

Venöz Tromboz Ön Tanısı Olan Hastalarda Faktör V Leiden, Protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C Mutasyonlarının Dağılımı

Distribution of Factor V Leiden, Prothrombine G20210A, MTHFR C677T and MTHFR A1298C Mutations in Venous Thrombosis Pre-diagnosed Patients

Şenay BALCI FİDANCI¹, Hatice YILDIRIM YAROĞLU¹, Nil ÜNAL¹, Gülcan GÜNEŞ¹, Gökçen ALICI SERT¹, Nehir SUCU², Lokman AYAZ¹, Lülüfer TAMER GÜMÜŞ¹

¹Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

²Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Amaç: Trombotik hastalıklar, dünyada önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Trombotik hastalıkların gelişiminde farklı edinsel ve kalıtsal faktörler sorumlu tutulmaktadır. Multifaktöriyel patogeneze gösteren venöz tromboz ile bağlantılı olabilecek mutasyonların taranması klinik teşhisin doğrulanmasına, genetik risk faktörlerinin belirlenmesine ve erken dönemde önlem alınmasına yardımcı olabilir. Bu nedenle bu çalışmada tromboembolik olaylar görülen hastalarda; faktör V Leiden, protrombin G20210A, metilentetrahidrofolat redüktaz C677T ve metilentetrahidrofolat redüktaz A1298C mutasyonlarının sayı ve yüzde sıklık olarak dağılımının değerlendirilmesi amaçlandı.

Yöntem: 2007-2010 yılları arasında, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde venöz tromboz ön tanısı konulan 171 hastada faktör V Leiden, protrombin G20210A, metilentetrahidrofolat redüktaz C677T ve metilentetrahidrofolat redüktaz A1298C mutasyonları Real Time-PCR kullanılarak belirlendi ve bu mutasyonlara ait wild (yabamıl tip veya homozigot normal), heterozigot ve homozigot (mutant) genotip dağılımları sayı ve yüzde sıklık olarak değerlendirildi.

Bulgular: Venöz tromboz ön tanısı alan hastalarda metilentetrahidrofolat redüktaz C677T ve metilentetrahidrofolat redüktaz A1298C heterozigot ve homozigot mutasyon yüzdesi, faktör V Leiden, protrombin G20210A heterozigot ve homozigot mutasyon yüzdesinden daha yüksek olarak saptandı.

Sonuç: Kalıtsal risk faktörlerinin belirlenmesinin venöz trombozun önlem ve tedavisi için önemli olabileceği düşünüldü.

Anahtar kelimeler: FVL; FII; MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyon

Abstract

Aim: Thrombotic diseases in the world are regarded as one of the major causes of morbidity and mortality. Various acquired and hereditary factors are implicated in the development of thrombotic diseases. Screening of the mutations related to venous thrombosis with the multifactorial pathogenesis may help for the confirmation of clinical diagnosis, the identification of genetic risk factors and taking precautions at early stages. Therefore, in this study, the determination of the distribution of Factor V Leiden prothrombine G20210A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T and methylenetetrahydrofolate reductase A1298C mutations with respect to number and percent frequency in the patients with thromboembolic events.

Method: Factor V Leiden prothrombin G20210A, methylenetetrahydrofolate reductase C677T and methylenetetrahydrofolate reductase A1298C mutations were determined by Real Time-PCR in 171 pre-diagnosed venous thrombosis in Mersin University Medical Faculty Hospital in the term of 2007-2010. Wild, heterozygous and homozygous genotypic distributions of these mutations were evaluated as number and percentage frequency.

Results: In the patients with venous thrombosis diagnosis, percentiles of heterozygous and homozygous mutations for the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and methylenetetrahydrofolate reductase A1298C mutations were found to be higher than those for Factor V Leiden, prothrombine G20210A heterozygous and homozygous mutations.

Conclusion: It was considered that identification of the genetic risk factors might be useful tool for both for therapy and prevention of venous thrombosis.

Key words: FVL; FII; MTHFR C677T and MTHFR A1298C mutation

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2010;3(3):30-34

Geliş Tarihi : 27.05.2011

Kabul Tarihi : 15.09.2011

Yazışma Adresi: Şenay Balcı Fidancı, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

Tel : 0-324-337 43 00 / 1530

Faks : 0-324-337 43 05

E-posta : sbfidanci@hotmail.com

Giriş

Dünyada önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olarak kabul edilen trombotik hastalıkların gelişiminden, farklı edinsel ve kalıtsal faktörlerin değişik mekanizmalarla gösterdikleri etkilerin sorumlu olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, gelişmiş ülkelerde en sık rastlanan hastalık ve ölüm nedenleri arteriyel tromboembolik olaylara bağlı olmakla birlikte venöz tromboembolizmin de ölümlerin %10'undan sorumlu olduğu bildirilmiştir (1-4).

Venöz tromboz, lokal olarak venlerde oluşan trombusun dolaşımında tıkanıklığa yol açmasıdır. Çoğunlukla bacağına derin venlerinde, nadiren mezenter, beyin, retina ve karaciğer venlerinde oluşur. Oluştukları damar yüzeyinden koparak dolaşıma katılabilir ve embolizme neden olabilirler. Venöz tromboza sahip bireylerde kalıtsal trombotik bozukluklar yaygın bir şekilde bulunur (5-7). Protein C eksikliği, hiperhomosisteinemi, antitrombin III eksikliği, fibrinojen defektleri, protein S eksikliği, protrombin G20210A mutasyonu, plazminojen eksikliği, trombomodulin gen mutasyonları, plazma proteinlerindeki anormallikler kalıtsal trombofili nedenleri arasında yer almaktadır (8).

Faktör V, kan pıhtılaşma sistemindeki en önemli proteinlerden biridir. Faktör V, trombin tarafından faktör Va'ya aktiflenince faktör Xa ve protrombin ile kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks de protrombinin (FII), trombine (FIIa) dönüşümünü gerçekleştirir. Trombinin, fibrinojeni fibrine dönüştürmesi ile de pıhtı oluşur. Protrombin aktivatör kompleksi içerisinde faktör V, önce tek zincirli ve inaktiftir. Pıhtılaşma başlayınca trombin; FV molekülünü belirli noktalardan keserek, birbirlerine Ca⁺⁺ iyonları ile bağlı çift zincirli aktif molekül haline dönüştürür. Faktör Va'nın inaktivasyonu; protrombin bağlanma bölgelerini içeren ve dolayısıyla da prokoagülan aktiviteye sahip olan ağır zincirin, aktif protein C (APC) tarafından kesilmesi ile gerçekleşir. Ancak faktör V molekülü, mutasyon sonucu, proteolitik inaktivasyona dirençli olmakta ve trombin seviyesinde yükselmeye sebep olmaktadır. Faktör V Leiden (FVL) mutasyonu olarak adlandırılan bu mutasyon trombofili için yüksek risk grubunu oluşturan bireylerin taranması açısından oldukça önem taşımaktadır (9-12).

Karaciğerde sentezlenen ve pıhtılaşma sisteminde trombine dönüşen protrombin tek zincirli bir glikoproteindir (13). Protrombin geninin 3'-UTR bölgesindeki G20210A mutasyonu olarak adlandırılan mutasyon plazma protrombin miktarının artmasına neden olmaktadır (14,15). Yapılan çalışmalar artan plazma protrombin seviyelerinin venöz tromboembolide (VTE) etkili olduğunu göstermektedir (16).

Folat metabolizmasında önemli bir fonksiyona sahip olan Metilentetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) enzimi, homosisteinin metiyonine dönüşümü, pürin-primidin sentezi (DNA ve RNA biyosentezi) ve metilasyon reaksiyonlarının içerisinde görev alır. MTHFR geni üzerinde belli başlı iki mutasyon bulunmaktadır. Bunlar; MTHFR677C>T ve 1298A>C nokta mutasyonlarıdır. Bu

mutasyonlar enzim aktivitesini etkileyerek plazma homosistein seviyesinin yükselmesine neden olur. Total plazma homosistein (tHcy) seviyesindeki artış, arteriyel ve venöz tromboz için önemli bir risk faktörüdür (17-20).

Kalıtsal risk faktörlerinin belirlenmesi venöz trombozun önlem ve tedavisi için önem taşımaktadır. Bu nedenle bu çalışmada 2007-2010 yılları arasında, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde venöz tromboz ön tanısı konulan 171 hastada FVL, protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonlarının dağılımlarının sayı ve yüzde sıklık olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler

Çalışma grubumuzu 2007-2010 yılları arasında, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde venöz tromboz ön tanısı konulan ve yaşları 16 ile 69 arasında değişen 144 kadın (yaş ortalaması 31.83±8.37), 27 erkek (yaş ortalaması 41.56±11.8) olmak üzere 171 hasta oluşturmaktadır. Hastalara ait kan örnekleri EDTA içeren tüplere alındı ve DNA, high pure template preparation kiti kullanılarak (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) lökositlerden elde edildi. Faktör V Leiden, protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonları, LightCycler mutasyon belirleme kiti ile Real Time-PCR (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak belirlendi. Sonuçlar, wild (yabani tip veya homozigot normal), heterozigot ve homozigot (mutant) genotiplerine ait sayı ve yüzde sıklık olarak verildi.

İstatistiksel analizler için SPSS 17 (Statistical Package for Social Sciences version) paket programı kullanıldı. Faktör V Leiden, protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonları wild, heterozigot ve homozigot genotip frekansları bulundu. Hasta gruplarının yaş değerleri, Shapiro-Wilk testi ile incelendi ve normal dağılım gösterdikleri belirlendi. Bunun sonucunda yaş değerleri bakımından çalışma grubunun karşılaştırılması, bağımsız iki grup karşılaştırma testlerinden Independent sample t testi, genotiplerin dağılımları için Ki-kare testi kullanılarak belirlendi.

Bulgular

Çalışmamızda venöz tromboz ön tanısı alan hastalarda faktör V Leiden, protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonlarının dağılımları Tablo 1' de verildi. Venöz tromboz ön tanısı alan hastalarda MTHFR C677T ve MTHFR A1298C heterozigot ve homozigot mutasyon yüzdesi, faktör V Leiden, protrombin G20210A heterozigot ve homozigot mutasyon yüzdesinden daha yüksek olarak saptandı.

Venöz trombozlu hastalar, tromboflebit (n=51), koagülasyon bozukluğu (n=18) ve düşük öyküsü olan hastalar (Abort) (n=102) olmak üzere üç alt gruba ayrıldı ve bu grupların dağılımı ve gruplara ait faktör V Leiden, protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR

A1298C mutasyonlarının dağılımları Tablo 2'de verildi. Her üç grupta da en yüksek mutasyon yüzdesi heterozigot ve homozigot, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonunda görülürken, homozigot FVL mutasyonuna abort hasta grubunda rastlanmadı ve homozigot protrombin G20210A mutasyonu her üç grupta da saptanmadı.

Çalışmamızda ayrıca, tromboflebit, koagülasyon bozukluğu ve abort grubunda FVL, Protrombin

G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonlarına ait allel sıklığı değerlendirildi ve sonuçlar Tablo 3'te verildi. MTHFR A1298C C alleli koagülasyon bozukluğunda en yüksek sıklıkta görülürken, MTHFR C677T T alleli ise tromboflebit grubunda görüldü. Protrombin G20210A, A alleline abort grubunda rastlanmadı. FVL, A alleli ise koagülasyon bozukluğunda en yüksek sıklıkta saptandı.

Tablo 1. Venöz trombozlu hastalarda faktör V Leiden, protrombin G20210A(FII), MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonlarının dağılımı

	FVL n (%)	FII n (%)	MTHFR C677T n (%)	MTHFR A1298C n (%)
*Wild	157 (91.8)	165 (96.5)	76 (44.7)	67 (39.2)
Heterozigot	10 (5.8)	6 (3.5)	82 (48.2)	86 (50.3)
Homozigot	4 (2.3)	-	12 (7.1)	18 (10.5)

n: Hasta sayısı; *: yabani tip

Tablo 2. Venöz trombozlu hastalarda, hasta grupların dağılımı ve gruplara ait faktör V Leiden, protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonlarının dağılımı

		Tromboflebit	Koagülasyon	Abort
		% (n)	Bozukluğu % (n)	% (n)
MTHFR1298	*Wild	41.2 (21)	33.3 (6)	39.2 (40)
	Heterozigot	51.0 (26)	55.6 (10)	49.0 (50)
	Homozigot	7.8 (4)	11.1 (2)	11.8 (12)
MTHFR677	*Wild	37.3 (19)	55.6 (10)	46.1 (47)
	Heterozigot	51.0 (26)	38.9 (7)	50.0 (49)
	Homozigot	11.8 (6)	5.6 (1)	4.9 (5)
Protrombin G20210A	*Wild	90.2 (46)	94.4 (17)	100.0 (102)
	Heterozigot	9.8 (5)	5.6 (1)	---
	Homozigot	---	---	---
Faktör V Leiden	*Wild	92.2 (47)	72.2 (13)	95.1 (97)
	Heterozigot	5.9 (3)	11.2 (2)	4.9 (5)
	Homozigot	2 (1)	16.7 (3)	---

n: Hasta sayısı; *: yabani tip

Tablo 3. Venöz trombozlu hastalarda, faktör V Leiden, protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonlarına ait allel sıklığı

		Tromboflebit	Koagülasyon	Abort
		% (n)	Bozukluğu % (n)	% (n)
MTHFR1298	A	66.67 (68)	61.11 (22)	67.73 (130)
	C	33.33 (34)	38.89 (14)	36.27 (74)
MTHFR677	C	62.74 (64)	75 (27)	70.58 (144)
	T	37 (38)	25 (9)	29.42 (60)
Protrombin G20210A	G	95.01 (97)	97.22 (35)	100 (204)
	A	4.91 (5)	2.78 (1)	---
Faktör V Leiden	G	95.01 (97)	77.77 (28)	95.09 (199)
	A	4.91 (5)	22.23 (8)	4.91 (5)

n: Hasta sayısı

Tartışma

Venöz tromboz için kalıtsal risk faktörleri arasında FVL mutasyonu, Protrombin G20210A, MTHFR C677T ve MTHFR A1298C mutasyonları, protein C, protein S ve antitrombin eksiklikleri yer almaktadır (21). Yapılan çalışmalarda, Faktör V Leiden mutasyonunun tromboz riskini heterozigot taşıyıcılarda yaklaşık olarak 8 (22),

homozigot mutant bireylerde ise 80 kat (23) arttırdığı, 20210A allelinin VTE riskini 2-12 kat arttırdığı (24) gösterilmiştir. Nokta mutasyonlarının, homozigot ve heterozigot mutantlarda MTHFR enziminin aktivitesini, sırası ile %70 ve %35 olmak üzere azalttığı ve bununla birlikte, yapılan son çalışmalarda MTHFR'nin sadece homozigot olduğu durumlarda ve diğer trombofilik risk faktörleri varlığında düşüklere neden olduğu ileri sürülmektedir (25). Bazı çalışmalar da, Protrombin

20210G>A allelinin faktör V Leiden ve/veya homozigot mutant MTHFR677C>T mutasyonları ile birlikte olduğu durumlarda, tromboz riskinin arttığını göstermektedir (26).

Tromboz için önemli risk faktörleri olan mutasyonlar etnik ve coğrafik farklılıklar gösterir. Bu risk faktörleriyle ilgili yapılan çalışmalarda FVL sıklığı, Avrupa ülkelerinde %3-5 civarında, Yunanistan'da %14, Türkiye'de %7.1-10.3 arasında bulunmuştur. Kuzey Amerika'da insidansı oldukça yüksek bulunurken, Çin, Japonya ve Afrika'da mutasyon tespit edilmemiştir (27, 28). Çalışmamızda ise bu mutasyonun sıklığı %10.5 olarak bulundu ve bu değer yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Protrombin G20210A mutasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, Güney Avrupa'da tromboz hastalık insidansı %2-4 arasında, Batı ülkelerinde ise %6-8 arasında bulunmuştur (27). Akar ve ark. (29), yaptığı çalışmada Türk popülasyonunda tromboz hastalarında bu mutasyon sıklığını %2.7 olarak bildirmiştir. Bu çalışmada ise bu mutasyona ait oran %3.5 olarak bulundu. Sonucumuz Akar ve ark.'nın Türk popülasyonunda yaptığı çalışmaya yakın bir değerdir.

Ozmen ve ark. (30), MTHFR mutasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada, mutasyon sıklığını %46.6 bulurken, Tug ve ark (27), yaptıkları çalışmada daha düşük sonuçlar bulmuşlardır (%29 ve %44). Yaptığımız çalışmada ise MTHFR C677T mutasyon sıklığı %62.6 olarak bulunurken, MTHFR A1298C sıklığı ise %71.3 olarak saptanmıştır. Bu mutasyonla ilgili verilerimiz diğer çalışmalara göre daha yüksek olduğu görüldü.

Çalışmamızda MTHFR A1298C heterozigot genotip dağılımı wild genotipe göre daha yüksek bulunurken diğer genotiplerin yüzdeleri arasında fark görülmedi.

Sonuç olarak; kalıtsal risk faktörlerinin belirlenmesinin venöz trombozun önlem ve tedavisi için önemli olabileceği düşünüldü.

Kaynaklar

- Laffan M, Tuddenham E. Science, medicine and future: assessing thrombotic risk. *BMJ* 1998;317:520-3.
- Lichtman MA, Beutler E, Kipps T.J, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal J.T. *Williams Hematology*. 7th ed, McGraw-Hill Co. 2005.
- Rosendaal FR, Venous thrombosis: a multicausal disease. *The Lancet* 1999;353:1167-73.
- Reitsma PH, Rasendaal F.R. Past and future of genetic research in thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007;1:264-9.
- Cushman M, Glynn RJ, Goldhaber SZ, Moll S, Bauer K.A, Deitcher S, Shrivastava S, Ridker PM. Hormonal factors and risk of recurrent venous thrombosis: the prevention of recurrent venous thromboembolism trial. *J Thromb Haemost* 2006;2:199-203.
- Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Bouljykenov V, Chandy M, Dahlback B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 1996;76:651-2.
- Mannucci PM, Bucciarelli P, Rosendaal FR, Tripodi A. Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency or activated protein C resistance: A multicenter collaborative family study. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1999;19:1026-33.
- Greaves M, Preston FE. Pathogenesis of thrombosis: Antithrombotic therapy. In: Hoffbrand A.V., Lewis SM, Tuddenham EGD. (Eds.). *Postgraduate Haematology*. 4th Ed. Butterworth-Hainemann Co. Oxford 1999;654-74.
- Kujovich JL, Goodnight SH. Factor V Leiden and the Prothrombin gene mutation: Two common genetic defects associated with thrombosis. *WJM* 1998;168:524-5.
- Jenny R, Pitman D, Toole J, Kriz R.W, Aldape R.A, Hewick R et al. Complete cDNA and derived aminoacid sequence of human FV. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:4846-50.
- Sandra J.F.D, Davie W. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry* 1987;26:6165-77.
- Esmon CT. Anticoagulant Protein Crrhrombomodulin Pathway; Tollefsen DM. Antitrombin Deficiency; Greenberg D.L., Devie E.W. Introduction to Hemostasis and the Vit K Dependent Coagulation Factors. (8 ed). In: Scriver C.R., Beaudet AL, Sly W.S, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. USA, *The Mc Graw-Hill Companies Inc*.2001
- Girolami A, Simioni P, Scarano L, Carraro G. Prothrombin and the prothrombin 20210 G to A polymorphism: their relationship with hypercoagulability and thrombosis. *Blood Rev* 1999;13:205-10.
- Lensen R, Rosendaal F, Vandenbroucke J, Bertina R. Factor V Leiden: the venous thrombotic risk in thrombophilic families. *British Journal of Hematology* 2000;110:939-45.
- Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, Stefano VD, Castaman G, Mannucci PM. The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *British Journal of Haematology* 2000;111:1223-29.
- Butenass S, Van'T Veer, C, Mann KG. Normal thrombin generation, *Blood* 1999;94:2169-78.
- Demuth K, Moatti N, Hanon O, et al. Opposite Effects of Plasma Homocysteine and the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Mutation on Carotid Artery Geometry in Asymptomatic Adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1838-43.
- Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y, et al. Common Mutation A1298C in Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Association with Plasma total

- Homocysteine and Folate Concentrations. *J Nutr* 1999;129:1656-61.
19. Goyette P, Rozen R. The thermolabile variant 677C->T can further reduce activity when expressed in cis with severe mutations for human methylenetetrahydrofolate reductase. *Hum Mutat* 2000;16:132-8.
 20. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen, Z, et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 1998;9:652-6.
 21. Nizankowska-Mogilnicka E, Adamczak L et al. Genetic polymorphisms associated with acute pulmonary embolism and deep venous thrombosis. *Eur Respir J* 2003;21:25-30.
 22. Kalafatis M., Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem* 1994;269:31869-80.
 23. Aparicio, C, Dahlbäck, B. Molecular mechanisms of activated protein C resistance, Properties of factor V isolated from an individual with homozygosity for the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene. *Biochem J* 1996;313:467.
 24. Girolami A, Simioni P, Scarano L, Carraro G. Prothrombin and the prothrombin 20210 G to A polymorphism: their relationship with hypercoagulability and thrombosis. *Blood Res* 1999;13:205-10.
 25. Vanderput, NM, Gabreels, F, Stevens EM. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51.
 26. Bovill, EG, Hasstedt SJ, Callas PW. The G20210A prothrombin polymorphism is not associated with increased thromboembolic risk in a large protein C deficient kindred. *Thromb Haemost* 2000;86:366-70.
 27. Tug E, Aydın H, Kaplan E, Doğruer D. Frequency of genetic mutations associated with thromboembolism in the Western Black Sea region. *Internal Medicine* 2011;50:17-21.
 28. Segers K, Dahlback B, Nicolaes GA. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thromb Haemost* 2007;98:530-42.
 29. Akar N, Misirlioglu M, Akar E, Avcu F, Yalçın A, Sözüöz A. Prothrombin gene 20210 G-A mutation in the Turkish population. *Am J Hematol* 2008;58:249.
 30. Ozmen F, Ozmen MM, Ozalp N, Akar N. The prevalence of factor V (G1691A), MTHFR (C677T) and PT (G20210A) gene mutations in arterial thrombosis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg (Turkish J Trauma & Emergency Surgery)* 2009;15:113-19.