

Periferik Arter Hastalığı Olan Erkek Hastalarda

Trombofilik Mutasyonların Yaygınlığı

Prevalence of Thrombophilic Mutations in Male Patients With Peripheral Arterial Disease

Meral Ekim¹ ve Hasan Ekim^{2*}

¹Bozok Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü Başkanı, Yozgat

²Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Yozgat

ÖZET

Amaç: Faktör V Leiden (FVL), protrombin gen (PT G20210A) ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T polimorfizmleri venöz tromboz gelişmesinde risk faktörleri olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, bu polimorfizmlerin periferik arter hastalığı (PAH) ile olan ilişkileri henüz tartışmalı olup, sadece PT G20210A polimorfizminin PAH için bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızın amacı PAH olan erkek hastalarda bu polimorfizmlerin sıklıklarını araştırmaktır.

Yöntem ve Gereçler: Çalışmamıza PAH olan 30 erkek hasta kabul edildi. Hastalarda tanı fizik muayene ve arteriyel Doppler ultrasonografik incelemeyle kondu. Tüm hastalarda FVL, PT G20210A ve MTHFR (C677T, A1298C) polimorfizmleri araştırıldı. Polimorfizmleri tanımlamak için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi kullanıldı.

Bulgular: Hastalarımızın yaşları ise 36-87 arasında değişmekte ve ortalama yaş ise 65.2 ± 11.2 yıl idi. Homozigot FVL ve homozigot PT G20210A mutasyonları da hiçbir hastamızda tespit edilmedi. Heterozigot FVL polimorfizmi 4 olguda (%13.3), heterozigot PT G20210A polimorfizmi ise 5 olguda (%16.6) gözlemlendi. Homozigot ve heterozigot MTHFR C677T polimorfizmleri ise sırayla 5 (%16.6) ve 15 (%50) olguda tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamız özellikle sigara içenlerde PT G20210A alelinin PAH için trombotik bir risk faktörü olarak göz önüne alınması gerektiği görüşünü desteklemektedir. Ancak, bulgularımız geniş kapsamlı çalışmalarla desteklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Periferik arter hastalığı, trombofili, FVL, PT G20210A, MTHFR

ABSTRACT

Objective: Factor V Leiden (FVL), Prothrombin gene (PT G20210A) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms have been known as thrombophilic risk factors for the development of venous thrombosis. However, the association between these polymorphisms and peripheral arterial disease (PAD) has been yet controversial and only PT G20210A polymorphism has been suggested as a risk factor for PAD. This study was aimed to investigate the distribution frequencies of these polymorphisms in male patients with PAD.

Material and Methods: A total of 30 male patients with PAD were included in the study. Patients were diagnosed by means of physical examination and Doppler ultrasonography. The mutations including FVL, PT G20210A and MTHFR (C677T, A1298C) were investigated in all patients. Polymerase chain reaction (PCR) and the amplification refractory mutation system were used to identify the polymorphisms in the blood of the patients

Results: The ages of the patients ranged from 36 to 87 years and the mean age was 65.2 ± 11.2 years. There were no homozygous carriers for either FVL or PT G20210A polymorphisms. The heterozygous FVL and heterozygous PT G20210 polymorphisms were observed in 4(13.3%) and 5(16.6%) patients, respectively. The homozygous and heterozygous MTHFR C677T polymorphisms were found in 5 (16.6%) and 15 (50%) patients, respectively.

Conclusion: Our study supported the opinion that PT G20210A allele should be taken into account as a thrombotic risk factor for PAD, especially in smokers. However, our findings should be supported by detailed studies.

Key Words: Peripheral artery disease, thrombophilia, FVL, PT G2010A, MTHFR

Giriş

Aterosklerotik damar hastalığı genetik ve edinilmiş çevresel risk faktörlerinin rol oynadığı multi-

faktörel bir klinik antite olup, koroner, serebral ve periferik damar yataklarını tutabilir (1). Periferik damar yatağının tutulmasıyla oluşan periferik arter hastalığı (PAH) alt ekstremitte arterlerinde

Bu çalışma Bozok Üniversitesi Proje Koordinasyon Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından desteklenmiştir
(Proje Kod no: 6602c-TF/16-23).

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Hasan Ekim, Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Adnan Menderes Bulvarı, Adliye karşısı, Yozgat/Türkiye Tel: 0 (535) 417 65 39, E-mail: drhasanekim@yahoo.com

Geliş Tarihi: 28.11.2016, Kabul Tarihi: 10.06.2017

ateroskleroz nedeniyle oluşan ilerleyici tıkalı bir hastalık olup, genellikle inflamasyon ve hiperkoagülabilité ile ilişkilidir. Hastalığın ilerlemesiyle intermitant kladikasyon, istirahat ağrısı ve ülserasyon gibi klinik bulgular gelişebilir. Toplumda sıklığı %12-14 arasında değişen PAH, çoğu kez sonunda kardiyovasküler ya da serebrovasküler bir olay nedeniyle ölüme yol açtığından önemli bir hastalık grubudur (2).

Koroner arter hastalığı gelişmesinde risk faktörleri olan sigara kullanımı ve diyabet PAH gelişmesinde de majör risk faktörleridir. Diğer ortak risk faktörleri hipertansiyon ve dislipidemidir (3). İleri yaş, erkek cinsiyet, geçirilmiş miyokart enfarktüsü, inme hikayesi ve geçici iskemik atak da PAH gelişmesinde risk faktörleri olarak kabul edilmektedir (4). Ayrıca, aterosklerotik lezyonlarla birlikte koagülasyon proteinlerini kodlayan genlerin polimorfizmlerinin de geleneksel kardiyovasküler risk faktörleriyle etkileşime girerek semptomatik PAH gelişmesine katkıda bulunabilir (3).

Arteriyel tromboz gelişmesinde endovasküler hasar ve hemostatik dengedeki değişiklikler önemli rol oynar. Endotelial hücre hasarı ile proinflamatuvar mediyatörlerin katkısı arteriyel tromboz sürecini uyarır (5). Bu çok sıklıkla aterosklerotik hastalığın sonucuysa da, trombofilik polimorfizmler nedeniyle koagülasyon proteinlerinin aktivasyonundaki değişiklikler de PAH'nın ilerlemesini yol açan trombüs oluşumunun etkinliğini modifiye eder (5).

Önceleri, FVL, PT G20210A ve MTHFR C677T polimorfizmleri venöz tromboembolizm (VTE) için risk faktörleri olarak kabul edilmekteydi. Ancak, son zamanlarda MTHFR polimorfizmlerinin VTE ile ilişkisi olmadığı gösterildiğinden, sadece FVL ve PT G20210A polimorfizmleri VTE için risk faktörü olarak kabul edilmektedir (6). Bu polimorfizmlerin arteriyel trombotik hastalıklarda ve aterosklerozda rolleri ise tartışmalıdır (5,7). Çalışmamızın amacı PAH olan erkek hastalarda bu mutasyonların sıklığını tespit etmektir.

Gereç ve Yöntem

Şubat 2016 ile Ekim 2016 tarihleri arasında hastanemize başvuran ve PAH tanısı konulan 30 erkek hasta çalışma kapsamına alındı. Hastanemize başvurduklarında, Fontaine sınıflandırmasına göre hastalardan 22'si evre 2, geri kalanı ise evre 3'de idi. Çalışmamız Helsinki deklarasyonu ile uyumlu olan Üniversitemizin Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onaylamasıyla ve katılanların onamı

alınarak yapılmıştır. Tüm hastalarda tanı fizik muayene ve arteriyel Doppler ultrasonografik incelemeyle kondu.

Kan numuneleri tanı veya preoperatif tetkikler için alınan venöz kanlardan alındı ve içinde etilendiamintetraasetik asit (EDTA) bulunan tüplere kondu. Numunelerden DNA izolasyonları QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc. Germany) kullanılarak yapıldı ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yapıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi. Polimorfizmlerin taranmasında SNaPshot® multiplex system (Applied Biosystems Inc. Switzerland) kullanıldı. Bu amaçla her 3 polimorfizm için 3 primer dizayn edildi (PCR için 2 ve SNaPshot® reaksiyonu için 1). PCR'lar %2 agarose gel electrophoresis kullanılarak kontrol edildi. Bir numune için 3 reaksiyon NucleoFast® 96 PCR kit (MACHEREY-NAGEL GmbH) kullanılarak kombine ve purifiye edildi.

SNaPshot® reaksiyonları: Purifiye PCR'lar SNaPshot® ile üretici firmanın direktifleri doğrultusunda uygulandı. SNaPshot® reaksiyonlarının kapiller elektroforezi de ABI 3130 capillary electrophoresis instrument (Applied Biosystems Inc. Switzerland) kullanılarak yine üretici firmanın direktifleri doğrultusunda uygulandı. Polimorfizmleri Genotipleme GeneMapper 4.0 yazılımı (Applied Biosystems A.Ş. İsviçre) üzerinden kapiller elektroforez sırasında electrophoregramlar analiz edilerek elde edildi.

Bulgular ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. Mutasyonların sıklığı yüzde olarak gösterildi.

Bulgular

Hastalarımızın, yaşları ise 36-87 arasında değişmekteydi ve ortalama yaş ise 65.2±11.2 yıl idi. Hastalarımızın 24'ü (%80) sigara kullanmaktaydı. Ayrıca, 7 (%23.3) hastada eşlik eden koroner arter hastalığı, 18 (%60) hastada hipertansiyon ve 5 (%16.6) hastada diyabet mevcuttu. Fontaine sınıflandırmasıyla polimorfizmler arasında bir ilişki tespit edilemedi.

Homozigot FVL ve homozigot PT G20210A mutasyonları hiçbir hastamızda tespit edilmedi. Heterozigot FVL mutasyonu 4 olguda (%13.3), heterozigot PT G20210A mutasyonu 5 olguda (%16.6), homozigot MTHFR C677T Mutasyonu 5 (%16.6) olguda, heterozigot MTHFR C677T mutasyonu 15 (%50) olguda, homozigot MTHFR C1298C mutasyonu 2 (%6.6) olguda, heterozigot MTHFR C1298C mutasyonu ise 11 (%36.6) olguda tespit edildi (Tablo 1).

Heterozigot PT G20210A mutasyonu olan 5 olgunun hepsinde de eşlik eden mutasyonlar vardı (Tablo 2). Heterozigot FVL polimorfizmi taşıyan 4 olgunun 2'sinde eşlik eden heterozigot PT G20210A polimorfizmi de vardı (Tablo 3). FVL ve PT G20210A mutasyonu taşıyan tüm hastalar hipertansif idi ve sigara kullanıyorlardı. PT G20210A mutasyonu olan bir hastada eşlik eden koroner arter hastalığı da mevcuttu.

MTHFR C677T mutasyonu 20 (%66.6) olguda tespit edilmiş olup, 15 olgu heterozigot ve 5 olgu homozigottu. MTHFR A1298C mutasyonu olan 13 (%43.3) olgunun 2'si homozigot diğerleri heterozigot idi. Kombine heterozigot MTHFR C677T/A1298C mutasyonları 3 (%10) olguda mevcuttu. Bu kombinasyonu taşıyan olguların hiçbirinde eşlik eden başka mutasyonlar yoktu. Ayrıca, bir (%3.3) olgumuzda taranan mutasyonların hiçbirisi tespit edilmedi.

Tartışma

Aterosklerozun gelişmesinde ve oluşmasında inflamasyonun da önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. Bu inflamasyondan çeşitli büyüme

faktörleri, sitokinler, adezyon molekülleri sorumludur (2). Serbest oksijen radikalleri vasküler duvara toksik etki göstererek aterosklerozu arttırdıkları gibi eritrosit membran geçirgenliğindeki değişiklikler nedeniyle hemolize de neden olurlar ve sonuçta hipoksik bölgeye oksijen taşıma yeteneği azalır. Oluşan hemoliz nedeniyle de tıkanıklığın distalindeki hipoksi daha da artarak dokuların beslenmesi bozulur (8). Asemptomatik bile olsa PAH olanlarda miyokart enfarktüsü ve inme riski artmıştır ve 10 yıl içinde ölüm oranı PAH olanlarda 6 kat daha fazladır (4,9). Bu nedenle genetik ve çevresel risk faktörlerinin bilinmesi önemlidir.

PT G20210 polimorfizmi hiperprotrombinemi ve artmış trombin oluşumuyla ilişkili olduğundan, venöz ve arteriyel trombozda genetik varyasyonların araştırılması önemlidir (1). Trombin sadece fibrin oluşumunda ve platelet agregasyonunda rol oynamaz; aynı zamanda endotelial aktivasyonda da rol oynar. Ayrıca, proteaz ile aktive olan reseptörlerin aktivasyonu yoluyla trombosit ve lökosit takviyesinde de rolü vardır (3). Heterozigot PT G20210A mutasyonu taşıyanlarda dolaşımdaki protrombin seviyeleri

Tablo 1. Tespit edilen mutasyonların olgulara göre dağılımı ve yüzdeleri

Polimorfizmler	Olgu sayısı	Yüzde
Protrombin gen mutasyonu (PT G20210A)	5	%16.6
Faktör V Leiden (FVL)	4	%13.3
Homozigot Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T	5	%16.6
Heterozigot MTHFR C677T	15	%50
Homozigot MTHFR A1296 C	2	%6.6
Heterozigot MTHFR A1298C	11	%36.6
Hiç mutasyon tespit edilmeyenler	1	%3.3

Tablo 2. Heterozigot PT G20210 mutasyonu tespit edilen hastalarda eşlik eden diğer mutasyonlar

Yaş	PT G20210A	FVL	MTHFR C677T	MTHFR A1298C
81	HET	WT	HET	WT
77	HET	WT	HOM	WT
82	HET	WT	HET	WT
87	HET	HET	WT	HOM
70	HET	HET	HET	WT

Tablo 3. Heterozigot FVL mutasyonu tespit edilen hastalarda eşlik eden diğer mutasyonlar.

Yaş	FVL	PT G20210A	MTHFR C677T	MTHFR A1298C
58	HET	WT	WT	HET
87	HET	HET	WT	HOM
70	HET	HET	HET	WT
70	HET	WT	HOM	WT

%25 artar. Protrombin genindeki bu mutasyon nedeniyle trombin üretiminin artması ve koagülasyonu aktive etmesi protrombotik bir duruma yol açar (1). Dolayısıyla, PT G20210A polimorfizmi ateroskleroz gelişmiş kişilerde daha fazla lokal protrombin oluşumuna sebep olarak aterosklerozun ilerlemesine de katkıda bulunabilir (10).

PT G20210A polimorfizmi erkeklerde karotis ve femoral arterlerde aterosklerozun ilerlemesiyle de ilişkili bulunmuştur (10). Bazı araştırmacılar tarafından PT G20210A polimorfizminin özellikle sigara içenlerde PAH riskini bariz arttırdığı bildirilmiştir (3). Yine İtalya'da yapılan bir çalışmada bu mutasyon PAH olanlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak fazla bulunmuştur (11). Ayrıca, PT G20210A polimorfizminin PAH olanlarda kritik iskemi riskini arttırdığı bildirilmiştir (5).

Trombin ya prokoagülan özellikleri nedeniyle ya da vasküler hasar olan yerlerde düz kas hücrelerinin proliferasyonunu başlatarak veya inflamatuvar süreçleri regüle ederek arteriyel duvar kalınlaşmasında önemli bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (10). Nitekim aterosklerozun klinik belirtileri ortaya çıkan ve PT G20210A polimorfizmi taşıyanlarda karotis ve femoral arterlerde intima-media kalınlığının arttığı dikkati çekmiştir (10). Trombinin koagülasyon veya düz kas hücrelerinin proliferasyonu veya inflamatuvar süreçlerin üzerine etkileriyle arter duvarı kalınlaşmasındaki rolü belirlenmiştir (3). Erkek hastalarda karotis ve femoral arter intimasının kalınlaşmasında PT G20210A polimorfizminin rolü olduğu gösterilmiştir (3).

PT G20210 polimorfizmi insidansı Avrupa'nın güneyinde %3 oranında tespit edilmiş olup, Avrupa'nın kuzeyinden 2 misli fazladır (12). PT G20210 polimorfizmi ülkemizde yapılan bir araştırmada DVT'li hastalarda %6.5 oranındayken sağlıklı gönüllülerde %1.2 oranında görülmüştür (13). Daha önce yaptığımız bir çalışmamızda sağlıklı bireylerde PT G20210 polimorfizminin sıklığını %5.5 bulmuştuk (14). PT G20210 polimorfizmi sağlıklı Filistin toplumunda %9.3 oranında rastlanmış olup (15), diğer ülkelerden bildirilenlerden fazladır (16). Serimizdeyse PT G20210A sıklığı %16.6 olup, PT G20210 polimorfizminin periferik arter hastalıklarında rolünün olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Faktör V'in (FV) aktive protein C (APC) tarafından bölünen kısmında bulunan (506. Amino asit) arjininin yerine glutaminin geçmesiyle oluşan genotipe FVL denir. Bu yer değiştirme nedeniyle antikoagülan sistemde protrombotik faktörleri

(FVa ve FVIIIa) bölen ve inaktive eden anahtar bir komponent olan APC'ye karşı direnç geliştirdiğinden FVL polimorfizmi tromboza eğilim oluşturur (17).

Sağlıklı Türk toplumunda FVL mutasyonunun %7.1 ile %9.1 arasında değiştiği bildirilmiştir (18). Yine ülkemizde 26 merkezin verilerine göre yapılan bir meta-analizde de sağlıklı Türk toplumunda ortalama FVL sıklığı %7.9 bulunmuştur. Kıbrıs Türklerindeyse %12.2 oranındadır (19). Sağlıklı batı toplumundaysa FVL prevalansı %1-15 arasında değişmektedir (20). Hastalarımızda FVL mutasyonu %13.3 olup, sağlıklı Türk ve batı toplumundaki değerlere yakındır ve bu polimorfizm ile PAH arasında bir ilişki olmadığı görüşünü desteklemektedir. Nitekim, FVL polimorfizminin arteriyel trombozda ve onun miyokart enfarktüsü gibi komplikasyonunda önemli rol oynarsa da, PAH olanlarda yüksek dağılım göstermediği bildirilmiştir (21). Serimizde FVL ve PT G20210A mutasyonu taşıyan tüm hastalar sigara kullanmaktaydı. Ayrıca, PT G20210A mutasyonu sıklığı (%16.6) oldukça yüksek oranda tespit edildiğinden PAH için bir risk olan sigara kullanımının bu mutasyonu taşıyanlarda PAH riskini daha da arttırması muhtemeldir.

Klinik çalışmalarda prematüre PAH olanların %28-30'unda hiperhomosisteinemi tespit edilmiştir (22). Bu yüzden bu hastalığın gelişmesinde hiperhomosisteinemi bağımsız bir risk faktörü olarak gözükmektedir. Homosisteinemi seviyesinin yükselmesine homosistein metabolizmasındaki enzimlerin genetik defektleri de rol oynayabilir. İster homozigot ister heterozigot olsun MTHFR A1298C polimorfizminin enzim fonksiyonlarında daha az azalmaya neden olduğundan hiperhomosisteinemi ile ilişkili olmadığı (23), homozigot MTHFR C677T polimorfizminin ise ancak eşlik eden folat, B12 vitamini ve B6 vitamini gibi kofaktörlerin yetersizliğinde hiperhomosisteinemi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (4).

FVL ve MTHFR mutasyonlarının birlikte olmasının özellikle de kadınlarda periferik arteriyel tromboz için önemli bir risk faktörü olabileceği bildirilmiş olup, bu mutasyonları taşıyanlarda antitrombotik tedavinin rekürrens ataklarını önleyeceği veya azaltacağı bildirilmiştir (24). Serimizde FVL mutasyonu taşıyan tüm olgularda eşlik eden MTHFR mutasyonları vardı. Çalışmamız erkekler içinde aynı durumun geçerli olduğu görüşünü desteklemektedir.

MTHFR C677T polimorfizmi sağlıklı batı toplumunda sık olup heterozigot MTHFR C677T polimorfizmi %40-50, homozigot polimorfizm ise %10-15 oranında görülmektedir. Bizim daha önce yaptığımız bir çalışmamızda ise sağlıklı Türk toplumunda homozigot ve heterozigot MTHFR C677T mutasyonları sırayla %8.8 ve %33.3 oranlarında tespit edilmiş idi (14). Kafkas ırkında homozigot MTHFR C677T mutasyonunun sıklığı %5-% 20 arasında değişmektedir (25). Dokuz ayrı çalışmayı kapsayan bir meta-analizde MTHFR C677T alelinin artmış PAH riskiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (26). Aksine, başka bir çalışmada MTHFR C677T polimorfizminin PAH için bir risk faktörü olmadığı bildirilmiştir (11). Çalışmamızda ise homozigot MTHFR C677T polimorfizmi %16.6, heterozigot MTHFR C677T polimorfizmiyse %50 oranında tespit edilmiş olup, sağlıklı Kafkas ırkında görülen değerlere benzemektedir. Bu da MTHFR C677T polimorfizminin PAH ile ilişkisinin olmadığını görüşünü desteklemektedir.

LIPAD çalışmasının sonuçlarına göre PAH ile FVL, PT G20210A ve MTHFR C677T polimorfizimleri arasında bir ilişki bulunamamıştır (4). Sofi ve ark. (11) ise sadece PT G20210 polimorfizminin PAH için orta derecede bir risk faktörü olabileceğini bildirdi. PAH ilerlemesinde en kritik risk faktörü sigara alışkanlığıdır (21). PT G20210A polimorfizmi özellikle başta sigara olmak üzere diğer trombofilik risk faktörleriyle etkileşerek vasküler olayların riskini arttırdığı bildirilmiştir (27). Ayrıca, ülkemizde yapılan bir çalışma da sigara alışkanlığıyla yakın ilişkisi olan Burger hastalığı ile PT G20210A polimorfizminin arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (28).

Özellikle sigara içen ve doğum kontrol hapları kullanan kadınlarda genetik trombofilik polimorfizimler (FVL, PT G20210A) ile koroner, serebral ve periferik arteriyel yataklarda tromboz gelişmesi arasında ilişki olduğu bildirilmiş olup; bu polimorfizimleri taşıyan kadınlarda arteriyel olayların riski daha fazla bulunmuştur (7). Çalışmamız PAH hastalığı için erkeklerde de aynı durumun özellikle PT G20210A polimorfizmi için geçerli olabileceğini önermektedir.

PAH'da sigaranın bırakılması, lipidemi, glisemi, serum kreatinin ve üremi seviyelerinin yakından izlenerek normal seviyelerde tutulması ve C-reaktif protein (CRP) gibi enflamatuvar prediktörlerin yakından izlenmesi gereklidir (29). İlaç tedavisinin yanında yaşam şartları da düzeltilmelidir. Ayrıca, genetik risk faktörleriyle ilişkisi olabileceğinden, başta sigara olmak üzere tüm risk faktörleriyle mücadele edilmelidir.

Sonuç olarak çalışmamızın özellikle sigara içenlerde PT G20210G polimorfizmiyle PAH arasında bir ilişki olduğu görüşünü desteklemektedir. Ancak, çalışmamızın geniş kapsamlı araştırmalar ile desteklenmesi gereklidir.

Kaynaklar

1. Franco RF, Trip MD, ten Cate H, van den Ende A, Prins MH, Kastelein JJ, et al. The 20210 G→A mutation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 1999; 104(1): 50-54.
2. Şatiroğlu Ö, Bostan M, Çiçek Y, Çetin M, Bozkurt E. Periferik arter hastalığı yaygınlığıyla aterosklerotik risk faktörleri arasındaki ilişki. *Selçuk Üniv Tıp Derg* 2011; 27(4): 213-218.
3. Reny JL, Alhenc-Gelas M, Fontana P, Bissery A, Julia PL, Fiessinger JN, et al. The factor II G20210A gene polymorphism, but not factor V Arg506Gln, is associated with peripheral arterial disease: results of a case-control study. *J Thromb Haemost* 2004; 2(8): 1334-1340.
4. Mueller T, Marschon R, Dieplinger B, Haidinger D, Gegenhuber A, Poelz W, et al. Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations are not associated with chronic limb ischemia: The Linz Peripheral Arterial Disease (LIPAD) Study. *J Vasc Surg* 2005; 41(5): 805-815.
5. Sartori M, Favaretto E, Legnani C, Cini M, Conti E, Pili C, et al. G20210A prothrombin mutation and critical limb ischaemia in patients with peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009; 38 (1): 113-117.
6. Beyan C, Beyan E. MTHFR C677T gene polymorphism is not a risk factor for venous thromboembolism. *Cukurova Med J* 2014; 39(1): 188-189.
7. Kim RJ, Becker RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J* 2003; 146(6): 948-957.
8. Köksal C, Konukoğlu D, Ercan M, Arslan C, Kazımoğlu K, Bozkurt K. Periferik arter hastalarında lipid peroksidasyonu ve antioksidan kapasite. *Turk Gogus Kalp Dama* 1999; 7(3): 244-246.
9. Belch JJ, Topol EJ, Agnelli G, Bertrand M, Califf RM, Clement DL, et al. Critical issues in peripheral arterial disease detection and management: a call to action. *Arch Intern Med* 2003; 163(8): 884-892.

10. Gerdes VE, ten Cate H, de Groot E, Kwa VI, Prins MH, Reitsma PH, et al. Arterial wall thickness and the risk of recurrent ischemic events in carriers of the prothrombin G20210A mutation with clinical manifestations of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 163(1): 135-140.
11. Sofi F, Lari B, Rogolino A, Marcucci M, Pratesi G, Dorigo W, et al. Thrombophilic risk factors for symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2005; 41(2): 256-260.
12. Atay AA, Tekin M, Allajalebeu K, Eğin Y, Akar N. The frequency of FV G1691A and PT G20210A mutations in an Albanian population. *Turk J Hematol* 2011; 28(3): 241-242.
13. Ayyıldız O, Kalkanlı S, Batun S, Aybak M, Isikdogan A, Tiftik N ve ark. Prothrombin G20210A gene mutation with LightCycler polymerase chain reaction in venous thrombosis and healthy population in the southeast of Turkey. *Heart Vessels* 2004; 19(4): 164-166.
14. Ekim M, Ekim H, Yılmaz YK. The prevalence of Factor V Leiden, prothrombin G20210A, MTHFR C677T and MTHFR A1298C mutations in healthy Turkish population. *Hippokratia* 2015; 19(4): 309-314.
15. Hussein AS. High prevalence of three prothrombotic polymorphisms among Palestinians: Factor V G1691A, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T. *J Thromb Thrombolysis* 2012; 34(3): 383-387.
16. Angelopoulou K, Nicolaides A, Constantinou Deltas C. Prevalence of genetic mutations that predispose to thrombophilia in a Greek Cypriot population. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000; 6(2):104-107.
17. Baranovskaya S, Kudinov S, Fomicheva E, Vasina V, Solovieva D, Khavinson V, et al. Age as a risk factor for myocardial infarction in Leiden mutation carriers. *Mol Genet Metab* 1998; 64(2): 155-157.
18. Kalkanlı S, Ayyıldız O, Tiftik N, Batun S, Işıkdogan A, İnce H, et al. Factor V Leiden mutation in venous thrombosis in Southeast Turkey. *Angiol* 2006; 57(2): 193-196.
19. Özbek N. Factor V 1691 G-A mutation distribution in a healthy Turkish population. *Turk J Haematol* 2009; 26(1): 9-11.
20. Jadaon MM. Epidemiology of activated protein C resistance and factor v leiden mutation in the mediterranean region. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011; 3: e2011037.
21. Archetti S, Martini M, Botteri E, Di Lorenzo D, Cervi E, Bonardelli S. Influence of genetic and environmental factors in peripheral arterial disease natural history: Analysis from six years follow up. *Int J App Basic Med Res* 2012; 2(2): 117-122.
22. Santos ME, das C L E Silva F, Gomes KB, Fernandes AP, Freitas FR, Faria MC, et al. Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase and in cysthethionşne beta synthase: is there a link to homocysteine levels in peripheral arterial disease? *Mol Biol Rep* 2011; 38(5): 3361-3366.
23. Hotoleanu C, Trifa A, Popp R, Fodor D. The importance of homozygous polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene in Romanian patients with idiopathic venous thromboembolism. *Balkan Med J* 2013; 30(2): 197-203.
24. Özmen F, Özmen MM, Özalp M, Akar N. The prevalence of factor V (G1691A), MTHFR (C677T) and PT (G20210A) gene mutations in arterial thrombosis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2009; 15(2): 113-119.
25. Gupta SK, Kotwal J, Kotwal A, Dhal A, Garg S. Role of homocysteine & MTHFR C677T gene polymorphism as risk factors for coronary artery disease in young Indians. *Indian J Med Res* 2012; 135(4): 506-512.
26. Khandanpour N, Willis G, Meyer FJ, Armon MP, Loke YK, Wright AJ, et al. Peripheral arterial disease and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutations: A case-control study and meta-analysis. *J Vasc Surg* 2009; 49(3): 711-718.
27. Doggen CJM, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circ* 1998; 97(11): 1037-1041.
28. Avcu F, Akar E, Demirkılıç U, Yılmaz E, Akar N, Atilla Y. The role of prothrombotic mutations in patients with Burger's disease. *Thromb Res* 2000; 100(3): 143-147.
29. Karabay Ö, Karaçelik M, Yıllık L, Tekin N, İriz AB, Kumdereli S ve ark. İskemik periferik arter hastalığı: Bir tarama çalışması. *Türk Göğüs Kalp Damar* 2012; 20(3): 450-457.