC Global APTZ	50 µl	50 µl
37 C de 3 dk. inkübasyon		
CaCl2	50 µl	50 µl

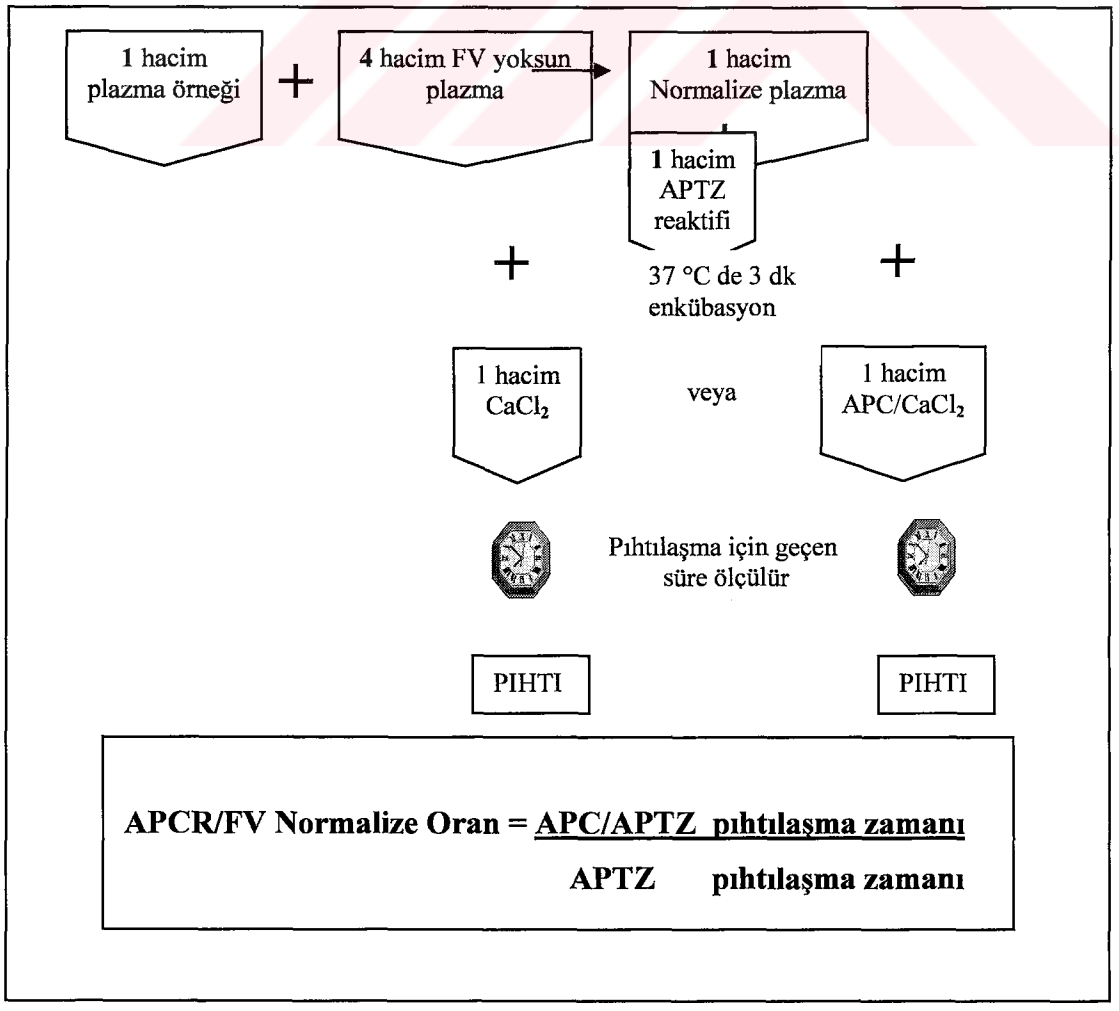
2.2.2. ProC® Global Modifiye Ölçüm Yöntemi

A) Prensip

ProC® Global standart ölçüm yöntemine ek bir basamak olarak hasta plazması, faktör V'den yoksun plazma ile dilüe edilerek çalışılır. Yöntemde dilüsyon oranı 1 hacim hasta plazması + 4 hacim FV'den yoksun plazmadır. 1 hacim dilüe edilmiş plazma örneği, 1 hacim APTZ reaktifi ile inkübe edilir. Standart yöntemde olduğu gibi, PCA eklenen ve eklenmeyen plazma örneklerine 1'er hacim $CaCl_2$ eklenmesiyle elde edilen iki APTZ testi sonuçları oranlanır (Şekil 2.2.). Bu yöntemde PCAT/0 değeri 90 sn'nin üzerindeki değerler kabul edilmez ve çalışma yeni kan örneği ile tekrar edilmelidir.

Bu yöntemin avantajı, plazma örneğinde bulunabilecek koagülasyon faktör seviyelerindeki düşüklüklerin veya yüksekliklerin normalize edilmesidir. Düşük NO' lar, FV Leiden mutasyonuna bağlı APCR'yi tanımlar. Kit prospektüsünde yöntemin FVL için, %98 hassasiyette ve %99 özgünlükte olduğu belirtilmiştir.

Şekil 2.2 Modifiye ölçüm yöntemi



B) Değerlendirme

Standart yöntemden farklı olarak, hesaplamada duyarlılık değeri (DD) değişir. Standart insan plazma reaktifinde modifiye yöntem için belirlenmiş olan hassasiyet değeri, SİP'in PCAZ/PCAZ/0 değerine bölünerek kalibrasyon faktörü hesaplanır. KF, plazma örneklerinden elde edilen PCAZ/PCAZ/0 değeriyle çarpılarak örneklerdeki NO'lar hesaplanır.

C) İşlem

ProC® Global modifiye ölçüm yöntemi, tam otomatize koagülasyon cihazında (BCS, Dade Behring, Marburg) uygulanmıştır. Yöntemdeki pipetleme miktarları modifiye yöntemden farklıdır (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. Modifiye yöntem pipetleme şeması

ProC Global / FV	**PCAZ/0**	**PCAZ**
Sitratlı Plazma	20 µl	20 µl
FV' den yoksun Plazma	80 µl	80 µl
PCA	-------	100 µl
ProC Global tamponu	100 µl	-------
ProC Global APTZ	100 µl	100 µl
37 C de 3 dk. inkübasyon		
CaCl2	100 µl	100 µl

2.2.3 İki Yöntem için Referans Aralıkları

ProC Global kiti prospektüsünde standart ve modifiye ölçüm yöntemleri için belirlenmiş olan referans aralıkları Tablo 2.3. de özetlendiği gibidir.

Tablo 2.3. ProC Global standart ve modifiye yöntemleri için referans aralıkları

	ProC Global Standart		**ProC Global/FV Modifiye**	
	Medyan	Aralık	Medyan	Aralık
PCAZ (sn)	132	85- 200	151	128-173
PCAZ/0 (sn)	44	35-55	78	68-91
Normalize Oran	0,94	0,69-1,56	0,99	0,86-1,10
n(örnek sayısı)	234	234	243	243

2.2.4. ProC® Global Kiti Reaktifleri

A) Kit içinde bulunan reaktifler

ProC® Global (Dade Behring, Marburg, Germany) kitinin reaktif hacimleri ve dayanıklıkları kitin optimal sayıda kullanımını sağlayacak şekildedir (Tablo 2.4; Tablo2.5). Her yeni lot numarasında, testlere ait bilgiler prospektüslerde verilmektedir. Testin optimal derecede hassasiyeti için iki farklı kontrol reaktifi ve hesaplamanın yapılması için de standart insan plazması ayrıca temin edilmektedir. Her çalışma başında ve çalışma esnasında bu kontrollerin kullanımı, kitin güvenilirliğini göstermektedir.

Tablo 2.4. ProC®Global kiti viallerinin hacim ve kompozisyonları

Reaktifin adı	**Hacim /Adet vial**	**İçerik**	**Fonksiyon**
APTZ reaktifi	5ml/ 4 vial	Silikon dioksit partikülleri, bitkisel kaynaklı fosfolipidler , sodyum klorür (2.4 g/l), HEPES (14.3 g/l), , koruyucu, pH 7.4	Distile su ile sulandırılara k 15 dk. oda ısısında bekletilir.
Protein C Aktivatör reaktifi	2ml /4 vial	Agkistrodon concortrix yılanı zehiri ekstraktı, HEPES (50 mmol/l), heparin nötralize edici: hexadimethrine bromide (15 mg/l), , koruyucular, pH 7.4	Liyofilize. Distile su ile sulandırılara k 15 dk. oda ısısında bekletilir
Tampon	2ml /4 vial	HEPES (50 mmol/l), heparin nötralize edici: hexadimethrine bromide (15 mg/l), koruyular, pH 7.4	Kullanıma hazır. Çalışmadan önce 15dk oda ısısında bekletilir..

Tablo 2.5. Kitlerin Dayanıklılıkları ([1] açık vial, [2] kapalı vial, [3] bir kez dondurulmuş vial)

Isı	APTZ	PCA Reaktifi	Tampon
+15 - +25 °C [1]	24 saat	24 saat	24 saat
+15 °C [1]	2 gün	2 gün	2 gün
+2 - +8 °C [2]	2 hafta	2 hafta	2 hafta
-20 °C [2],[3]	--------	4 hafta	4 hafta

B) Kit içinde bulunmayan reaktifler

ProC®Global tayininin güvenilirliği internal kontrol reaktifleriyle arttırılmıştır. Kitin içine dahil olmayan bu reaktifler, aynı firmadan (Dade Behring, Marburg, Germany) sağlanmaktadır. Bu amaçla kullanılan kontroller, Standart insan plazması, Kontrol N ve ProC Kontrol Plazmasıdır. Ayrıca çalışmada pıhtılaşmanın tetiklenmesi için gerekli olan $CaCl_2$ de firmaya aittir.

- **Standart İnsan Plazması (Standart Human Plasma)**

Standart insan plazması (Dade Behring, Marburg, Germany) koagülasyon ve fibrinoliz testlerinin kalibrasyonunda kullanılmaktadır. Reaktif prospektüsünde bulunan tablodaki % değerleri, sağlıklı ve taze sitratlı insan plazması havuzundan elde edilmiştir ve tüm koagülasyon faktörlerinin aktivitesinin normal olduğunu gösterir. Koagülasyon faktörleri ve inhibitörleri WHO standartlarına göre kalibre edilmiş ve değerler uluslararası ünite olarak verilmiştir. SİP, hepes tampon solüsyonuyla (12 g/l) stabilize edilmiştir ve liyofilizedir. Koagülasyon sisteminin kontak aktivasyonunu engellemek için, silikonize viallerde saklanmaktadır. Koruyucu ihtiva etmez ve distile su ile sulandırılarak oda ısısında 15 dk. bekletilerek kullanıma hazır hale gelir.

- **Kontrol N (Control N)**

Koagülasyon ve fibrinoliz testlerinin normal aralık kontrolü için kullanılır. Kontrol N, sağlıklı kan vericilerinden toplanmış plazma havuzundan elde edilmiştir. HEPES

tampon solüsyonu (12 g/l) ile stabilize edilmiştir ve liyofilizedir. Kontak aktivasyonun önlenmesi için silikonize viallerde saklanmaktadır. Kontrol N koruyucu ihtiva etmez ve distile su ile sulandırılarak oda ısısında 15 dk. bekletilerek kullanıma hazır hale gelir.

- **ProC Anormal Kontrol Plazması (ProC Abnormal Control Plasma)**

ProC Kontrol Plazması, ProC Global yöntemiyle elde edilen patolojik oranların doğruluğunu gösteren anormal kontrol plazmasıdır. Sağlıklı kan vericilerinden elde edilen plazma havuzundan hazırlanmıştır ve tavşan plazması eklenerek belli bir hassasiyete getirilmiştir. Tavşan Faktör V'i, Faktör V Leiden'de olduğu gibi APC tarafından kolayca inaktive edilmez., bu nedenle APC'ye bağlı testlerde koagülasyon zamanında uzama meydana gelmez. ProC Kontrol Plazması, Hepes tampon solüsyonuyla (12 g/l) stabilize edilmiştir ve liyofilizedir. Koruyucu ihtiva etmez ve distile su ile sulandırılarak 15 dk oda ısısında bekletilerek kullanıma hazıe hale gelir.

- **Faktör V'den yoksun plazma (Factor V Deficient Plasma)**

Faktör V'nin aktivitesini ölçmek ve özel amaçlı olarak insan plazmasında FVL'ye bağlı APCR'yi tespit etmek için kullanılır. Faktör V'den yoksun plazma, %1'e eşit ya da daha az Faktör V aktivitesi olan liyofilize insan plazmasıdır. İmmünoadsorpsiyon yöntemi ile üretilmiştir. İçerisinde stabilizör olarak mannitol (20 g/l) ve heparin nötralizatörü olarak hexadimethrine bromide (5 mg/l) bulunmaktadır. ProC Global testinde kullanımında, plazma örneği, Faktör V'den yoksun plazma ile 1+4 oranında dilüe edilir. Dilüsyon ile diğer faktörlerin etkileri minimize edilmiş olur ve azalmış normalize oranın, Faktör V Leiden'e bağlı olduğu anlaşılır. Distile su ile sulandırılır ve oda ısısında 15 dk bekletilerek kullanıma hazır hale getirilir.

2.2.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmada gruplar arası dağılım sıklığının karşılaştırılmasında ki-kare testi ve Fisher Exact testi kullanıldı. Her iki yöntemin birbiriyle uyumu McNemar testi ile değerlendirildi. Aktive protein C rezistansı normalize oranları (APCR-NO), her iki test yönteminde de Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Kan gruplarına göre APCR-NO'ları ise One way Anova testi ile karşılaştırıldı. Tüm istatistik sonuçlarında $p<0,05$ altı anlamlı kabul edildi. İstatistiksel hesaplamalar SPSS 10.0 paket programıyla yapıldı.

3.BULGULAR

Çalışmaya alınan 250 bireyden 57'si O (%22.8), 64'ü A (%25.6), 65'i B (%26) ve 64'ü AB (%25.6) kan grubundadır. 250 bireyin 208'i erkek (%83,2), 42'si (%16.8) kadın olup tüm bireylerin yaş ortalaması 33 olarak bulunmuştur (X ±SD = 33.58± 9.03). Standart ve modifiye yöntemle çalışılan 250 bireyin normalize oran sonuçları ve pozitiflik-negatiflik dağılımları Tablo 3.1. de verilmiştir.

Tablo 3.1. ProC Global Standart ve Modifiye yöntem ile çalışılan 250 sağlıklı kan vericisine ait bilgiler ve sonuçlar. PCGNO, standart yöntemle çalışılan, PCGFVNO, modifiye yöntemle çalışılan olguların normalize oranlarıdır.

Plazma no	Kan.grubu	Yaş	Cinsiyet	PCGNO	Poz-Neg	PCGFVNO	Poz-Neg
1	O	24	E	0,99	neg	1,08	neg
2	**AB**	**38**	**K**	**0,47**	**poz**	**0,49**	**poz**
3	A	37	E	1,17	neg	1,08	neg
4	O	27	E	1,33	neg	1,13	neg
5	O	35	E	1,13	neg	1,16	neg
6	A	33	E	1,06	neg	1,12	neg
7	A	42	E	1,13	neg	1,18	neg
8	B	19	E	1,22	neg	1,1	neg
9	A	28	E	1,13	neg	1,09	neg
10	O	36	E	1,13	neg	1,09	neg
11	O	33	E	1,3	neg	1,14	neg
12	B	29	E	1,31	neg	1,17	neg
13	B	29	E	1,21	neg	1,18	neg
14	A	37	E	1,1	neg	1,1	neg
15	O	20	K	1,19	neg	1,09	neg
16	O	34	K	1,36	neg	1,09	neg
17	O	34	E	1,13	neg	1,06	neg
18	O	28	E	1,24	neg	1,11	neg
19	A	31	E	1,22	neg	1,07	neg
20	**B**	**42**	**E**	**0,43**	**poz**	**0,42**	**poz**
21	A	47	E	1,19	neg	1	neg
22	A	41	K	1,07	neg	1,01	neg
23	A	41	E	1,44	neg	1,26	neg
24	A	19	E	1,01	neg	1,04	neg
25	A	19	E	1,3	neg	1,1	neg
26	AB	27	E	1,01	neg	1,02	neg
27	O	33	E	1,428	neg	1,22	neg
28	B	39	E	1,08	neg	1,05	neg
29	**A**	**27**	**E**	**0,8**	**neg**	**0,54**	**poz**
30	O	26	E	1,26	neg	1,07	neg
31	O	25	E	0,9	neg	0,95	neg
32	O	28	E	1,13	neg	0,98	neg
33	**A**	**27**	**E**	**0,75**	**neg**	**0,56**	**poz**
34	O	34	E	1,1	neg	1,08	neg
35	B	29	E	1	neg	1,1	neg
36	B	49	E	1,24	neg	1,1	neg
37	B	42	E	1,08	neg	1,14	neg
38	O	26	E	1,01	neg	1,11	neg
39	B	37	E	0,82	neg	1,09	neg

40	A	34	E	1,07	neg	1,05	neg
41	A	40	E	1,22	neg	1,1	neg
42	A	37	E	1,23	neg	1,1	neg
43	A	47	E	1,05	neg	1	neg
44	B	26	K	1,3	neg	1,17	neg
45	A	20	E	1,05	neg	1,01	neg
46	A	38	E	1,13	neg	1,2	neg
47	O	30	E	1,09	neg	1,12	neg
48	B	25	K	1,51	neg	1,18	neg
49	A	26	E	1,35	neg	1,17	neg
50	**O**	**25**	**E**	**0,6**	**poz**	**0,5**	**poz**
51	O	22	E	1,49	neg	1,1	neg
52	O	32	E	0,99	neg	1,12	neg
53	A	20	E	1,4	neg	1,15	neg
54	B	43	K	1,01	neg	1,02	neg
55	O	29	E	1,13	neg	1,11	neg
56	O	32	E	1,44	neg	1,09	neg
57	O	32	E	1,26	neg	1,24	neg
58	O	30	E	0,92	neg	1,04	neg
59	A	34	E	1,21	neg	1,08	neg
60	O	30	E	1,16	neg	1,21	neg
61	A	40	E	1,05	neg	1,02	neg
62	A	38	E	1,18	neg	1,16	neg
63	A	47	K	0,89	neg	0,98	neg
64	A	39	E	1,18	neg	0,98	neg
65	O	33	E	1,24	neg	1,07	neg
66	O	30	E	1,2	neg	1,04	neg
67	O	40	E	1,3	neg	1,22	neg
68	**A**	**21**	**E**	**0,77**	**neg**	**0,53**	**poz**
69	A	28	E	1,18	neg	1,15	neg
70	A	40	E	1	neg	1,17	neg
71	O	34	E	1,57	neg	1,17	neg
72	**A**	**19**	**E**	**0,66**	**poz**	**0,52**	**poz**
73	A	30	K	1,36	neg	1,07	neg
74	O	26	E	0,86	neg	0,97	neg
75	A	37	E	0,93	neg	1,01	neg
76	AB	32	E	1,16	neg	1,15	neg
77	A	35	E	1,43	neg	1,13	neg
78	AB	23	K	1,28	neg	1,09	neg
79	AB	26	E	1,02	neg	1,11	neg
80	**A**	**37**	**E**	**0,72**	**neg**	**0,57**	**poz**
81	**AB**	**30**	**E**	**0,77**	**neg**	**0,56**	**poz**
82	O	40	E	1,27	neg	1,16	neg
83	O	40	E	1,16	neg	1,37	neg
84	B	41	E	1,22	neg	1,11	neg
85	O	43	E	1,33	neg	1,12	neg
86	A	36	E	1,07	neg	1,12	neg
87	AB	29	E	1,24	neg	1,17	neg
88	A	19	E	1,04	neg	1,18	neg
89	AB	22	E	1,22	neg	1,06	neg
90	A	26	E	1,08	neg	0,99	neg
91	A	42	E	1,36	neg	1,04	neg
92	A	37	E	1,11	neg	1,12	neg
93	B	36	E	1,08	neg	1,14	neg
94	AB	28	E	1,06	neg	1,11	neg
95	AB	48	E	1,17	neg	1,22	neg
96	AB	24	E	1,26	neg	1,11	neg
97	AB	24	E	1,14	neg	1,06	neg
98	**AB**	**28**	**E**	**0,75**	**neg**	**0,6**	**poz**
99	AB	44	E	0,99	neg	1,04	neg
100	AB	38	E	1,23	neg	1,2	neg
101	B	22	E	0,98	neg	1,18	neg
102	A	38	E	1,25	neg	1,07	neg
103	A	38	E	0,94	neg	0,92	neg
104	AB	37	E	1,08	neg	1,16	neg
105	A	29	E	0,97	neg	1,02	neg
106	B	62	K	1,24	neg	1,12	neg

107	A	32	E	1,12	neg	0,99	neg
108	A	37	E	1,1	neg	1,12	neg
109	B	44	K	1,2	neg	1,15	neg
110	A	43	E	1,33	neg	1,14	neg
111	AB	30	E	1,14	neg	1,1	neg
112	B	34	E	1,23	neg	1,04	neg
113	B	32	K	0,86	neg	1,03	neg
114	AB	37	E	0,91	neg	1,14	neg
115	**AB**	41	E	**0,79**	neg	1,1	neg
116	**B**	**35**	**E**	**0,69**	**poz**	**0,59**	**poz**
117	B	29	E	1,27	neg	1,19	neg
118	AB	34	E	1,02	neg	1,04	neg
119	AB	36	E	1,28	neg	1,26	neg
120	AB	52	E	0,88	neg	1,12	neg
121	A	34	E	1	neg	1,11	neg
122	AB	26	E	1,16	neg	1,22	neg
123	AB	36	E	1,08	neg	1,26	neg
124	A	32	E	1,05	neg	1,06	neg
125	A	21	E	1,32	neg	1,22	neg
126	O	33	E	1,23	neg	1,08	neg
127	AB	21	E	1,14	neg	1,29	neg
128	AB	46	E	1,02	neg	1,02	neg
129	AB	45	E	0,9	neg	1,12	neg
130	O	40	E	1,38	neg	1,09	neg
131	A	44	K	0,96	neg	1,03	neg
132	O	38	E	1,13	neg	1,25	neg
133	O	63	E	1,18	neg	1,2	neg
134	B	54	K	1,16	neg	1,15	neg
135	B	20	E	1,16	neg	1,26	neg
136	O	53	E	1,32	neg	1,3	neg
137	B	21	E	1,26	neg	1,09	neg
138	B	21	E	1,17	neg	0,99	neg
139	B	44	E	1,07	neg	1,14	neg
140	**AB**	**27**	**E**	**0,59**	**poz**	**0,59**	**poz**
141	**B**	**46**	**E**	**0,84**	**neg**	**0,6**	**poz**
142	B	46	E	0,99	neg	1,05	neg
143	**B**	**40**	**E**	**1,02**	**neg**	**0,62**	**poz**
144	**O**	**22**	**E**	**0,52**	**poz**	**0,56**	**poz**
145	B	25	E	1,41	neg	1,13	neg
146	B	29	E	1,25	neg	1,17	neg
147	O	31	K	1,31	neg	1,11	neg
148	O	32	E	1	neg	1,03	neg
149	A	38	E	1,12	neg	1,28	neg
150	A	19	E	1,07	neg	1,13	neg
151	B	27	E	1,25	neg	1,16	neg
152	A	31	E	1,05	neg	0,93	neg
153	O	19	K	1,05	neg	0,97	neg
154	A	19	E	1,09	neg	1,28	neg
155	O	39	E	1,32	neg	1,2	neg
156	O	38	E	1,42	neg	1,21	neg
157	O	28	E	1,11	neg	1,18	neg
158	B	28	E	1,17	neg	1,13	neg
159	O	28	E	1,16	neg	1,15	neg
160	B	40	E	1,06	neg	1,13	neg
161	B	36	K	1,27	neg	1,06	neg
162	**A**	**32**	**K**	**0,57**	**poz**	**0,54**	**poz**
163	A	47	E	1,15	neg	1,22	neg
164	O	52	E	1,11	neg	1,1	neg
165	O	52	E	1,33	neg	1,12	neg
166	O	47	E	1,26	neg	1,18	neg
167	O	20	E	1,15	neg	1,13	neg
168	B	46	E	1,15	neg	1,2	neg
169	AB	24	K	1,13	neg	1,22	neg
170	AB	39	K	1,15	neg	1,11	neg
171	AB	28	E	0,93	neg	1,09	neg
172	AB	38	E	0,89	neg	1,08	neg
173	AB	21	E	1,4	neg	1,03	neg

174	B	44	E	1,24	neg	1,13	neg
175	AB	22	E	1,01	neg	0,93	neg
176	B	25	E	0,98	neg	0,95	neg
177	B	28	E	1,04	neg	1,03	neg
178	B	36	E	1,13	neg	1,16	neg
179	AB	29	E	1,05	neg	1,04	neg
180	B	41	E	1,39	neg	1,15	neg
181	AB	43	E	1,13	neg	1,17	neg
182	B	43	E	1,09	neg	1,14	neg
183	A	24	E	1,16	neg	0,99	neg
184	**B**	**47**	**K**	**0,62**	**poz**	**0,56**	**poz**
185	AB	48	E	1,3	neg	1,1	neg
186	B	23	E	1,19	neg	1,14	neg
187	AB	27	E	1,01	neg	1,06	neg
188	AB	32	E	1,34	neg	1,21	neg
189	**AB**	**36**	**E**	**0,86**	**neg**	**0,56**	**poz**
190	**B**	**28**	**E**	**0,67**	**poz**	**0,87**	**neg**
191	AB	25	E	1,08	neg	1,14	neg
192	**AB**	**21**	**K**	**0,63**	**poz**	**0,54**	**poz**
193	B	37	E	0,91	neg	0,91	neg
194	**B**	**36**	**E**	**0,6**	**poz**	**0,53**	**poz**
195	B	34	E	1,17	neg	1,05	neg
196	B	23	E	1,05	neg	1,15	neg
197	AB	25	E	1,18	neg	1,09	neg
198	**B**	**23**	**E**	**0,8**	**neg**	**0,57**	**poz**
199	B	27	E	1,26	neg	1,13	neg
200	AB	45	E	1,06	neg	1,33	neg
201	**B**	**41**	**E**	**0,74**	**neg**	**0,59**	**poz**
202	B	46	E	1,19	neg	1,17	neg
203	AB	33	E	1	neg	1,03	neg
204	AB	38	K	1,48	neg	1,16	neg
205	AB	43	E	1,14	neg	1,02	neg
206	AB	32	K	1,27	neg	1,16	neg
207	AB	41	E	1,44	neg	1,34	neg
208	B	42	E	1,01	neg	1	neg
209	B	38	E	1,07	neg	1,05	neg
210	AB	45	E	1,36	neg	1,2	neg
211	B	19	E	1,12	neg	1,16	neg
212	B	33	E	1,05	neg	1,1	neg
213	**AB**	**24**	**E**	**0,6**	**poz**	**0,53**	**poz**
214	AB	24	E	1,27	neg	1,06	neg
215	A	39	E	1,06	neg	1,04	neg
216	B	41	E	1,14	neg	1,07	neg
217	O	31	E	1,24	neg	1,11	neg
218	B	24	K	1,32	neg	1,04	neg
219	A	25	K	1,07	neg	0,96	neg
220	A	26	K	1	neg	1,09	neg
221	O	32	K	1,13	neg	1,15	neg
222	A	27	K	0,97	neg	1,01	neg
223	A	35	K	1,25	neg	1,19	neg
224	B	25	K	0,87	neg	1	neg
225	A	28	K	1,25	neg	1,35	neg
226	B	28	E	1,08	neg	1,06	neg
227	**A**	**39**	**K**	**0,61**	**poz**	**0,55**	**poz**
228	B	24	K	1,17	neg	0,97	neg
229	AB	36	K	1,27	neg	1,15	neg
230	O	24	E	1,42	neg	1,06	neg
231	**O**	**27**	**K**	**0,81**	**neg**	**0,54**	**poz**
232	O	27	K	1,21	neg	1,16	neg
233	O	22	E	1,24	neg	1,04	neg
234	O	27	K	1,46	neg	1,26	neg
235	B	39	K	1,05	neg	1,1	neg
236	B	45	E	1,51	neg	1,1	neg
237	O	20	K	0,9	neg	**0,87**	neg
238	A	27	K	0,89	neg	1	neg
239	AB	34	E	1,1	neg	1,01	neg
240	AB	59	E	1,15	neg	1,1	neg

241	B	58	E	0,93	neg	1	neg
242	AB	43	E	0,85	neg	0,99	neg
243	AB	26	E	1,16	neg	1,03	neg
244	AB	54	E	0,99	neg	1,04	neg
245	AB	36	E	1,08	neg	1,08	neg
246	**AB**	**48**	**E**	**0,51**	**poz**	**0,4**	**poz**
247	AB	37	E	1,09	neg	1,35	neg
248	**AB**	**35**	**E**	**0,52**	**poz**	**0,57**	**poz**
249	**AB**	**42**	**E**	**0,61**	**poz**	**0,77**	**poz**
250	AB	33	E	1,22	neg	**0,87**	neg

3.1. Kan gruplarına göre APCR(+)'liği sıklığı

Çalışmaya alınan 250 olguda APCR iki yöntemle ayrı ayrı değerlendirildiğinde, standart yönteme göre modifiye yöntemde APCR(+)'lik sıklığı fazla idi (17 olguya karşı 28 olgu, p=0,03) (Tablo 3.2.). APCR(+)'liğinin kan gruplarına göre dağılımında ise gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Hem standart yöntemde hem de modifiye yöntemde APCR(+) olguların sıklığının kan gruplarına göre dağılımı farklı değildi (p=0.357 ve p=0,339).

Tablo 3.2. Kan gruplarına göre her iki yöntemle saptanan APCR(+) olgu sayısı (Standart yöntemde alt sınır 0,69, modifiye yöntemde 0,86 olarak alınmıştır)

Kan grupları	**Standart yöntem**	**Modifiye yöntem**	**P**
O (n=57)	2	3	0.99
A (n=64)	3	7	0.125
B (n=65)	5	8	0.375
AB (n=64)	7	10	0.250
Toplam (n=250)	17	28	0.03

3.2. Her iki yöntem ile APCR(-) olarak saptanan olgular

Her iki yöntem ile de APCR(-) olarak saptanan olgular (n=221) ayrı bir grup olarak değerlendirildi ve APCR normalize oranları (APCR-NO) iki yöntem için karşılaştırıldı. Tüm olgularda medyan APCR-NO standart yöntemle 1,14± 0,15 iken modifiye yöntemle 1,10±0,09 olarak saptandı ve bu fark istatistiksel olarak

anlamlıydı (p<0.0001). Kan gruplarına göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde AB grubu dışındaki kan gruplarında APCR-NO'ları iki yöntemle farklı bulundu (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 APCR(-) olgularda iki yöntemle bulunan APCR-NO değerlerinin kan gruplarına göre dağılımı (*p<0,05; **p<0,01)

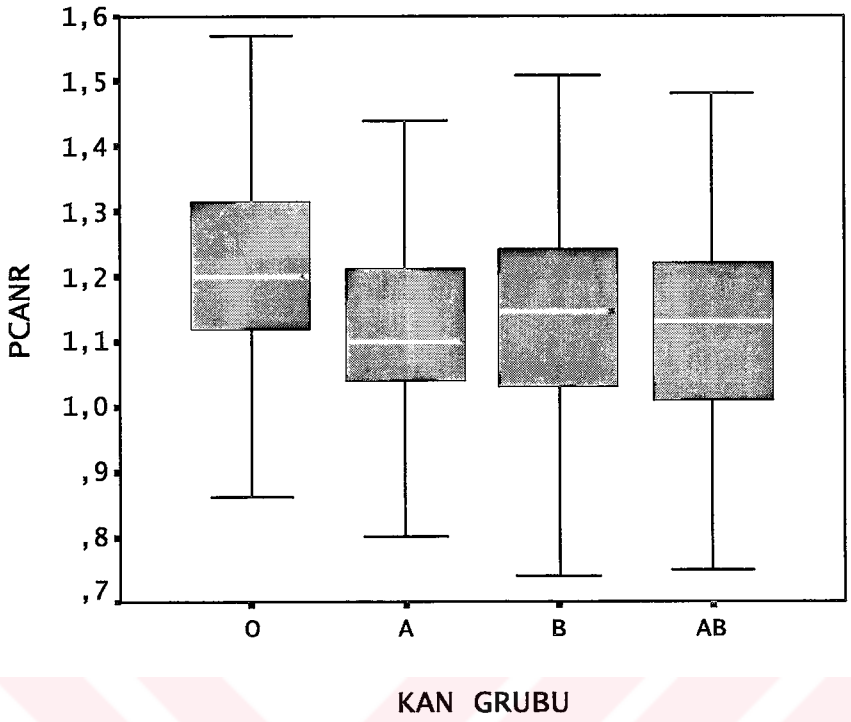
Kan grupları	**Standart yöntem**	**Modifiye yöntem**	**p**
O (n=54)	1,21 (0,86-1,57)	1,11 (0,87-1,37)	<0.0001**
A (n=57)	1,11 (0,89-1,44)	1,09 (0,92-1,35)	0,032*
B (n=56)	1,16 (0,82-1,51)	1,12 (0,91-1,26)	0,023*
AB (n=54)	1,14 (0,79-1,48)	0,11 (0,87-1,35)	0,785
Toplam (n=221)	1,14 (0,79-1,57)	1,10 (0,87-1,37)	<0.0001**

3.3. Standart yöntemde APCR(-) olgularda APCR-NO'ları

Standart yöntemde 233 olguda APCR(-) idi ve medyan APCR-NO 1,13±0,16 idi. Kan gruplarına göre APCR-NO'ları istatistiksel olarak farklı idi (p=0,009). O kan grubuna sahip olguların medyan APCR-NO'larının A ve AB grubuna göre farklı olduğu görüldü (p=0,016) (Tablo 3.4., grafik 3.1.).

Tablo 3.4. Standart yöntemde APCR(-) olgularda APCR-NO'larının kan gruplarına göre dağlımı

Kan grupları	**Standart yöntem Medyan (±2SD)**	**p**
O (n=55)	1,20 (0,81-1,57)	
A (n=61)	1,10 (0,72-1,44)	
B (n=60)	1,15 (0,74-1,51)	
AB (n=57)	1,13 (0,75-1,48)	
Toplam (n=233)	1,13 (0,72-1,57)	0,009**



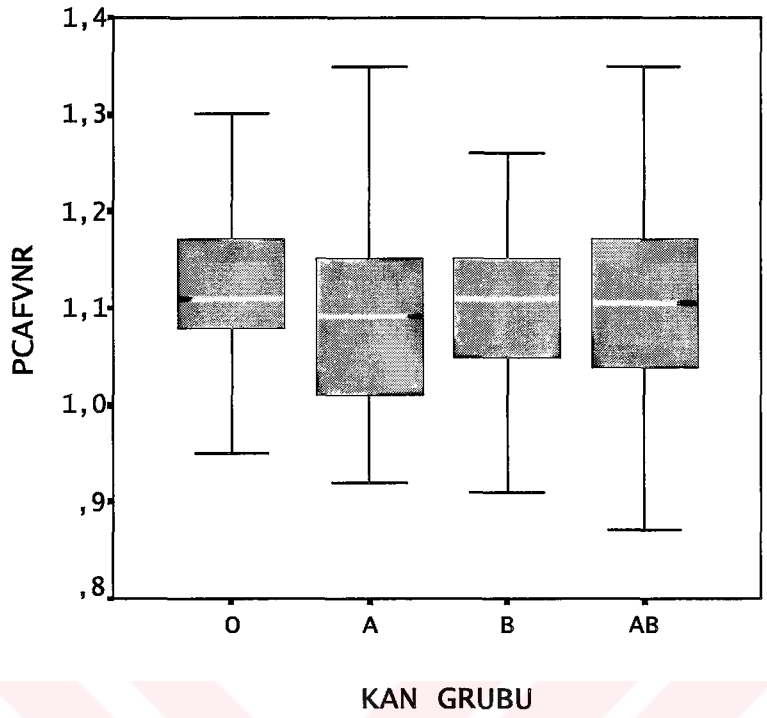
Grafik 3.1. Standart yöntemde APCR(-) olgularda APCR-NO'larının kan gruplarına göre dağılımı

3.4. Modifiye yöntemde APCR(-) olgularda APCR-NO'ları

Modifiye yöntemde 222 olguda APCR(-) idi ve medyan APCR-NO 1,10±0,09 idi. Kan gruplarına göre APCR-NO'larında istatistiksel olarak fark yoktu (p=0,225) (Tablo3.5., grafik 3.2.).

Tablo 3.5. Modifiye yöntemde APCR(-) olgularda APCR-NO'larının kan gruplarına göre dağılımı

Kan grupları		**Modifiye yöntem Medyan (±2SD)**	**P**
O	(n=54)	1,11 (0,87-1,37)	
A	(n=57)	1,09 (0,92-1,35)	
B	(n=57)	1,11 (0,87-1,26)	
AB	(n=54)	1,11 (0,87-1,35)	
Toplam	(n=222)	1,10 (0,87-1,37)	0,225



Grafik 3.2. Modifiye yöntemde APCR(-) olgularda APCR-NO'larının kan gruplarına göre dağılımı

3.5. O ve O-dışı kan grubundaki olguların APCR(+)'lik sıklığı

Olguları O ve O-dışı olarak 2 gruba ayırdıktan sonra APCR(+)'liği, standart yöntemde O grubunda %3,5 (n=2), O-dışında %7,8 (n=15) (p=0,374), modifiye yöntemde ise O grubunda %5,3 (n=3), O-dışında %13 (n=25) (p=0,150) olguda saptandı. Sıklık risk oranları her iki yöntemle ayrı ayrı değerlendirildiğinde istatistiksel olarak farklı olmadığı görüldü (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. O ve O-dışı kan grubundaki olgularda APCR (+)'liği sıklık riski

	O grubu	O-dışı (A, B, AB)	p
Standart yöntem (Risk oranları)	0,498 (0,133-1,870)	0,440 (0,147-1,316)	0,261
Modifiye yöntem (Risk oranları)	1,1555 (0,957-1,393)	1,180 (1,017-1,369)	0,106

3.6. O ve O-dışı kan grubundaki olguların APCR-NO'larının karşılaştırılması

O ve O-dışı kan grubundaki 250 olgunun APCR-NO'ları her iki yöntemle ayrı ayrı değerlendirildi. Standart yöntemde medyan APCR-NO, O kan grubunda 1,19±0,20 iken O-dışı grupta 1,09±0,21 bulundu (p=0,01). Modifiye yöntemde ise O grubunda 1,11±0,15 iken O-dışı grupta 1,09±0,20 olarak bulundu (p=0,042) (Tablo3.7). O ve O-dışı kan grubundaki APCR(-) olgularda APCR-NO'ları her iki yöntemle ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise standart yöntemde medyan APCR-NO, O kan grubunda 1,20±0,17 iken O-dışı kan grubunda 1,12±0,16 olup, istatistiksel olarak farklı bulundu (p=0,001). Modifiye yöntemde ise böyle bir fark gözlenmedi (p=0,170) (Tablo 3.8.).

Tablo 3.7. O ve O-dışı kan grubundaki tüm olgularda APCR-NO'larının karşılaştırılması

	O	O-dışı(A,B,AB)	p
Standartyöntem (n=250)	1,19 (0,52-1,57)	1,09 (0,43-1,51)	0,001
Modifiyeyöntem(n=250)	1,11 (0,50-1,37)	1,09 (0,40-1,35)	0,042

Tablo 3.8. O ve O-dışı kan grubundaki APCR(-) olgularda her iki yöntemle APCR-NO'larının karşılaştırılması

	O	O-dışı (A, B, AB)	p
Standart yöntem (n=233)	1,20 (0,81-1,57)	1,12 (0,72-1,51)	0,001
Modifiye yöntem (n=222)	1,11 (0,87-1,37)	1,10 (0,87-1,35)	0,170

Her iki yöntem ile de APCR(-) olarak saptanan olgular (n=221) ayrı bir grup olarak ele alınarak (n=221) ve O ve O-dışı kan grubunun APCR-NO'ları birbiri ile karşılaştırıldı. Standart yöntemde O kan grubundaki olgularda medyan APCR-NO 1,20±0,16 iken diğer kan grubundaki olgularda 1,13±0,14 olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi (p=0,003). Modifiye yöntemde ise O kan grubundaki olgularda medyan APCR-NO 1,11±0,09 iken diğer kan grubundaki olgularda 1,10±0,09 olup, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0,189).

3.7 Standart yöntemle alt sınır değişikliği yapıldığında APCR(+)'lik sıklığı değişimi

Standart yöntemde alt sınır, kit prospektüsünde yöntem için belirlenmiş değer olan 0,69 olarak alındığında saptanan pozitif olgu sayısı 17 iken, çoğu laboratuvarda belirlenmiş değer olan 0,80 olarak alınsaydı pozitif olgu sayısı 26'ya ulaşmaktadır; ancak bu değişiklik istatistiksel olarak anlamı değiştirmemektedir (p=0,186). O grubundaki pozitiflik sayısı aynı kalırken O dışı kan grubundaki pozitiflik sayısı 15'den 24'e çıkmaktadır (Tablo 3.9). Bu durumda O grubunda sıklık %3,5 (n=2) karşın O-dışı grupta %12,5 (n=24) olmaktadır.

3.9. Standart yöntemle alt sınır değişikliğinde APCR(+)'lik sıklığı (0,80)

Kan grubu	**Standart yöntem**	**P**
O (n=57)	2	
A (n=64)	7	
B (n=65)	7	
AB (n=64)	10	
Toplam (n=250)	26	0,186

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tromboz riski ile kan grupları arasında bir bağlantı olduğu yaklaşık 30 yıl önce ileri sürülmüş olmakla birlikte; bunun nedeni konusunda çok az bilgi mevcuttur. ABO kan gruplarıyla trombofilinin en yaygın sebebi olan APCR ilişkisi konusunda da yeterli veri bulunmamaktadır. FV Leiden taşıyıcısı olup trombotik olay geçirenlerde O-dışı kan grubu sıklığı anlamlıca yüksek bulunmuştur. Semptomatik FVL taşıyıcısı olan 147 olgudan, O grubunda 27 (%18) ye karşı O-dışı kan grubunda 120 (%82) olguda tromboz görülmüştür (Robert ve ark., 2000). Çalışmamızda APCR varlığını gösteren oran (APCR-NO) kan gruplarına göre değerlendirildiğinde, O kan grubuna sahip olguların medyan APCR-NO'larının A ve AB grubuna göre farklı olduğu görüldü (p=0,016) (Tablo 3.4, grafik 3.1). Sonuçlarımız olgular O ve O-dışı grup olarak ele alındığında ise, APCR-NO'larının A, B ve AB kan gruplarından oluşan grupta (O-dışı grup), O grubuna oranla daha düşük olduğunu ortaya koymuştur (1,12 ±0,16 vs: 1,20±1,7 p<0,01) (Tablo3.8). Bu sonuçlara standart APCR ölçüm yönteminde ulaşılmıştır. APCR-NO'nun standart yöntemle 0,69'un altında olması rezistansın varlığını gösterdiğinden, bu oran normal sınırlar içinde olmakla birlikte rezistansa yakın olarak değerlendirilebilir. Standart yöntem FV Leiden'e özgün olmaksızın vücutttaki fizyolojik durumu daha iyi yansıtmaktadır. Bu yöntemle protein C antikoagülan yolundaki düzensizlikler ve kazanılmış APC rezistansı olan olgular daha iyi saptanabilmektedir. İlginç olarak, FVL mutasyonu taşıyanlarda O kan grubunun tromboza karşı koruyucu olabileceği ileri sürülmüştür. Venöz trombozlu 178 olguda yapılan çalışmada, FV Leiden taşıyıcısı olan 28 olgudan sadece 1'i O grubunda iken 27'sinin O-dışı grupta (24 A, 1 B, 2 AB) olduğu saptanmıştır (Ordonez ve ark., 1999). FVL taşıyıcılarında, antikoagülan proteinlerdeki defektler ve protrombin G20210A gibi, O-dışı kan gurubunun da ilave bir risk faktörü olduğu ve FV Leiden dışında zayıf bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (Robert ve ark., 2000). Antikoagülan protein eksiklikleri ve protrombin G20210A mutasyonu görülme sıklığı düşük olmasına karşın, beyaz ırkta

FV Leiden ve O-dışı kan grubu birlikteliği sıklıkla görülmektedir. Bu bağlamda FVL taşıyıcılarında ABO kan gruplarının diğer genetik ve çevresel risk faktörleri gibi dikkate alınmasının gerekliliği ileri sürülmüştür (Robert ve ark., 2000). Bizim bu bulgumuz, altta protrombotik bir yatkınlığı olan kişilerde, O kan gurubunun APC rezistansından uzak oluşu kavramı ile uyumludur. Yani O kan grubu, ister tüm olgular birlikte değerlendirilsin (Tablo3.7) isterse eşik değeri olan 0,69'un üstünde olanlar (Tablo3.8) değerlendirilsin, fizyolojik bir avantaj sağlar görünmektedir. Modifiye yöntemde ise kan grupları arasında bir farklılık görülmemiştir (p=0,170). Modifiye yöntem temelde dilüsyon üzerine kurulmuştur. Burada incelenen plazmanın 1:5 oranında sağlam kontrol plazması ile sulandırılması başta FVIII yüksekliği olmak üzere bazı etmenleri gidermektedir. FVIII yüksekliği standart yöntemde yalancı APC rezistansına yol açmaktadır. In vitro koşullarda normal bireylerin FVIII seviyeleri 2,0 IU/ml üzerine çıkarılarak APCR'ye bakıldığında, APCR normalize oranının FVIII seviyesi artışıyla sistematik biçimde düştüğü gözlenmiş ve standart ölçüm yönteminin yüksek FVIII düzeylerinden doğrudan etkilendiği ve zayıf APC yanıta neden olduğu belirtilmiştir (Grafik 3.1.) (Laffan ve Manning, 1996). Standart yöntemle APCR'ye yol açan FVIII'in kan gruplarına göre dağılımı da özellik taşımaktadır. O kan grubundaki bireylerin O-dışı gruptakilere oranla daha düşük FVIII seviyelerine sahip olduğu bilinmektedir (Ordonez ve ark., 1999; O'Donnel ve ark., 2000). O kan grubu 0,75-0,81 IU/ml plazma vWF/FVIII seviyelerine sahipken, O-dışı grupta bu seviye 1,1-1,39 IU/ml olarak saptanmıştır (O'Donnel ve ark., 2000). Çalışmamızda FVIII seviyelerini kontrol etmemiş olmamızla birlikte modifiye yöntemle ortalama APCR-NO'lardaki farkın ortadan kalkması bu faktörlerin (FVIII ve vWF) test üzerindeki etkilerinin azaltılması ile açıklanabilir. Ancak bu durumun in vitro bir fenomen olup, standart yöntemin fizyolojik durumu daha iyi yansıttığını vurgulamak gerekir.

Çalışmamızda APCR(+)'lik sıklığı ise her iki yöntemle O ve O-dışı kan gruplarında değerlendirilmiştir. Her nekadar iki yöntemle de gruplar arasında sıklık bakımından istatistiksel olarak farklılık saptanmamış olsa da, standart yöntemle O grubunda %3,5 (n=2)'a karşı O-dışı olanlarda %7,8 (n=15), modifiye yöntemle ise O grubunda %5,3 (n=3)'e karşı %13 (n=25) olguda pozitiflik saptanmıştır. Burada

çalışma grubunun küçüklüğü sınırlayıcı faktör gibi görünmektedir, ancak APCR(+)'liğinin O-dışı kan grubundaki yüksek sıklığı ilginç bir ipucu taşımaktadır. Standart yöntemde alt sınırın 0,8 kabul edildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Ruzicka ve ark., 1997; Rimmer ve ark., 2000). Bizim çalışmamızda alt sınır 0,8 kabul edildiğinde istatistiksel anlam değişmemekle beraber, O grubundaki APCR(+) olguların sıklığında bir değişiklik meydana gelmezken (n=2, %3,5) O-dışı grupta sıklık artmaktadır (n=24, %12,5) (Tablo3.9).

ProC® Global yönteminin her iki metod için güvenilirliği, prospektüste de belirtildiği gibi her laboratuvarın kendi referans aralığını belirlemesiyle daha da artırılabilir. Standart ve modifiye ölçüm yöntemlerinde normal aralık alt sınırları prospektüste 0,69 ve 0,86 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda bu alt sınırlara göre standart yöntemle %6,8 (n= 17), modifiye yöntemle %11,2 (n= 28) APCR(+)'liği saptanmıştır. ProC® Global yöntemiyle, çalışılan populasyona göre sağlıklı bireylerde APC'ye zayıf cevabın %3,6-16,9 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Toulon ve ark., 2000; Gemmati ve ark., 1998). Modifiye yöntemle pozitif olarak saptanan 12 olgu standart yöntemle negatif olarak saptanmıştır. Bu olguların 6'sı 0,72-0,77 aralığındadır (Tablo3.1). Standart yöntem için pozitiflik alt sınırının 0,8 olarak belirlendiği bir çalışmada düşük yapmış kadınlarda protein C antikoagülan yolundaki defektlerin tam olarak tanımlandığı belirtilmektedir (Sarig ve ark., 2002). Modifiye yöntemle pozitiflik alt sınırına yakın (0,87) olan 3 olgudan 2'si her iki yöntemle negatif bulunurken, 1 olgu standart yöntemle pozitif bulunmuştur. Pozitiflik alt sınırında olan bu olguların gerçek pozitif veya negatif oldukları bilinmemektedir. ProC Global modifiye yöntemle ilgili yapılan çalışmalarda ise alt sınır 0,70 ila 0,80 olarak belirlenmiş ve duyarlılık ve özgünlüğün %100 olduğu saptanmıştır (Toulon ve ark., 2001; Dragoni ve ark., Quincampoix ve ark., 2001). Bu bağlamda APCR(+) ve sınırda olan olguların, altın standart olarak bilinen DNA analizleriyle doğrulanması ve buna göre yeni normal aralıkların belirlenmesi gereklidir.

ProC® Global standart ölçüm yönteminin protein C antikoagülan yolundaki düzensizlikler ve kazanılmış APCR için, modifiye yöntemin ise FV Leiden için

spesifik bir test olarak uygulanması ve yalnızca düşük APC yanıtı gösteren olguların spesifik testlerle irdelenmesi önerilmiştir (Toulon ve ark., 2001; Quincampoix ve ark., 2001). Trombofilik hastalarda standart ve modifiye yöntemi karşılaştıran bir çalışmada ise standart yöntemin kullanımıyla FVL'ye bağlı olmayan APCR(+)'liklerin gözden kaçırılmadığının altı çizilmiştir (Gennari, 2000). Her ne kadar çalışmamızda modifiye yöntemle negatif olup standart yöntemle pozitif saptanan bir olgu olsa da APC'ye zayıf yanıtın tüm nedenlerinin gösterilebilmesi için her iki yöntemin birlikte uygulanması gereklidir.

Çalışmamızda erkek olguların fazla (n= 208/250) olması nedeniyle cinsiyet bakımından APCR-NO'ları karşılaştırılamamıştır. Bu çalışma sağlıklı erkek ağırlıklı APCR(+)'lik sıklığı ve APCR-NO'ları yansıtmaktadır.

Bu çalışma O kan grubunda ortalama APCR-NO'nun rezistansın uzağında olduğunu ve O kan grubunda tromboza karşı avantaj sağlayan durumun bu olabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmada ulaşılan APCR sıklığının kan gruplarına göre dağılımı bulgusu (O kan grubunda istatistiksel anlama ulaşamayan seyrek görülme hali) moleküler yöntemle irdelenmesi gereken yeni bir çalışmaya temelolabilecektir.

ÖZET

Aktive Protein C Rezistansının ABO Kan Gruplarıyla İlişkisi

Bu çalışmanın amacı, sağlıklı kan vericilerinde ABO kan gruplarına göre, APCR tarama testi olarak kullanılan APCR normalize oranının (APCR-NO) ve APCR(+)'liği sıklığının farklı olup olmadığını irdelemektir.

Sebebi tam açıklanamamakla birlikte, O-dışı kan grubuna sahip kişilerin O kan grubuna oranla tromboz riskinin daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür. Kan grupları ile trombofilinin en yaygın sebebi olan aktive protein C rezistansı (APCR) ilişkisi konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. APCR'ye % 95 sebebiyet veren Faktör V Leiden ile kan grupları arasındaki ilişkiyi tanımlayan bir çalışmada, FVL heterozigot bireylerde venöz tromboz sıklığı ve görülme riskinin O-dışı gruplarda O gruplarına göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Çalışmaya Mart-Haziran 2002 tarihlerinde kan merkezine gelen ortalama 33 yaşında (19-63 yıl) 250 gönüllü kan vericisi (208 E/42 K) alındı. Çalışma için lokal etik kurul onayı ve gönüllü olur formu edinildi. Alınan plazma örneklerinde APCR'yi ölçmek için ProC® Global testi (Dade Behring, Marburg, Germany) standart ve modifiye yöntemle (FV yoksun plazma) eş zamanlı çalışıldı. Standart yöntemle 0,69'un, modifiye yöntemle 0,86'nın altı APCR(+)'liği olarak kabul edildi.

Standart yöntemle 17 olguda, modifiye yöntemle 28 olguda APCR(+)'liği saptandı (p=0,03). Her ne kadar O kan grubunda en az AB kan grubunda en fazla APCR(+) olgu izlense de aradaki farklar anlamlı değildi. APCR (-) olgularda, standart yöntemle O grubunda ortalama APCR-NO en yüksek izlendi (p=0,016). Modifiye yöntemle ise kan gruplarına göre ortalama APCR-NO'larında fark yoktu. Olgular O ve O-dışı kan grubu olarak ele alındığında, APCR(+)'lik sıklığı standart yöntemde O grubunda 2(%3,5), O-dışında 15(%7,8) (p=0,344), modifiye yöntemde ise O grubunda 3(%5,3), O-dışında 25(%13) olguda saptandı. APCR(-) olguların APCR-NO'ları değerlendirildiğinde, standart yöntemde O grubunda O-dışı kan gruplarına göre istatistiksel olarak fark saptanırken (p=0,001), modifiye yöntemde bu fark görülmedi.

Standart yöntem FV Leiden'e (FVL) özgün olmaksızın vücuttaki fizyolojik durumu daha iyi yansıtmaktadır. Standart yöntemle O kan grubunda APCR-NO, O-dışı kan gruplarına göre rezistansın uzağında bulunmuştur. FVL için daha özgün ve duyarlı olan modifiye yöntemle APCR-NO'ları kan grupları arasında (O ve O-dışı gruplar arası bakılsa da) farklılık göstermemektedir. Bu durum O-dışı kan gruplarında FVIII düzeyinin daha yüksek olması ve modifiye yöntemde dilüsyonun bu dezavantajı gidermesiyle açıklanabilir. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, modifiye yöntemde APCR(+) olgu sıklığı, O grubunda O-dışı gruba oranla daha az bulunmuştur. Burada çalışma grubunun küçüklüğü sınırlayıcı faktör gibi görünmektedir.

Bu çalışma O kan grubunun fizyolojik olarak aktive protein C rezistansından uzak olduğunu gösterirken, O kan grubunda APCR(+)'liğinin daha seyrek olabileceği kuşkusunu doğurmaktadır.

Anahtar Sözcükler : ABO kan grupları, Aktive protein C rezistansı, aktive protein C rezistansı normalize oranı, Faktör V Leiden, ProC Global, standart ve modifiye yöntem.

SUMMARY

The Relation of Activated Protein C Resistance with ABO Blood Types

The aim of this study is to investigate the relationship between APCR normalized ratios and ABO blood groups.

Althogh the reason is not well known, it is expected that, the individuals with blood group O have lower risk of thrombosis than with individuals with blood group non-O. There is not sufficient documents related to the relation between the blood groups and the most frequent cause of thrombophilia, APCR. In a study explaining the relation between blood groups and factor V Leiden which is the major cause of APCR, it was reported that, in FVL heterozygot individuals the prevalance of venous thrombosis and risk was higher in individuals with blood group non-O compared to individuals with blood group O.

We have studied plasma samples of 250 blood donor volunteers (208 M/42 F) with median age 33 (19-63 years) in blood center between March-June 2002. The study was started after the approval of local ethical committee confirmation and only volunteers who gave written informed consent were excepted for the study. APCR, detected by ProC® Global kit (Dade Behring, Marburg, Germany) was performed simultaniously with the standart and the modified (FV depted plasma) assays. The cut-off values for the standart assay and the modified assay were 0,69 and 0,86 and the values below these ratios were accepted as APCR(+).

Seventeen pozitivities with the standart assay and 28 pozitivities with the modified assay were detected (p=0,03). Despite the APCR(+) subjects beeing the most in blood group AB and the least in group O, there was no difference betweeen the groups. With the standart assay the median APCR-NR was the highest in blood group O in APCR(-) subjects (p=0,016). There was no significant difference between the blood groups and the APCR-NR in the modified assay. When the subjects were divided into two groups as O and non-O, in the standart assay APCR pozitivity was %3,5(n=2) in group O, %7,8(n=15) in non-O (p=0,344), and in the modified assay %5,3(n=3) in group O, %13(n=25) in group non-O. When the APCR-NR's were evaluated in APCR(-) subjects, there was a significant difference in blood group O compared to blood group non-O with the standart assay (p=0,001), but no significant difference with the modified assay.

Standart assay not being spesific for FV Leiden represents the *in vivo* physiological conditions better. With the satandart assay, there was a negative relation between APCR-NR's and blood group O. APCR-NR's were not different between the blood groups (even divided in two groups as O and non-O) with the modified assay known as the most spesific and sensitive assay for FVL. This situation may be explained by the high levels of FVIII in blood group non-O. The dilution made in the modified assay may have normalised this disadvantage. Even though it was not statistically different, the prevalance of APCR positivity was

lower in blood group O compared to blood group non-O. The small number of subjects studied seems to be the limiting factor.

This study suggests that, blood group O is physiologically away from activated protein C resistance and the APCR pozitivity may be low in blood group O.

Key Words : ABO blood groups, Activated protein C resistance, activated protein C resistance normalized ratio, Factor V Leiden, ProC Global, standart and modified assays.

KAYNAKLAR

AKAR, N., AKAR, E., DALGİN, G., SOZUOZ, A., OMURLU, K., CIN, S. (1997). Frequency of Factor V (1691 G --> A) mutation in Turkish population. *Thromb Haemost.* **78(6):**1527-8.

BERNARDI, F., FAIONI, EM., CASTOLDI, E., LUNGHI, B., CASTAMAN, G., SACCHI, E., MANNUCCI, PM. (1997). A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood.* **90(4):** 1552-1557

BERTINA, RM., REITSMA, PH., ROSENDAAL, FR., VANDERBROUCKE, JP. (1995). Resistance to activated protein C and factor V Leiden as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* **74(1):** 449-453

BLOEMENKAMP, KWM., HELMERHORST, FM., ROSENDAAL, FR.,VANDERBROUCKE, JP. (1999). Venous thrombosis, oral contraseptives and high factor VIII levels. *ThromB Haemost.* **82:** 1024-7

CARVALHO, ACA. (2000). Hemostasis and Thrombosis.*Lippicott-Raven Publisher.*Chapter 6.

CHAN, WP., LEE, CK., KWONG, YL., LAM, CK., LIANG, RA. (1998). A novel mutation of Arg306 of Factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood.* **91:** 1135-1139.

CHITOLIE, A., LAWRIE, AS., MACKIE, IJ., HARRISON, P., MACHIN, J. (2001). The impact of oral anticoagulation therapy, factor VIII level and quality of factor V-deficient plasma on three commercial methods for activated protein C resistance. *Blood Coagulation & Fibrinolysis.* **12:**179-186

CHROBAK, L., DULICEK, P. (1996). Resistance to activated protein C as pathogenic factor of Venous Thromboembolism. *ACTA MEDICA.* **39:** 55-62

CLARK, P., WALKER, ID. (2001a). The phenomenon known as acquired activated protein C resistance. *British Journal of Haematology.* **115:** 767-773

CLARK, P., SATTAR, N., WALKER, ID., GREER, IA. (2001b). The Glasgow outcome, APCR and Lipid (GOAL) pregnancy study: Significance of pregnancy associated activated protein C resistance. *Thromb Haemost.* **85:** 30-35

CURVERS, J., CHRISTELLA, M., THOMASSEN, LGD., RIMMER, J., HAMULYAK, K., VAN DER MEER, J., TANS, G., PRESTON, E., ROSING, J. FR., TANS, G., ROSING, J. (2002). Effcets of hereditary and acquired risk factors of venous thrombosis on a thrombin generation-based APC resistance test. *Thromb Haemost.* **88:** 5-11

De VISSER , MCH., ROSENDAAL, FR., BERTINA, RM. (1999). A reduced sensitivity for activated protein C resistance in the absence of Factor V Leiden increases the risk of Venous Thrombosis. *Blood.* **93(4):** 1271-1276

DRAGONI, F., TORMENE, D., SIMIONI, P., ARCIERI, P., AVVISATI, G., GIROLAMI, A. (2001). ProC Global: A new automated screening assay for the evaluation of total function of the protein C system. *Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis.* **7(4):** 351-355.

ELISABETH, M., COTT, V., LAPOSATA, M. (1998). Laboratory Evaluation of hypercoagulable states. *Hematology/Oncology Clinics of North America, Coagulation Disorders.* NEUFELD, E. J. Volume 12, No 6

ESMON, CT. (2001). Role of Coagulation Inhibitors in Inflammation. *Thromb Haemost.* **86:** 51-6

FOLSOM, AR., CUSHMAN, M., TSAI, MY., ALEKSIC, N., HECKBERT, SR., BOLAND, LL., TSAI, AW, YANEZ, D., ROSAMOND, WDA (2002). Prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors. *BLOOD.* **299:** 2720-2725

FRANCO, RF., ELION, J., TAVELLE, MH., SANTOS, SEB., ZAGO, MA. (1999). The prevalence of Factor V Arg^{306} - Thr (Factor V Cambridge) and Factor V Arg^{306} - Gly mutations in different human populations. *Thromb Haemost.* **81:** 312-313

GARDINER, C., COOPER, PC., MAKRIS, IJ., MALIA, RG., MACHIN, SJ. (2001). An evaluation of screening tests for defects in the protein C pathway: commercial kits lacks sensitivity and specificity. *Blood Coagulation & Fibrinolysis.* **13(2):** 155-163

GENNARI, L., BLANCO, AN., BERMEJO, E., SALVIU, J., GROSSO, S., LAZZARI, MA. (2000). Activated protein C (APC) resistance: Considerations abaut the importance of using the

original and modified methods in thrombophilic disease. *Thromb Haemost.* **84:** 138-9

GRIFFIN, JH. (2001). Control of coagulation reactions. *Williams Hematology 6th edition.* Chapter 113.

HEIT, JA. (2000). Familial Thrombophilia Diagnostic Testing and Management. *Bleeding and thrombosing diseases:The basics and beyond. Course Syllabus Mayo Clinic.*

HOOPER, WC., EVATT, BL. (1998). The role of activated protein C Resistance in the pathogenesis of Venous Thrombosis. *Am J Med. Sci.* **316(2):** 120-128

KRAAIJENHAGEN, RA., ANKER, PS., KOOPMAN, MMW., REITSMA, PH., PRINS, MH., ENDE, AVD., BULLER, H. (2000). High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* **83:** 5-9

KOSTER, T., BLANN, AD.,BRIET, E., VANDERBROUCKE, JP., ROSENDAAL, FR. (1995). Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet.* **21;**345(8943):152-5.

KÜÇÜKKAYA, R. (1999). Trombofilide tanı yöntemleri. *Hematoloji IV. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu.* Hemostaz ve Tromboz Hemofili Alt Çalışmaları Grupları Uygulama Rehberleri

LAFFAN, MA., MANNING, R. (1996). The influence of factor VIII on measurement of activated protein C resistance. *Blood Coagulation & Fibrinoylsis.* **7:** 761-765

LUDDINGTON, R., JACKSON, A., PANNERSELVAM, S., BROWN, K. (2000). The Factor V R2 allele: Risk of venous thromboembolism, Factor V levels and resisitance to activated protein C. *Thromb Haemost.* **83:** 204-8

QUINCAMPOIX, JC., LEGARFF, M., RITTLING, C., ANDIVA, S., TOULON, P. (2001). Modification of the ProC® Global assay using dilution of patient plasma in factor V- depleted plasma as a screening assay for factor V Leiden mutation. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.* **12:** 569-576

O'DONNELL, J., MUMFORD, AD.,MANNING, RA., LAFFAN, M. (2000). Elevation of FVIII:C in Venous thromboembolism is persistent and independent of the acute phase response. *Thromb Haemost.* **83:** 10-3

ORDONEZ, G. AJ., RODRIGUEZ, M. JM., MARTIN, L., ALVAREZ, V., COTO, E. (1999). The O blood group protects against venous thromboembolism in individuals with the factor V Leiden but not the prothrombin (factor II G20210A) mutation. *Blood Coagulation&* Fibrinolysis Jul;**10(5):**303-7

ÖZCAN, M. (2002). Hemostaz genel bakış, antikoagülan ve antitrombotik tedavi. Antıp A.Ş. Yayınları. *Kardiyoloji.* Candan, İ., Oral, D. Bölüm: 3.

ÖZSAN, H. (2000). Tromboza eğilim ve Hematolojik tanı Yöntemleri. **s.:** 61-68. *Hematoloji 1.Basamak Kursu Eğitim Kitabı.* TANGÜN, Y.

RIMMER, JE., COOPER, PC., BROOKFIELD, CJ., PRESTON, FE., MAKRIS, M. (2000). Evaluation of a global screening assay for the investigation of the protein C anticoagulant pathway. *Clin. Lab. Haem.* 22: 351-354

ROBERT, A., AILLAUD, MF., ESCHWEGE, V., RANDRIANJOHANY, A., SCARABIN, Y., VAGUE-JUHAN, I. (2000). ABO Blood Group and Risk of Venous Thrombosis in Heterozygous Carriers of Factor V Leiden .*Thromb Haemost.* **83:** 630-1

ROSEN, S., BERGAMASCHİ, G. (2001). Protein S. *Chromogenix monograph series*

ROSENDAAL, FR, KOSTER, T., VANDERBROUCKE, JP., REITSMA, PH. (1995). High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood.* **85:**1504-8

RUSICKA, K., KAPIOTIS, S., QUEHENBERGER, P., HANDLER, S., PABINBER-FASCHING, I., MANNHALTER, C., JILMA, B., SPEISER, W. (1997). Evaluation of new screening assay ProC global for identification of defects in the protein C/ protein S anticoagulant pathway. *Thrombosis Research.* **87(6):** 501-510

SARIG, G., LANIR, N., HOFFMAN, R., BRENNER, B. (2002). Protein C Global assay in the evaluation of women with idiopatic pregnancy loss. *Thromb Haemost.* **88:** 32-36

SIMMONDS, RE., LANE, DA. (2001). The endothelial cell protein C receptor: A candidate genetic risk factor for thrombosis. *Thromb Haemost.* **86:** 939-41

TOSETTO, A., CASTAMAN, G., CAPPELLARI, A., RODEGHIERO, F. (2000). The VITA project: Heritability of Resistance to activated protein C. *Thromb Haemost.* **84:** 811-814

TOULON, P., RAPHAEL, A., PEREZ, P. (2001). Sensitivity of the ProC® Global assay for protein C pathway abnormalities.Clinical experience in 899 unselected patients with Venous Thromboembolism. *Thrombosis Research.* **104:** 93-103

TRIPODI, A., CHANTARANGKUL, V., MANNUCCI, PM. (2000). Hyperprotrombinemia may result in acquired activated protein C resistance. *BLOOD.* **96(9)**: 3295-3296

TRIPODI, A., MANNUCCI, PM. (2001). Laboratory investigation of thrombophilia. *Clinical Chemistry.* **47(9):** 1597-1606

Van der MEER, FJM., KOSTER, T., VANDERBROUCKE, JP., BRIET, E., ROSENDAAL, FR. (1997). The Leiden thrombophilia study (LETS). Thr*omb Haemost.* **78(1):** 631-635

WAUTRECHT, JC., GALLE, C., MOTTE, S., DEREUME, JP., DRAMAIX, M. (1998). The role of ABO blood groups in the incidence of Deep Vein Thrombosis. *Thromb Haemost.* **79:** 688-9

WILLIAMSON, D., BROWN, K., LUDDINGTON, R., BAGLIN, C., BAGLIN, T. (1998). Factor V Cambridge: A new mutation (Arg306-To-Thr) asociated with resistance to activated protein C. *Blood.* **91:** 1140-1144

www.ncbi.nlm.nih.gov/ genbank . FV 10, ekson gen dizisi

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ