

# Tromboanjiitis Obliterans Hastalarında Protrombotik Gen Polimorfizminin Rolü

## Role of Prothrombotic Gene Polymorphism in Patients with Thromboangiitis Obliterans

Dr. Filiz ÖZEN,<sup>a</sup>  
Dr. Şinasi MANDUZ,<sup>b</sup>  
Dr. Nurkay KATRANCIOĞLU,<sup>b</sup>  
Dr. Oğuz KARAHAN,<sup>b</sup>  
Binnur KÖKSAL,<sup>a</sup>  
Dr. Öztürk ÖZDEMİR<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Tıbbi Genetik AD,  
<sup>b</sup>Kalp ve Damar Cerrahisi AD,  
Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Sivas

Geliş Tarihi/Received: 21.01.2009  
Kabul Tarihi/Accepted: 22.02.2009

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Oğuz KARAHAN  
Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Kalp ve Damar Cerrahisi AD, Sivas,  
TÜRKİYE/TURKEY  
oguzk2002@gmail.com

**ÖZET Amaç:** Tromboanjiitis obliterans (TAO) genç yaşlarda görülen, ekstremitelerin küçük-orta boy arter ve venlerinde segmental tutulum gösteren ilerleyici bir hastalık tablosudur. Sigara içiciliği hastalıkla direkt ilişkilendirilse de hastalığın etiopatogenezi henüz tam olarak ortaya konamamıştır. Medikal ve cerrahi tedavilerdeki tüm gelişmelere rağmen tatmin edici bir tedavi sağlanamayan bu hastalık, ekstremitte amputasyonuna varan sonuçlara yol açabilmektedir. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada, vasküler hastalıklara yol açtığı bilinen, protrombin G20210A, faktör V G1691A (Factor V Leiden), faktör V H1299R (R2), metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerinin TAO hastalarındaki prevalansını saptamayı amaçladık. Bunun için kliniğimize başvurarak TAO tanısı almış 30 hasta ve herhangi bir vasküler şikâyeti olmayan sağlıklı 30 bireyden periferik kan alınarak gruplar arasında olgu-kontrol çalışması yaptık. **Bulgular:** Sadece homozigot MTHFR A1298C gen polimorfizmini ( $p=0.024$ ) TAO hastalarında anlamlı bulduk. Ayrıca, her iki gruptaki bireylerin MTHFR C677T ( $p=0.112$ ) gen polimorfizmi yönünden karşılaştırıldığında farklılık önemsiz bulunmuştur. Fakat olgu grubunda %13.3 oranında homozigotluk saptanırken kontrol grubunda homozigotluk saptanamamıştır. **Sonuç:** MTHFR polimorfizminin TAO hastaları için önemli bir risk faktörü olabileceğini ve bu gen polimorfizminin rutin çalışılmasıyla gelecekte bu hastalığın genetik predispozisyonunun daha iyi anlaşılabileceğini düşünmekteyiz. Nitekim TAO hastalığının etiopatogenezinin çözümlenmesi, bu hastalık nedeni ile oluşan ekstremitte ve iş gücü kayıplarının azaltılması için de önem arz etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Tromboanjiitis obliterans; polimorfizm, genetik

**ABSTRACT Objective:** Thromboangiitis obliterans (TAO) is a progressive manifestation seen in young ages. It is segmental involvement in arteries and veins of small and middle sized extremities. Etiopathogenesis of disease could not be evenly revealed, despite smoking can be associated with this disease. This disease, in which there is no satisfactory treatment, leads to usually amputation of extremity, although all developments in medical and surgical treatments. **Material and Methods:** In this study, we aimed to detect the prevalence of gene polymorphisms, prothrombin G20210A, factor V G1691A (factor V Leiden), factor V H1299R (R2), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and MTHFR A1298C which known lead to vascular disease, in patients with TAO. Because of this, we performed case-control study between groups, drawing peripheral blood from 30 patients who diagnosed with TAO in our clinic and from 30 healthy individuals have no complaint. **Result:** We found that only MTHFR A1298C gene polymorphisms ( $p=0.024$ ) was significantly more frequent in patients with TAO. Furthermore, difference was not significant when individuals in the both groups were compared for MTHFR C677T ( $p=0.112$ ). However, homozygote MTHFR C677T mutation was not detected in control group, while it was detected at the rate of 13.3% in case group. **Conclusions:** As a result we found that the gene polymorphism of MTHFR may be an important risk factor for patients with TAO and the genetic predisposition of this disease can be better understood with routine studies of this gene polymorphism. Additionally, analyses of etiopathogenesis of the TAO disease have importance for loss of extremity and labor force by reason of this disease.

**Key Words:** Thromboangiitis obliterans; polymorphism, genetic

**L**eo Buerger (1908,1924), tarafından “Buerger hastalığı” olarak tanımlanan tromboanjitit obliterans (TAO), ülkemizin de içinde bulunduğu bir coğrafyada sık rastlanan ve önemli oranda ekstremitelere kaybına yol açan, sosyal ve psikolojik açıdan önemli bir hastalıktır.<sup>1</sup>

TAO genç erkeklerde daha sık görülen, alt ve üst ekstremitelerdeki küçük-orta boy arter ve venlerde segmental tutulum gösteren periferik iskemiye yol açarak ilerleyen bir patolojidir.<sup>1,2</sup> Hastalığın başlaması ve ilerlemesinde sigaranın santral bir rolü olduğu düşünülse de, hastalığın etiopatogenezinde genetik, hiperkoagülabilitate, endotel fonksiyonu ve immünolojik mekanizmalar gibi faktörlerin de rol aldığı düşünülmektedir.<sup>1-3</sup>

TAO hastalarında HLA-A9 ve HLA-B5 gen allelleri açısından yüksek bir oran bildirilmiştir. Bu durum, hastalığın zemininde genetik bir predispozisyon olabileceğini göstermektedir.<sup>3</sup> TAO’lu hastalarda ürokinaz plazminojen aktivatörü iki kat daha yüksektir ve serbest plazminojen aktivatör inhibitörü %40 daha düşüktür. Serotonine artmış trombosit yanıtı mevcuttur; sitoplazmik antinötrofil sitoplazmik antikor (cANCA), perinükleer antinötrofil sitoplazmik antikor (pANCA), antinükleer antikorlar (ANA), anti-Ro, antikardiyolipin antikorlar negatiftir. Endotelyal-dependent vazodilatasyon, sağlam ekstremitelerde bile bozulmuştur. Tip I ve III kollajene artmış selüler bir duyarlılık vardır.<sup>1,3</sup>

Hasta damarın mikroskopik incelenmesinde adventisiyada vazovazorumlar çevresinde lenfositler, dev hücreler, fibröz hiperplazi ve intimal kalınlaşma mevcuttur. Düz kas hücre nekrozu olmadan transmural inflamasyon izlenir. Lümen içi erken dönemde taze trombüsle doludur ve trombüsün içinde multinükleer dev hücreler ve mikroabseler izlenir. Geç dönemde ise organize trombüsler rekanalizasyon gösterir.<sup>1,3</sup>

Tanı için iyi bir anamnez ve klinik gözlemin yanı sıra, doppler ultrasonografi (USG), arteriyel akım testleri ve arteriyografiyle oklüzyonun distalindeki kollaterallerin tirbuşon veya örümcek bacağı biçiminde izlenmesi tanıyı kesinleştirmek için yardımcı olur.<sup>1</sup>

Tütün içiciliği ile hastalığın seyri arasında direkt ilişki vardır.<sup>1</sup> Tanı sonrası bu alışkanlığına de-

vam eden hastalarda prognozda giderek kötüleşme bunun direkt bir göstergesidir. Bu nedenle tütün içiciliğinin bırakılması tedavinin temelini teşkil eder. Hasta eğitimi de çok önemlidir. Hastalara günlük aktivitelerinde sıkı lastikli çorap giyilmesi gibi ekstremitelere kan akımını bozacak durumlardan kaçınılmaları mutlaka anlatılmalıdır. Ancak bütün profilaktik önlemlere rağmen bu hastalarda medikal ve cerrahi tedavi gerekebilir.<sup>1</sup> Gelişen medikal ve cerrahi tedavilere rağmen bu hastalığın %27 gibi bir oranla bir veya daha fazla ekstremitelere amputasyonu ile sonuçlandığı literatürde bildirilmiştir.<sup>4</sup>

Ekstremitelere kaybına yol açan bu hastalık, ilerleyen dönemlerde iş gücü kaybı ve psikososyal problemleri de beraberinde getirmekte, sonuç olarak hem bireysel hem de toplumsal olarak maddi ve manevi sorunlar doğurmaktadır.<sup>5</sup>

Bu kadar ciddi sorunlara yol açan bir hastalığın önlenmesi için sigara ve benzeri alışkanlıklara karşı toplumun bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Bu hastalığa sahip olan bireylerin toplumdaki sosyal geçerliliklerini koruyabilmeleri amacıyla, hastalığın etiopatogenezinin iyi anlaşılıp erken tanı konulması, tedavi başarısını artırmakta ve ekstremitelere kayıplarını önleyebilmektedir.<sup>6</sup>

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

TAO tanısı konularak en kısa 1, en uzun 10 yıl süre ile kliniğimizde takip edilmekte olan 30 hastanın periferik kanları alınarak genetik protrombotik risk faktörleri çalışıldı. Kontrol grubu olarak daha önceden herhangi bir vasküler patoloji tanısı almamış ve hiçbir aktif şikâyeti bulunmayan 30 sağlıklı birey seçildi. Periferik kanları alınarak aynı faktörler çalışıldı.

Çalışmaya alınan 30 hasta da; anamnezinde sigara içiciliği bulunan ve plantar kladikasyon, ekstremitelerde ısı ve his kaybı gibi şikâyetlerle kliniğimize başvuran olgulardı. Yapılan renkli doppler USG incelemelerinde azalmış arteriyel akım paterni izlenmesi üzerine TAO ön tanısıyla arteriyografi çekilmiş olan 30 hastanın arteriyografik incelemelerinde arteriyel oklüzyon ve oluşan kollaterallerde tirbuşon görünümü tipikti.

Genetik sonuçların elde edilmesinde sırasıyla;

Çalışmaya alınan olgulardan 2 mL periferik venöz kan EDTA'lı tüplere alındı ve -20 °C'de muhafaza edildi. Invisorb Spin Stool DNA Kit (Invitek, Berlin, Almanya) kullanılarak periferik kan dokusundan genomik DNA analizi yapıldı. CVD StripAssay (ViennaLab, Labordiagnostika GmbH, Vienna, Avusturya) kiti kullanılarak ApoE multiplex amplifikasyonu yapıldı. Hibridizasyon işleminden önce elde edilen PCR ürünleri (4 mL) %1'lik elektroforesde başarılı amplifikasyon açısından değerlendirildi. Başarılı amplifikasyon elde edilen PCR ürünlerinden 10 mL ürün revers hibridizasyon analizi için kullanıldı. ProfiBlot T48 (Tecan, İsviçre) cihazı kullanılarak revers-hibridizasyon işlemi uygulandı.

Periferik kanlardan DNA izolasyonu yapılması için yerel etik kurul onayı alındı. Çalışma ve kontrol grubundaki bireyler çalışma ile ilgili bilgilendirilerek onayları alındı.

Vasküler trombus oluşumunda rol oynadığı varsayılan protrombin G20210A, faktör V G1691A (Factor V Leiden), faktör V H1299R (R2), metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T ve MTHFR A1298C gen profilleri hasta ve kontrol grupları açısından değerlendirildi ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Gruplara ait elde edilen veriler, SPSS programı, versiyon 14.0 ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar ki-kare testi ( $\chi^2$ ) kullanılarak yapıldı. Elde edilen  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edildi. Ayrıca gruplar arası uygunluk için iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi kullanıldı ve yanılma düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 30 hastanın 28 (%93)'i erkek 2 (%7)'si kadındı. Kontrol grubunda ise 27 (%90) erkek, 3 (%10) kadın bulunuyordu. Çalışmaya alınan TAO hastalarının yaş ortalaması  $42.9 \pm 14.3$  yıl, kontrol grubunun yaş ortalaması ise  $40.9 \pm 4.79$  yıl olarak saptandı. İki grup karşılaştırıldığında yaş yönünden farklılık anlamlı değildi [( $t = 0.69$ );  $p = 0.487$ ;  $p > 0.05$ ].

Hasta grubunda 29 (%97), kontrol grubunda ise 22 (%73) olgu sigara kullanıyordu.

Protrombin G20210A, faktör V G1691A (Factor V Leiden), faktör V H1299R (R2), metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmlerinden sadece MTHFR A1298C gen polimorfizmini ( $p = 0.024$ ) TAO hastalarında anlamlı bulundu. Ayrıca, her iki gruptaki bireyler MTHFR C677T ( $p = 0.112$ ) gen polimorfizmi yönünden karşılaştırıldığında farklılık anlamlı değildi. Fakat olgu grubunda %13.3 oranında homozigotluk saptanırken kontrol grubunda homozigotluk saptanamadı (Tablo 1).

## TARTIŞMA

TAO aterosklerotik olmayan, etiyolojisi net olarak bilinmeyen, ekstremitelerin küçük-orta çaplı damarlarını tutan sigarayla güçlü ilişkisi olan inflamatuvar bir hastalıktır. TAO genellikle 40 yaş altı erkeklerde görülür.<sup>7,8</sup> Hastalığın sigara içen kadınlarda da insidansının arttığını gösteren yayınlar mevcuttur.<sup>3</sup> Bizim çalışmamızda 28'i erkek, 2'si kadın olan olguların yaş ortalaması  $42.9 \pm 14.3$  yıl olarak izlenmiştir. Hasta grubunda sigara içen olgu sayısı 29 (%97), kontrol grubunda ise 22 (%73)'dir.

Etiyolojisinin anlaşılabilir olması bu hastalığın tanı ve tedavisini zorlaştırmaktadır.<sup>9</sup> Literatürde diğer risk faktörleri ya da predispozan faktörler hakkında çok az veri bulunmaktadır.<sup>10,11</sup> TAO hastalarında HLA-9 ve HLA-B5 gen allelleri açısından yüksek bir oran bildirilmiştir. Bu durum hastalığın zemininde genetik bir predispozisyon olabileceğini düşündürmektedir.<sup>3</sup> Hasta damarın mikroskopik incelenmesinde adventisiyada vazo-

**TABLO 1:** TAO olgularında saptanan trombofilik gen bölgelerine ait mutasyon frekansları.

Taranan mutasyonlar	p
Protrombin G20210A	0.309
Faktör V G1691A	0.310
Faktör V H1299R	0.134
MTHFR C677T	0.112
MTHFR A1298C	* 0.024

MTHFR: Metilentetrahidrofolat.

\* $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

vazorumlar çevresinde lenfositler, dev hücreler, fibröz hiperplazi ve intimal kalınlaşma ile karakterize vaskülit görülmektedir. Düz kas hücre nekrozu olmadan transmural inflamasyon izlenmektedir. Lümen içi erken dönemde inflamatuvar hücre içermeyen taze trombüsle doludur ve trombüsün içinde multinükleer dev hücreler ve mikroabseler izlenmektedir. Geç dönemde ise organize trombüsler rekanilazasyon göstermektedir.<sup>3</sup> Bu çalışmada, hastalığın etiolojisinde genetik faktörlerin rol oynama ihtimali ve hasta damar içerisinde trombüs formasyonu bulunmasından dolayı, hasta ve sağlıklı bireylerde genetik protrombotik risk faktörleri olan protrombin G20210A, faktör V G1691A (Factor V Leiden), faktör V H1299R (R2), MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmleri incelenmiştir.

Protrombin G20210A'nın heterozigot mutasyonunda tromboza yatkınlık konusunda sonuçlar tartışmalı olsa da, homozigot mutasyonu olan kişilerde arteriyel ve venöz trombüs için artmış risk söz konusudur. Mutasyonun toplumumuzdaki prevalansı %5.2'dir.<sup>12,13</sup> Avcu ve ark. yaptıkları çalışmada bu faktörün TAO için anlamlı olabileceğini belirtmişlerdir.<sup>14</sup> Oysa bizim çalışmamızda protrombin G20210A gen polimorfizmi sağlıklı popülasyona göre anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.309$ ).

Faktör V G1691A (Factor V Leiden) mutasyonunun bulunduğu bölge, aktive protein C (APC)'nin Faktör Va'yı yıktığı üç kesim noktadan biridir. Mutasyon sonucu APC'ye direnç gelişmekte ve Faktör V Leiden, Faktör Va'ya göre 10 kat yavaş yıkılıp, dolaşımında daha uzun kalmaktadır. Heterozigot mutasyonunda tromboz riski hafif artmışken (3-5 kat) homozigot mutasyonunda ise tromboz riski ciddi olarak artmaktadır (20 kat). Bu mutasyonun toplumumuzdaki prevalansı %5.2'dir.<sup>13,15,16</sup> Faktör V H1299R (R2) mutasyonu Faktör V Leiden'e göre daha hafif bir APC direnci yaratmaktadır. Avcu ve ark. yaptıkları çalışmada bu mutasyonların TAO için geçerli anlam taşımadığını düşünmüştür.<sup>14</sup> Bizim çalışmamızda da uyumlu olarak Faktör V G1691A (Factor V Leiden) ve Faktör V H1299R (R2) mutasyonları ile TAO hastalığı arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Homosistein metabolizmasında rol oynayan MTHFR enziminin genetik defekti veya folat alım eksikliğine bağlı hiperhomosisteineminin ateroskleroz ve vasküler hastalıklarda bir risk faktörü olduğu ortaya çıkarılmıştır.<sup>17</sup> MTHFR geninde 677. pozisyonda A yerine T alleli taşıyanlarda enzim daha termolabil ve daha düşük aktivitelidir. Bu da plazma folat konsantrasyonunda düşmeye ve homosistein konsantrasyonunda artmaya neden olmaktadır.<sup>18,19</sup> MTHFR A1298C mutasyonunun da plazma homosistein konsantrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir.<sup>18</sup> Sigaranın da folat konsantrasyonunu düşürdüğü bilinmektedir.<sup>20</sup> Yapılan klinik çalışmalarda MTHFR C677T ve MTHFR A1298C gen polimorfizmleri ile TAO arasında direkt ilişki gösterilememiştir.<sup>17,21</sup> Bununla birlikte sigara içicilerinde MTHFR C677T homozigot mutasyonunun folat seviyesini düşürdüğünü ve homosistein seviyelerini etkilediğini belirten yayınlar da mevcuttur.<sup>22</sup> Bizim çalışmamızda TAO hastalarındaki homozigot MTHFR A1298C gen polimorfizmi ( $p=0.024$ ) sağlıklı popülasyona göre anlamlı bulunmuştur (Tablo 2). Ayrıca, her iki gruptaki bireyler MTHFR C677T ( $p=0.112$ ) gen polimorfizmi yönünden karşılaştırıldığında farklılık önemsiz bulunmuştur. Fakat olgu grubunda %13.3 oranında homozigotluk saptanırken kontrol grubunda homozigotluk saptanamamıştır (Tablo 3).

Sonuç olarak MTHFR A1298C gen polimorfizminin çeşitli mekanizmalarla TAO hastalığının progresyonunda veya etiyopatogenezinde rol oynayabileceği kanaatindeyiz. Bununla birlikte, MTHFR C677T geninde homozigot mutasyonu olanların da ek bir risk taşıma olasılığı mevcuttur.

**TABLO 2:** Hasta ve kontrol grubuna ait elde edilen MTHFR A1298C allelinin mutasyon profilleri ve oranları.

Allel	MTHFR A1298C (ki-kare → 8.88 $p=0.012$ )					
	Non mutant (AA)		Heterozigot (AC)		Homozigot (CC)	
	n	%	n	%	n	%
<b>Grup</b>						
Hasta	12	40	12	40	6	20
Kontrol	21	70	9	30	0	0
<b>p</b>	0.020		0.417		0.024	

MTHFR: Metilentetrahidrofolat.

**TABLO 3:** Hasta ve kontrol grubuna ait elde edilen MTHFR C677T allelinin mutasyon profilleri ve oranları.

Allel	MTHFR C677T (ki-kare → 5.20 p= 0.056)					
	Non mutant (CC)		Heterozigot (CT)		Homozigot (TT)	
	n	%	n	%	n	%
Hasta	15	50	11	36.7	4*	13.3
Kontrol	21	70	9	30	0	0
p	0.114		0.584		0.112	

MTHFR: Metilendetetrahydrofolat.

\* p= 0.112 (p> 0.05); Gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur, fakat hasta grubunda %13.3 oranında homozigotluk saptanırken kontrol grubunda homozigotluk saptanamaması dikkat çekicidir.

Ekstremitte amputasyonları ve sosyoekonomik kayıplara yol açan bu hastalığın etiopatogenezinin anlaşılacak erken tanıyla amputasyonların önlenmesi ve etiopatogenezinin daha iyi anlaşılacak tedavi başarısının artırılması önem arz etmektedir. Bu amaçla gerek serolojik gerekse genetik alanda daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır. Bizim çalışmamızın da gelecekte yapılacak benzeri çalışmalarda taranacak olan mutasyonun seçilmesi ve uygun serolojik testlerle daha geniş olgu çalışmaları yapmak açısından faydalı bir pilot çalışma olacağına inanıyoruz.

## KAYNAKLAR

- Kobayashi M, Nishikimi N, Komori K. Current pathological and clinical aspects of Buerger's disease in Japan. *Ann Vasc Surg* 2006;20(1): 148-56.
- Taşoğlu I, Hanedan O, Ulus AT. [Thromboangiitis obliterans (Buerger disease).] *Türkiye Klinikleri J Gen Surg-Special Topics* 2008;1(3): 15-25.
- Szuba A, Cooke JP. Thromboangiitis obliterans. An update on Buerger's disease. *West J Med* 1998;168(4):255-60.
- Cooper LT, Tse TS, Mikhail MA, McBane RD, Stanson AW, Ballman KV Long-term survival and amputation risk in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Am Coll Cardiol* 2004;44(12):2410-1.
- Ohta T, Ishioashi H, Hosaka M, Sugimoto Clinical and social consequences of Buerger disease. *J Vasc Surg* 2004;39(1):176-80.
- Young C, Beynon H, Haskard D. Buerger's disease (thromboangiitis obliterans): a reversible cause of upper limb digital infarcts. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39(4):442-3.
- Buerger L. (1908). Thrombo-angiitis obliterans: A study of the vascular lesions leading to presenile spontaneous gangrene. *Am J Med* 1952;13(5):526-32.
- Brodmann M, Renner W, Stark G, Winkler M, Pabst E, Hofmann C, et al. Prothrombotic risk factors in patients with thrombangitis obliterans. *Thromb Res* 2000;99(5):483-6.
- Foley S, Gibbs H, Muir J. Painful digital infarction in a male smoker treated as Buerger's disease. *Australas J Dermatol* 2008;49(2):94-7.
- Stammler F, Diehm C, Hsu E, Stockinger K, Amendt K. [The prevalence of hyperhomocysteinemia in thromboangiitis obliterans. Does homocysteine play a role pathogenetically?] *Dtsch Med Wochenschr* 1996;121(46):1417-23.
- Chen Z, Takahashi M, Naruse T, Nakajima T, Chen YW, Inoue Y, et al. Synergistic contribution of CD14 and HLA loci in the susceptibility to Buerger disease. *Human Genet* 2007;122(3-4):367-72.
- Martinelli I, Battaglioli T, Bucciarelli P, Passamonti SM, Mannucci PM. Risk factors and recurrence rate of primary deep vein thrombosis of the upper extremities. *Circulation* 2004;110(5):566-70.
- Dönmez Y, Kanadası M, Tanrıverdi K, Demir M, Demirtas M, Caylı M, et al. Prothrombin 20210GA and factor V Leiden mutations in patients less than 55 years old with myocardial infarction. *Jpn Heart J* 2004;45(3):505-12.
- Avcu F, Akar E, Demirkiliç U, Yılmaz E, Akar N, Yalçın A. The role of prothrombotic mutations in patients with Buerger's disease. *Thromb Res* 2000;100(3):143-7.
- Hendler MF, Meschengieser SS, Blanco AN, Alberto MF, Salviú MJ, Gennari L, et al. Primary upper-extremity deep vein thrombosis: high prevalence of thrombophilic defects. *Am J Hematol* 2004;76(4):330-7.
- Castoldi E, Rosing J. Factor V Leiden: a disorder of factor V anticoagulant function. *Curr Opin Hematol* 2004;11(3):176-81.
- Kawasaki T, Fujimura H, Kakinoki E, Uemichi A, Miyata T. Is there a role for genetic polymorphism of C677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Buerger's disease? *Thromb Haemost* 2000;84(4):736-7.
- Hanson NQ, Aras O, Yang F, Tsai MY. C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: incidence and effect of combined genotypes on plasma fasting and post-methionine load homocysteine in vascular disease. *Clin Chem* 2001; 47(4):661-6.
- Zheng YZ, Tong J, Do XP, Pu XQ, Zhou BT. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and its association with arterial and venous thrombosis in the Chinese population. *Br J Haematol* 2000;109(4):870-4.
- Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Richards EW, Krumdieck CL. Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 1994;60(4):559-66.
- Brodmann M, Renner W, Stark G, Seinost G, Pilger E. C 677T methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism and thrombangitis obliterans. *Int J Cardiol* 2002;83(3): 275-6.
- Brown KS, Kluijtmans LA, Young IS, Murray L, McMaster D, Woodside JV, et al. The 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism interacts with smoking to increase homocysteine. *Atherosclerosis* 2004; 174(2):315-22.