



T.C. MALTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

ANABİLİM DALI BAŞKANI: PROF.DR.GÜLENDAM KOÇAK
TEZ YÜRÜTMENİ: PROF.DR.NÜVİT ALTINKAYA

**TERM VE PRETERM YENİDOĞANLARDA K VİTAMİNİ
ÖNCESİ VE SONRASI
SERUM GROWTH ARREST SPECIFIC-6 (GAS-6)
PROTEİN DÜZEYLERİ**

Tıpta Uzmanlık Tezi

DR.EMEL EKŞİ ALP

İSTANBUL 2013

I. TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında büyük emeği olan, her zaman desteğini hissettiren değerli hocam Prof.Dr.Nüvit ALTINKAYA başta olmak üzere bilgi ve tecrübelerini bizlerden esirgemeyen hocalarımız Sayın Prof.Dr.Feyzullah ÇETİNKAYA ve Sayın Prof.Dr.Gülendam KOÇAK'a saygılarımı sunarım.

Tezime katkılarından dolayı Sayın Yrd.Doç.Dr.R.Gökmen ERCAN'a, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof.Dr.Fikriye URAS ve Sayın Zeynep KARACA'ya; örneklerin toplanmasında emeği geçen Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı hemşireleri ve tüm laboratuvar çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Hayalimdeki meslek seçimimi gerçekleştirebilmem için her zaman yanımda olan anneme,babama ve eşime; eğitim ve öğretim hayatımda yolumu aydınlatan sevgili teyzem Prof.Dr.Günay YILMAZ GÜNGÖR'e sonsuz teşekkürler...

Dr.Emel EKŞİ ALP

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR.....	ii
II. İÇİNDEKİLER.....	iii
III. KISALTMALAR ve SİMGELER.....	v
IV. ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ.....	vii
i. Şekil Listesi.....	vii
ii. Tablo Listesi.....	vii
1. ÖZET.....	8
2. SUMMARY.....	10
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	12
4. GENEL BİLGİLER.....	13
4.1. K Vitamini.....	13
4.1.1. K vitamininin yapısı ve biyolojik önemi.....	13
4.1.2. K vitamini emilimi.....	15
4.1.3. K vitamininin etkileri.....	16
4.1.4. K vitamini eksikliği.....	18
4.1.5. K vitamini profilaksisi.....	19
4.1.6. K vitaminine bağımlı proteinler.....	20
4.1.6.1. Protrombin.....	21
4.1.6.2. Faktör VII.....	21
4.1.6.3. Faktör IX.....	22
4.1.6.4. Faktör X.....	22
4.1.6.5. Protein C.....	22
4.1.6.6. Protein S.....	23
4.2. Gas6 Proteini.....	24
4.2.1. Gas6 proteininin yapısı.....	24
4.2.2. Gas6 reseptörleri (TAM Reseptörleri).....	27
4.2.3. Gas6 ve TAM Reseptörleri Arasındaki İlişki.....	33
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	37
5.1. Çalışma Grubu ve Örneklerin Toplanması.....	37
5.2. Çalışmadan Çıkarılma Koşulları.....	37

5.3. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) Yöntemiyle Gas6 Protein Konsantrasyonunun Ölçümü	37
5.4. Kullanılan Kimyasallar	38
5.5. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	38
5.6. ELISA Yöntemi İçin Çözeltilerin Hazırlanması	39
5.7. ELISA İşlem Basamakları	40
5.8. İstatiksel Analizler	42
6. BULGULAR	43
7. TARTIŞMA	46
8. SONUÇLAR	50
9. KAYNAKLAR	51

III. KISALTMALAR ve SİMGELER

AAP: Amerikan Pediatri Akademisi

ADP: Adenozin difosfat

APC: Aktive protein C

ATP: Adenozin trifosfat

BGP: Kemik gla proteini (bone gla protein)

BSA: Sığır serum albümin (bovine serum albumin)

cDNA: Komplementer deoksiribonükleik asit

C4BP: C4 bağlayıcı protein

DAÇ: Diyabetik anne çocukları

DİK: Disemine intravasküler koagülasyon

EGF: Epidermal büyüme faktörü

ELISA: Enzim-bağlı immunsorbent ölçüm

EMR: Erken membran rüptürü

Gas6: "Growth arrest specific protein"-6

Gla: γ -karboksiglutamik asit

Ig: İmmunglobulin

İUBG: İntrauterin büyüme geriliği

i.m: İntramusküler

i.v: İntravenöz

KH2: K vitamininin indirgenmiş formu olan hidrokinon

MAPK: Mitojen tarafından aktiflenen protein kinaz

MGP: Matriks gla protein

MK: Menakinon

MS: Multipl skleroz

PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1

PBS: Fosfat tamponlu salin

PI3K: Fosfatidilinozitol 3-kinaz

PIVKA: K vitamini yokluğu proteini (protein induced by vitamin K absence)

PRGP: Prolinden zengin gla protein (proline-rich gla protein)

ROS: Reaktif oksijen türleri

RTK: Reseptör tirozin kinaz

RT-PCR: Revers transkriptaz – polimeraz zincir reaksiyonu

SHBG: Seks hormon bağlayıcı globulin

TAFI: Trombinle aktiflenen fibrinolitik inhibitör

TAM: Tyro3, Axl ve Mer reseptörleri

TNF α : Tümör nekrozis faktör- α

VKOR: Vitamin K epoksit redüktaz

vWF: von Willebrand Faktör

IV. ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ

i. Şekil Listesi

Şekil 1: K1 vitamininin açık yapısı

Şekil 2: K2 vitamininin açık yapısı

Şekil 3: K vitamininin temel yapısı (K3 vitamini)

Şekil 4: K vitamini epoksit döngüsü

Şekil 5: Gas6 ve protein S'in yapısal organizasyonu

Şekil 6: TAM reseptörleri ve ligandları

Şekil 7: Hücre canlılığının sürdürülmesi, apoptoz ve immun regülasyonda Axl'in farklı rolleri

Şekil 8: Gas6'nın LG bölgesi ve Axl'in Ig bölgeleri arasındaki kristal kompleks

Şekil 9: ELISA yöntemiyle Gas6 düzeyinin ölçümü

ii. Tablo Listesi

Tablo 1: Preterm ve term yenidoğanlarda K vitamini öncesi ve sonrası serum Gas6 protein düzeyleri

Tablo 2: Diyabetik anne çocukları (DAÇ) ve DAÇ olmayanların Gas6 düzeyleri

1. ÖZET

Term ve Preterm Yenidoğanlarda K Vitamini Öncesi ve Sonrası Serum Gas-6 Protein Düzeyleri

Amaç: Growth arrest-specific gene 6 (GAS6) 1988’de büyümesi engellenmiş hücrelerde keşfedilmiş bir gen dir. Bu genin kodladığı Gas6 proteini 75-kDa moleköl ağırlığında, K vitaminine bağımlı protein ailesine en son katılan ve 678 aminoasitten oluşan bir proteindir. %44 aminoasit ortaklığı ile antikoagölün protein S’e yapısal olarak benzer. Organizmadaki yaygın dağılımına bağılı olarak endotel hücrelerinde, vasköler düz kas hücrelerinde, osteoklastlarda, epitelyal hücreler ve fibroblastlarda hücre yaşamının devamında ve proliferasyonunda rol oynar. Literatürde Gas6 referans aralıklarının oluşturulması amacıyla daha önce erişkinlerdeki düzeylerin belirlenmiş olmasına karşın yenidoğanlarda serum Gas6 düzeyi referans aralıkları ile ilgili henüz yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Hem yenidoğana özgü referans değerlerinin oluşturulmasına bir katkı sağlamak, hem de farklı özelliklere sahip yenidoğanların K vitamini öncesi ve sonrası Gas6 değerleri arasında bir fark olup olmadığını ortaya koymak amacı ile bu çalışma planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 80 yenidoğan (40 term, 40 preterm) alınmıştır. Doğumdan hemen sonra alınan kordon kanı örneklerinden ve i.m olarak 1 mg K vitamini uyguladıktan 48 saat sonra alınan periferik venöz kan örneklerinden trombositten fakir plazma elde edildi. Gas6 düzeyleri ELISA (R&D) kiti ile belirlendi.

Bulgular: K vitamini öncesi Gas6 düzeyleri preterm ve term yenidoğanlarda sırasıyla $9,07 \pm 5,30$ ng/ml ve $9,75 \pm 4,34$ ng/ml olarak bulundu. K vitamini sonrası Gas6 düzeyleri preterm ve term yenidoğanlarda sırasıyla $10,50 \pm 5,28$ ng/ml ve $9,12 \pm 3,42$ ng/ml olarak belirlendi. Pretermilerin K vitamini öncesi ve sonrası Gas6 düzeyleri arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,036$). K vitamini öncesi, intrauterin büyüme geriliği (İUBG) olan yenidoğanların Gas6 düzeyi $3,7 \pm 4,32$ ng/ml; İUBG olmayan yenidoğanların Gas6 düzeyi $9,76 \pm 4,71$ ng/ml olarak bulundu. İki grup arasındaki fark anlamlıydı ($p < 0,012$).

Sonuç: Çalışmamızda preterm yenidoğanların K vitamini öncesi ve sonrası Gas6 düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p < 0,05$). Elde edilen bu fark, K vitamini

uygulamasının yanı sıra preterm yenidoğanların endotel bütünlüğündeki bozukluğun da Gas6 düzeyindeki artışa katkısı olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gas6, K vitamini, yenidoğan

2. SUMMARY

Serum growth arrest protein 6 levels before and after vitamin K prophylaxis in term and preterm newborns

Objective: Growth arrest-specific gene 6 (GAS6) was originally found as a gene upregulated by growth arrested fibroblasts in 1988. The protein encoded by this gene is called Gas6 and is 75-kDa molecular weight and consists of 678 aminoacids. Gas6 protein belongs to the family of plasma vitamin K-dependent proteins and is similar to the Protein S with the same domain organization and 44% amino acid identity. It plays an important role at survival and proliferation of many cell types such as endothelial cells, vascular smooth muscle cells, osteoclasts, epithelial cells and fibroblasts. Comprehensive reference value study for Gas6 is studied in adults, but there is not any study in the literature in newborns. Besides contribution to creating serum Gas6 reference values in newborns, we aimed to show the difference between Gas6 levels before and after vitamin K injection in different featured newborn groups, if existing.

Material and Methods: Samples from 80 newborn (40 term and 40 preterm) are studied. Platelet- free plasma was removed from blood samples taken from the cord blood just after the delivery and peripheral veins 48 hours after vitamin K injection. Gas6 levels were identified by ELISA.

Results: Before vitamin K injection, Gas6 levels in preterm and term newborns were $9,07 \pm 5,30$ ng/ml and $9,75 \pm 4,34$ ng/ml respectively. After vitamin K injection, Gas6 levels in preterm and term newborns were $10,50 \pm 5,28$ ng/ml and $9,12 \pm 3,42$ ng/ml respectively. The difference between Gas6 levels before and after vitamin K injection was statistically significant in preterm newborns ($p < 0.036$). Before vitamin K injection, average Gas6 levels in newborns which have intrauterine growth retardation (IUGR) is $3,7 \pm 4,32$ ng/ml. Besides, average Gas6 levels in newborns which are not diagnosed to IUGR is $9,76 \pm 4,71$ ng/ml. This difference between these two groups is statistically significant ($p = 0,012$).

Conclusion: Our study shows that, there is a statistically significant difference in Gas6 levels before and after vitamin K injection in preterm newborns ($p < 0,05$). We think this difference is originated from not only vitamin K injection but also from the defect in endothelial integrity disturbance in preterms.

Keywords: Gas6, vitamin K, newborn

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Growth arrest-specific gene 6 (GAS6) 1988'de büyümesi engellenmiş hücrelerde keşfedilmiş bir gendir (1). Bu genin kodladığı Gas6 proteini 75-kDa molekül ağırlığında, K vitaminine bağımlı protein ailesine en son katılan ve 678 aminoasitten oluşan bir proteindir. %44 aminoasit ortaklığı ile antikoagulan protein S'e yapısal olarak benzer (2). Gas6, reseptör tirozin kinaz ailesinin üyelerinden Sky (Tyro 3), Axl, ve Mer adlı reseptörlerin (TAM reseptörleri) ligandıdır (3,4). Organizmadaki yaygın dağılımına bağlı olarak endotel hücrelerinde, vasküler düz kas hücrelerinde, mezengial hücrelerde, osteoklastlarda, kondrositlerde, Schwann hücrelerinde, epitelyal hücreler ve fibroblastlarda hücre yaşamının devamında ve proliferasyonunda rol oynar (2,5). Gas6, diğer büyüme faktörlerinin etkilerini güçlendirir ve organizmayı TNF- α aracılı apoptozdan korur (2,6). Reseptörleri sayesinde trombosit degranülasyonunu ve agregasyonunu, trombüs formasyonunu artırırken; Gas6 inhibisyonu kanamaya eğilim yaratmadan tromboz oluşumunu engellemektedir (5). İnsanlarda Gas6 proteini dolaşımında düşük düzeylerde bulunur (0,16-0,28 nM) (7). Akut faz reaktanı benzeri işlevi vardır ve sepsis, pankreatit gibi durumlarda düzeyi artar (6,2,7). Gas6'nın nefrotoksik nefrit, romatoid artrit, göğüs kanseri ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok farklı hastalıkla ilişkili olduğuna dair çalışmalar yayınlanmıştır (1,8,9). Literatürde Gas6 referans aralıklarının oluşturulması amacıyla daha önce erişkinlerdeki düzeylerin belirlenmiş olmasına karşın yenidoğanlarda serum Gas6 düzeyi referans aralıkları ile ilgili henüz yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmayı planladığımızda, ülkemizde yenidoğanlarda Gas6 ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlamadık. Bu çalışma hem yenidoğanlara özgü referans değerlerin oluşturulmasına bir katkı sağlamak, hem de farklı özelliklere sahip yenidoğanların K vitamini öncesi ve sonrası Gas6 değerleri arasında fark olup olmadığını ortaya koymak amacı ile yapılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. K Vitamini

4.1.1. K vitamininin yapısı ve biyolojik önemi

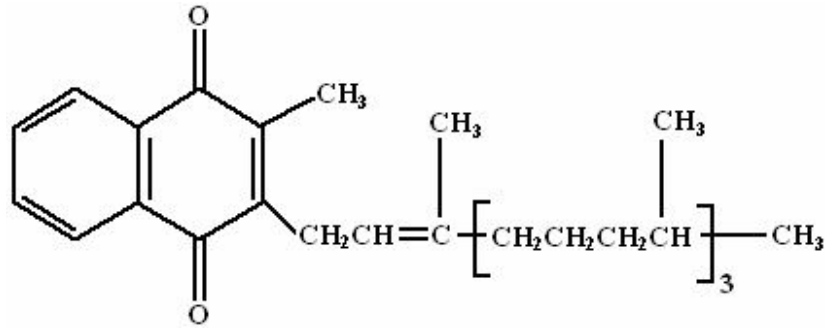
K vitamini, pıhtılaşma proteinlerinin aktif formlarının sentezinde etkili, normal koagülasyonun sağlanmasında hayati öneme sahip yağda eriyen esansiyel bir vitamindir (10).

Danimarkalı bilim adamları Henrik Dam ve Edward Adelbert Doisy 1929 yılında, suni diyetle beslenen civcivlerin bağırsaklarında, deri altı yağ dokusunda ve beyinlerinde kanamalar oluştuğunu saptamışlar. Çalışmalarının sonucunda 1943 yılında K vitamininin doğal şeklini izole ederek Nobel ödülünü almışlardır (10,11). K vitamini, ismini anti-hemorajik faktör olan ve kanı pıhtılaştıran anlamına gelen ‘Koagülan’ kelimesinin baş harfinden almıştır (12).

Naftokinon halkası içeren K vitaminlerinin doğal ve sentetik birçok türü vardır. Yağda eriyen bu vitaminler temel olarak 2-metil-1,4 naftokinon yapısına sahip olup farklı alifatik yan zincirlere sahiplerdir (12).

K₁ ve K₂ şeklinde gösterilen iki doğal K vitamini bulunmakla birlikte K₃ adında bir de sentetik türevi mevcuttur. K₃ vitamini, diğer adıyla menadion, uzun yan zincir içermez. K vitamininin temel yapısı aynı zamanda K₃ vitamininin de yapısıdır (11).

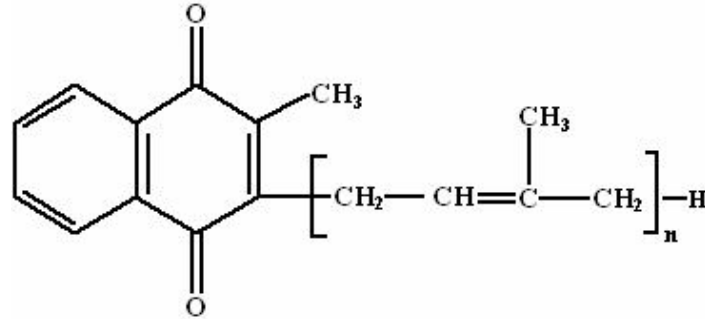
K₁ vitamini (fitonadion, fillokinon), 2-metil-3-fetil-1,4-naftakinon kimyasal yapısına sahiptir ve bitkilerden alınır (Şekil 1) (13). Kapalı formülü C₃₁H₄₆O₂'dir. Molekül ağırlığı 450.68 g/moldür (14,15). Bu vitamin yeşil bitkilerin yapraklarında sentezlenir. K₁ vitamini ıspanak gibi yeşil yapraklı sebzeler, brokoli, brüksel lahanası, kuşkonmaz, lahana, karnabahar, yeşil bezelye, fasulye, yeşil çay, zeytin, zeytinyağı, soya tohumu, et (sığır karaciğeri), yumurta, tahıllar ve mandıra ürünlerinde bulunur (10). Bitkilerde fotosentez ve fosforilasyonda rol oynar (16). K vitamininin doğal formu ve esas kaynağı yeşil yapraklı sebzelerden diyet yolu ile alınan şeklidir. Karaciğerde metabolize olur, safra ve idrarda atılır. K₁ vitamini, K₂ vitamininden daha hızlı ve uzun etkiye sahiptir (10,16).



(2-Metil-3-fetil-1,4-naftokinon)

Şekil 1 : K₁ vitaminin açık yapısı

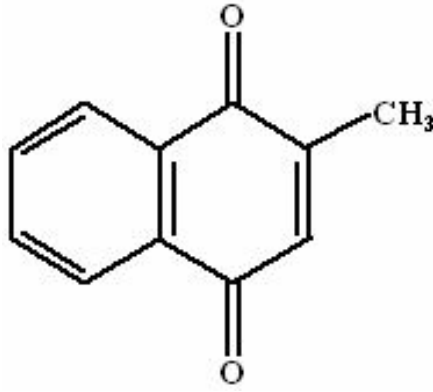
Farklı K₂ vitaminleri, farklı uzunluktaki yan zincirler içerir (Şekil 2). Menakinon (MK) adı verilen K₂ vitaminleri 6, 7 ve 9 izopren birimi taşır yani formüldeki n sayısı 6, 7 ve 9 olabilir. In vitro en etkin şekli MK-4 olarak bildirilmiştir. Fermentasyon yapan mikroorganizmalar ve insanda terminal ileum ve kolonda yerleşmiş olan bağırsak bakterileri (özellikle gram pozitif bakteriler) tarafından sentezlenir (10). Hayvansal yiyeceklerde bulunur. İnsan gereksiniminin daha küçük bir kısmını karşılar. K₁ ve K₂ vitaminleri diyetten emilir. Dihidrovitamin K olarak isimlendirilen aktif formuna dönüşür (10,17). K vitaminleri ışığa duyarlı, ısıya dayanıklıdır. Pişirme vitamini uzaklaştırmaz. Donmuş yiyeceklerde K vitamini tahrip olabilir (10,18).



(2-Metil-3-difarnesil-1,4-naftokinon)

Şekil 2: K₂ vitamininin açık yapısı

K₃ vitamini, sentetik olarak üretilen ve suda çözünen en basit yapılı K vitamini türüdür (Şekil 3) (10). Bundan türeyen menadion sodyum bisülfat ile menadiol sodyum disülfat, menadionun ve yukarıda sayılan doğal vitaminlerin aksine, suda çözünen K vitaminleridir. Bu sentetik K vitaminlerinin etkinliği yağda çözünen doğal K vitaminlerinininkine göre daha düşüktür ve etkileri daha geç başlar. Alerjik reaksiyonlar ve bazı toksik etkilere neden olabilir (10). Yapılan çalışmalarda K₃ vitamininin, değişik kanser hücre serilerinde redoks döngüsüne girerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olduğu ve oluşan olumsuz koşulların hücre çoğalmasını baskılayabileceği belirtilmiştir (19,20,21). ROS oluşumu nedeniyle merkezi sinir sisteminde pek çok hasarın olduğu ve bu olumsuz koşullardan en çok etkilenecek ve zarar göreceği olan hücrelerin nöronlar olduğu bildirilmiştir (22).



(2-Metil-1,4-naftakinon)

Şekil 3: K vitamininin temel yapısı (K₃ vitamini)

4.1.2. K vitamini emilimi

Diyet, K vitamininin ana kaynağıdır. K vitamininin %80-85'i terminal ileumdan emilir (10). Doğal olarak bulunan K vitamini türevleri, tıpkı diğer lipidler gibi sadece safra tuzlarının varlığında emilir ve şilomikronlar içinde lenfatikler yolu ile kan dolaşımına dağıtılır. Suda çözünen menadion safra tuzlarının yokluğunda dahi emilir, doğrudan hepatik portal vene geçer. Yağ absorpsiyonunu bozan durumlar ile yağdan fakir beslenenlerde K vitamini absorpsiyonu azalır. Fakat bu şartlarda sentetik K vitamininin absorpsiyonu bozulmaz (16,23). K vitamini başlangıçta karaciğerde birikse de karaciğer derişimi hızla düşer ve sınırlı bir depolanmaya sahiptir (13).

4.1.3. K vitamininin etkileri

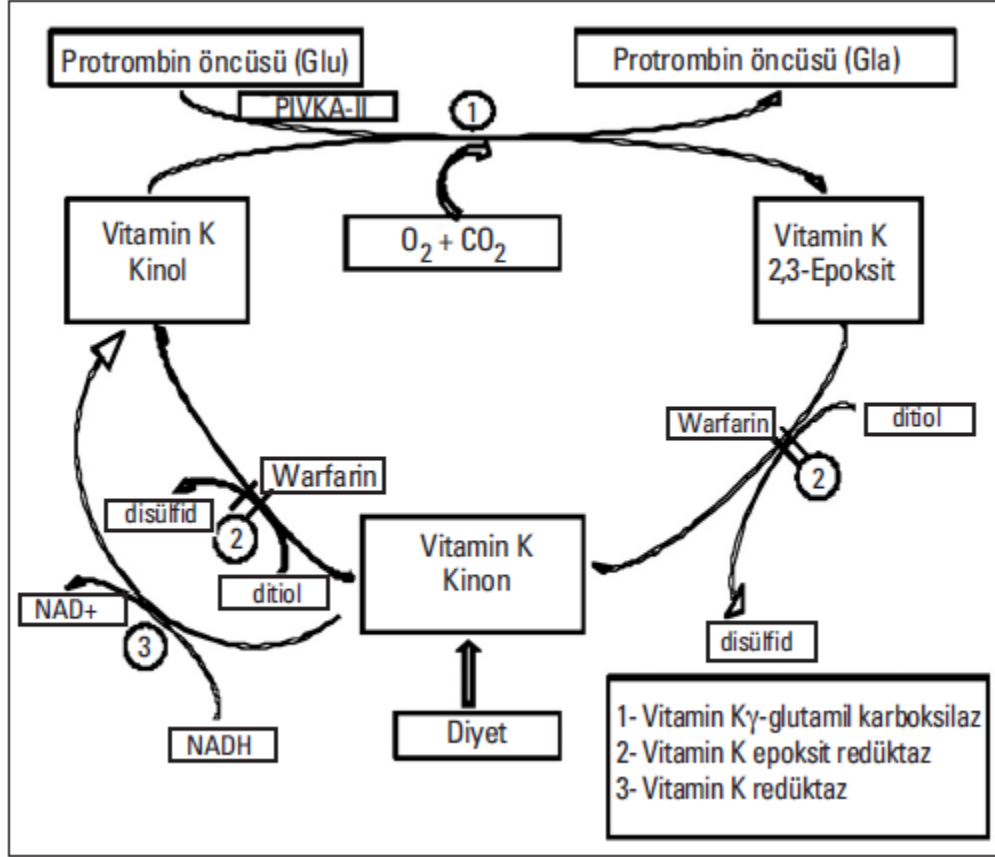
K vitamini insanlarda bulunan bazı proteinlerdeki glutamik asit rezidülerinin post-transkripsiyonel modifikasyonla γ -karboksiglutamik asite (Gla) dönüşmesi için önemli bir kofaktördür. Bu reaksiyon, normal trombotik yolu başlatmak için hayati rol oynar (1,zeynep 1. Lit). K vitamini bağımlı proteinlerin birçoğu koagülasyon kaskatında yer almakta veya bu kaskatı düzenlemektedir. Bir kısmı ise çeşitli sistemlerde görevlidir. Kemik ve diğer dokulardaki kalsiyum homeostazında K vitamini bağımlı proteinler rol oynar (6). K vitamini bağımlı proteinlerin kalsiyum kanalları yoluyla yüzey fosfolipitlerine bağlanmasını sağlar ve pıhtılaşma faktörlerinin aktif formlarının sentezi gerçekleşir. Bu reaksiyon mikrozomal enzimler aracılığıyla K vitamini epoksit döngüsü ile gerçekleşir (Şekil 4) (10,24).

Adenozin trifosfat (ATP) ve biotine gereksinim duyan diğer karboksilasyon reaksiyonlarının tersine K vitaminine bağımlı karboksilaz, karbondioksit ve oksijene olduğu kadar, K vitamininin indirgenmiş formu olan hidrokinona (KH_2) da ihtiyaç duyar (24). Hidrokinon oksitlenerek K vitamini epoksidini meydana getirir. Bu oksidasyon, glutamatın karboksilasyonu için gerekli olan enerjiyi sağlar (24).

K vitamini bu döngüde γ -karboksilaz için bir kofaktör işlevi görerek, glutamik asidin yan zincirine bir molekül CO_2 eklenmesini sağlar (24). K vitamini doğal olarak okside formda bulunur, ancak bu reaksiyonda K vitamininin indirgenmiş formu gerekmektedir. Vitamin K epoksit redüktaz (VKOR) enzimiyle katalizlenen bir reaksiyonla, K vitamininin indirgenmiş formu oluşur. Karboksilasyonun bu basamağında K vitamini oksitlenir ve döngü bu şekilde devam eder. Varfarin ve kumarin, VKOR ile etkileşime girerek karboksilasyonu baskılar (25).

K vitamini bağımlı proteinler kan pıhtılaşmasına sınırlı değildir. Hücre siklus regülasyonu ve hücre-hücre adezyonu (tirozin kinaz) için de önemlidir. Kanser gelişiminde tirozin kinaz aktivasyonu önemlidir (10,25). K vitamini yokluğunda, K vitamini yokluğu proteini (protein induced by vitamin K absence: PIVKA) meydana gelir. PIVKA üreten pankreasın hepatoid

karsinoması da tanımlanmıştır. PIVKA-II protrombinin karboksile olmamış formudur ve K vitamini eksikliğinin tanısında kullanılabilir (10).



Şekil 4: K vitamini epoksit döngüsü

Koagülasyon proteinleri dışında birçok K vitamini bağımlı protein kemik, kıkırdak, böbrek, akciğer ve diğer dokularda da bulunur. Bunlar arasında kemik proteini olan osteokalsin ve matriks Gla proteini iyi bilinmektedir (26). Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenen en önemli non-kollajenöz kemik proteindir ve kemik gelişiminde önemli rol oynar. K vitamini eksikliğinde artmış fraktür riski vardır (26,27). K vitaminine bağımlı koagülasyon faktörleri karaciğerde sentezlenir ve dolaşıma salınır (27).

4.1.4. K vitamini eksikliği

K vitamininin besin olarak kullanılan bitki ve hayvan dokularında çok yaygın bulunması ve bu vitaminin bağırsak mikroflorası tarafından sentezlenmesi nedeniyle erişkinlerde eksikliği fazla görülen bir durum değildir (13). Pankreas işlev bozukluğu, safra hastalığı, bağırsak mukozasının atrofisi veya herhangi bir nedenden dolayı oluşan steatore nedeniyle yağ malabsorbsiyonuna bağlı K vitamini eksikliği görülebilir. Buna ek olarak, kalın bağırsağın antibiyotiklerle steril hale getirilmesi, besinle alımı kısıtlı olması halinde K vitamini eksikliği olabilir (13). Öte yandan yenidoğan bebekler plasentanın vitamini fetusa etkin şekilde aktarmaması ve bağırsağın doğumdan hemen sonra steril olması nedeniyle bu eksikliğe çok yatkındır (13).

Yenidoğanın hemorajik hastalığı ilk defa 1894 yılında Townsend tarafından tanımlanmıştır . Yenidoğan ve sütçocukluğu döneminde pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX ve X'u karaciğerde gama karboksilasyonla aktive eden K vitamininin eksikliğinde yenidoğanın hemorajik hastalığı oluşur (28). K vitamini eksikliğine bağlı kanamalar üç tipte görülür:

- a) Erken tip: İlk 24 saat içinde ortaya çıkar. Difenilhidantoin veya fenobarbital kullanan epileptik anne çocuklarında ve daha sık olarak izoniazid veya rifampisin ile tedavi edilen tüberkülozlu anne çocuklarında görülür. Bu tipte intrakranyal kanama sıklığıdır (28).
- b) Klasik tip: K vitaminin plasental geçişi azdır. Tüm yenidoğanlarda doğumdan sonra 48-72. saatlerde faktör II, VII, IX ve X'da hafif bir azalma vardır ve 7.-10. günlerde normal düzeye erişir. Bunun nedeni bağırsak florasının gelişmemiş olmasıdır. Anne sütü ile beslenen bebeklerde menakinon üretmeyen laktobacillus bifidus florası hâkimdir. Ayrıca anne sütündeki K vitamini düzeyi 1 µg/L iken, formül mamalarda daha fazla olabilmektedir. Bu nedenle klasik hemorajik hastalık riski anne sütü ile beslenenlerde ve ağızdan beslenmesi iyi olmayan bebeklerde artar (28).

- c) Geç tip: İlk haftadan sonra ve genellikle 2.-12. haftalarda görülür, bazen 6 aya kadar uzayabilir. Genellikle intrakraniyal kanama Őeklinindedir. Anne sütünün yetersiz K vitamini içermesi, yetersiz K vitamini profilaksisi, K vitamini malabsorpsiyonuna neden olan kolestatik karaciğer hastalıkları (kistik fibroz, koledok kisti, alfa-1 antitripsin eksikliği) ve antibiyotik kullanımı nedeniyle geliŐmektedir. 4-10/10000 sıklıkta ve Güney Doğu Asya'da daha sık görülmektedir (28,29).

K vitamini eksikliğine bağlı intrakraniyal kanama çoğunlukla hiçbir uyarıcı belirti olmadan, aniden geliŐebilmektedir. Hastalar sıklıkla solukluk, konvülziyon, bilinç bulanıklığı, kusma veya emmede azalma, ishal, n fontanelde bombelik ve pulsasyon gibi semptomlarla baŐvurmaktadır. K vitamini eksikliği olgularında PT, aPTT'de uzama ve normal trombosit sayısı saptanır. Yenidoğanın hemorajik hastalığı için zgn bir test olmamasına rağmen, K vitamininin intramusküler (i.m) veya intravenöz (i.v) verildikten 24 saat sonra PT ve aPTT'nin normale dönmesi bu tanıyı doğrular (28).

4.1.5 K vitamini profilaksisi

K vitamini eksikliğine bağlı kanamalardan korumak için doğumda profilaktik K vitamini uygulanması önerilmektedir (29,30). Amerikan Pediatri Akademisi (AAP) de doğumda 1 mg K vitamini i.m olarak önermektedir. K vitamininin i.m uygulanmasının lokal travma, damar, sinir zedelenmesi, apse, osteomyelit ve kanama gibi komplikasyonlara ender olarak da yol aması oral tedavi uygulanmasını gündeme getirmiŐtir. Oral tedavi için ise AAP doğumda 2 mg uygulayıp, ikinci dozu ikinci, üçüncü dozu ise dördüncü haftada önermektedir.

Pek çok çalışmada tek doz K vitamininin i.m kullanımının kas dokusunun yavaŐ salınan K vitamini deposu olması nedeniyle klasik ve geç tipi önlemede yeterli olduğu, tek doz oral tedavinin ise klasik tipe etkili olduğu dŐnlmektedir . Lopez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada oral yolla uygulanan K vitamini profleksisinin i.m. uygulanan K vitaminine üstünlüğü gösterilememiŐtir (31).

Alternatif bir kullanım şekli ise 25 µg/gün olmak üzere verilen profilaksidir, ancak etkinliği tartışmalıdır. Danimarka ve Hollanda'da bilier atrezili vakaların retrospektif olarak değerlendirildiği bir çalışmada, farklı K vitamini profilaksisi uygulanmış hastalar karşılaştırılmıştır. Danimarka'da 2000 yılına kadar her bebeğe doğumda 2 mg oral K vitamini tek doz uygulanmakta, ancak yalnızca anne sütü ile beslenenlere haftalık 1 mg oral K vitamini anne sütü beslenmenin % 50'sinden fazla olduğu sürece önerilmekte, komplike doğumlarda K vitamini 2 mg i.m uygulanmakta iken, 2000 yılından sonra tüm bebeklere doğumda 2 mg oral K vitamini uygulamasına geçilmiştir (32). Hollanda'da ise 1990'dan beri doğumda 1 mg oral profilaksi ve anne sütü ile beslenenlere 25 µcg/gün K vitamini 12 hafta boyunca önerilmiştir. K vitamini eksikliğine bağlı kanamaların en sık bu grupta olduğu görülmüş, i.m K vitamini ve haftalık oral K vitamini alanlarda daha az sıklıkta, formula ile beslenenlerde ise en az kanama riski görülmüştür (32).

4.1.6. K vitaminine bağımlı proteinler

K vitamini, K vitaminine bağlı proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonunda bazı glutamik asit rezidülerinin γ - karboksiglutamik aside (Gla) dönüşümünü sağlayan enzimatik reaksiyonun kofaktörüdür (33). K vitamini bağımlı proteinlerin karboksilasyonu hemostazın sağlanmasın, kemik metabolizması, büyümenin devamı ve sinyal iletimi için gereklidir. Karboksilasyona uğrayan proteinlerde kalsiyum bağlanması meydana gelir ve proteinin üç boyutlu yapısı değişir. İki fosfolipit katmanından oluşan Gla bölgesine hidrofobik kalıntılar eklemesiyle proteinler biyolojik olarak aktive olurlar. Aktivasyon sırasında fosfatidil serin, membranın dış yüzeyine çıktığı için koagülasyon proteinlerinin bağlanmasını kolaylaştırır. Hemoztazda görevli olan Gla-proteinler protrombin, faktör VII, faktör IX, faktör X, protein C, protein S ve Z'dir (33).

K vitamini bağımlı Gla-proteinlerinden diğerleri kemik metabolizmasında [bone gla protein (BGP) ve matriks gla protein (MGP)], büyümede [growth arrest specific protein-6 (gas6)] ve sinyal iletiminde [proline-rich gla protein (PRGP-1 ve PRGP-2)] yer alır. Ayrıca fonksiyonu tam olarak bilinmeyen protein Z de Gla-proteinlerindedir (34).

4.1.6.1. Protrombin

Koagülasyonda görevli trombinin öncülü olan protrombin diğer K vitamini bağımlı proteinler gibi karaciğerde sentezlenir. 72 kD ağırlığındadır. Plazma yarı ömrü yaklaşık 60 saattir. Referans aralığı %70-120'dir. Protrombin geni 11. kromozomda 11p11-q12 lokusunda bulunur (13).

Protrombin fonksiyonel ve yapısal olarak 2 bölgeye ayrılabilir: Gla taşıyan pro kısmı ve trombine dönüşen kısım. Pro kısmı 274 amino asitten meydana gelmiştir ve molekül ağırlığı 35000' dir. 77 ve 101 numaralı asparajine bağlı olarak 2 oligosakkarit zinciri taşır. Pro kısmında yapısal olarak birbirine benzeyen fakat fonksiyonel olarak farklı olan 2 bölge vardır; protrombin fragman 1 ve 2. Bu iki bölge birbirine çok benzer şekilde üç disülfid bağı taşır. Her biri ilmiğe benzediği için, bu bölgeye ilmik (kringle) adı verilir (33).

Protrombin 20210 GA gen mutasyonu protrombin düzeyinde artışa neden olur (35). Konjenital faktör II eksikliği, K- vitamini antagonist tedavi, karaciğer hastalığı, masif kan transfüzyonu, disemine intravasküler koagülasyon (DİK) gibi durumlarda protrombin düzeyinde azalma gözlenir.

4.1.6.2. Faktör VII

Faktör VII (FVII) N-terminal bölgesinde 2 adet epidermal büyüme faktörü benzeri bölge (epidermal growth factor-like: EGF1 ve EGF2) ve γ -karboksi glutamik asit (hafif zincir); C-terminalinde ise proteaz bölgesi (ağır zincir) içerir. Faktör VII, birbirine bir disülfid köprüsüyle kovalent bağlı, bir ağır zincir ve bir hafif zincirden oluşmuştur (36). Molekülün ağır zinciri aktif bölgeyi içerir. FVII aktive olarak FVIIa molekülüne dönüşür. Bu proteinin koagülasyon aktivitesi, doku faktörü ve kalsiyum varlığında görülür. Koagülasyon sırasında FVII, faktör X (FX) ve faktör IX (FIX)'u aktive eder. FIX ve FX, FVII ile yapısal olarak benzerlik gösterir (36).

4.1.6.3. Faktör IX

Tek zincirli bir glikoprotein olan faktör IX (FIX), Gla, kısa hidrofobik bir parça, 2 adet EGF benzeri bölge, aktivasyon gösteren peptid bölgesi ve 1 serin proteaz modülü içerir. FIX'un aktive olması sonucunda Arg-Ala ve Arg-Val arasındaki bağlarda proteolitik reaksiyon meydana gelir ve 35 aminoasit kalıntısı uzunluğunda aktivasyon peptidi serbestleşir (zeynep 60,61). FIXa tek bir disülfid bağı ile birbirine bağlanan biri hafif diğeri ağır zincirden oluşur (zeynep 63). Hafif zincir Gla, EGF1 ve EGF2 bölgelerini; ağır zincir serin proteaz bölgesine sahiptir (36).

4.1.6.4. Faktör X

Faktör X (FX) ~59,000 moleküler ağırlıktadır. Disülfid bağı ile kovalent olarak birbirine bağlanan bir ağır biri hafif olmak üzere 2 zincirden oluşur. Faktör X, intirinsik ve ekstrinsik koagülasyon yollarının kesiştiği noktada aktive olur (13). Ağır zincirdeki tek bir peptid bağının (Arg-194-Ile-195) ayrılmasıyla, aktif şekli olan faktör Xa oluşur . Ağır zincirdeki bu bölünme ya intrinsik tenaz kompleksi (faktör IXa-faktör VIIIa) ya da ekstrinsik tenaz kompleksi (doku faktörü-faktör VIIa) tarafından katalizlenir (13). NH₂ terminal kısmındaki hafif zincirde 11 Gla kalıntısı vardır ve Gla bölgesini birkaç aromatik kalıntı ve 2 EGF takip eder. Ağır zincir serin proteaz bölgesini içerir, aktif olan kısımdır (36).

4.1.6.5. Protein C

Protein C 62000 molekül ağırlığında bir serin proteazdır (37,38). Disülfid bağıyla kovalent olarak bağlı bir ağır zincir ve bir hafif zincirden oluşmuştur. Hafif zinciri 11 Gla içerir. Protein C, ağır zincirindeki tek bir peptid bağının (Arg -169-Ile-170) kopmasıyla, aktif formu olan, aktive protein C'ye (APC) dönüşür. Bu bölünme, trombin-trombomodulin kompleksi tarafından katalizlenir (37). APC'nin N-terminal bölgesinde Gla ve EGF bulunur. APC, koagülasyon kaskatında prokoagülan faktör V ve FVIII'in proteolitik inaktivasyonunda görev olarak antikoagülan özellik gösterir. Ca⁺², Protein S ve fosfolipitler bu olayı destekler (37). Diğer yandan, APC'nin trombini "down" regüle ederek TAFI (trombinle aktiflenen fibrinolitik

inhibitör) aktivasyonunu baskılar, böylece dolaylı yoldan fibrinolizisi sağlar. Fibrinolizis, APC'nin PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitörü-1)'i inhibe etmesiyle de uyarılır. APC'nin, pıhtılaşmayı önleyici etkileri yanında, enflamasyon önleyici ve hücre koruyucu etkileri gibi farklı biyolojik etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir (37).

4.1.6.6. Protein S

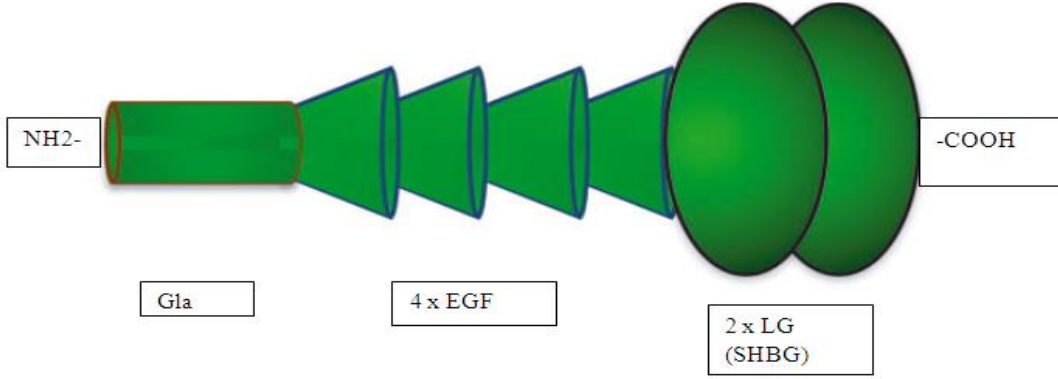
K vitamini bağımlı proteinlerden biri olan protein S tek zincirli bir plazma glikoproteinidir (39). İnsan plazmasında yaklaşık 1 µg/ml konsantrasyonunda bulunur (40). İnsan ve sığır plazmasından saflaştırılan protein S'in aminoasit yapısı incelenmiştir. K vitamini bağımlı pıhtılaşma faktörlerinin aksine protein S'in serin proteaz fonksiyonu yoktur; aktive protein C'nin kofaktörü olarak fonksiyon görür (39). Bu kompleks trombin aktivasyonunda görevli faktör Va ve VIIa'yı inaktive eder. Bu yüzden protein S, pıhtılaşma kaskadının inhibisyonunda görevlidir. Protein S karaciğer, endotel hücreleri, testiküler hücreler, megakaryosit ve osteoblastlarda sentezlenir. Bu protein, ayrıca trombositlerde de mevcuttur. Protein S dolaşımında bir bölümü plazmada serbest olarak; diğer kısmı ise kompleman sisteminden C4 bağlayıcı proteine (C4BP) SHBG bölgesi ile bağlı olarak 2 şekilde bulunur. Protein S'in kompleman sistemindeki rolü tam olarak bilinmemesine rağmen 2 proteaz sistemi (kompleman ve koagülasyon) ile de ilişkilidir. Kalıtsal protein C ve protein S eksikliği olan hastalarda venöz tromboza eğilim artar (39,41).

%44 aminoasit ortaklığı ile antikoagülan protein S ve Gas6 yapısal olarak benzer. Her iki protein de amino ucuna bağlı yaklaşık 60 amino asitten oluşan Gla bölgesine sahiptir. Her 2 protein de Tyro3, Axl ve Mer (TAM) reseptörlerinin ligandlarıdır (1,3).

4.2. Gas6 Proteini

4.2.1. Gas6 proteininin yapısı

Gas6 “Growth arrest-specific gene 6” 1988’de büyümesi engellenmiş hücrelerde keşfedilmiş bir gen dir (1). Bu genin kodladığı Gas6 proteini 75-kDa molekül ağırlığında, K vitaminine bağımlı protein ailesine en son katılan ve 678 aminoasitten oluşan bir proteindir. %44 aminoasit ortaklığı ile antikoagülan protein S’e yapısal olarak benzer (2). Her iki protein de amino ucuna bağımlı yaklaşık 60 amino asitten oluşan Gla bölgesine sahiptir. Bu bölge K vitaminine bağımlı γ -karboksilasyon ile aktive olan glutamik asit rezidüleri içerir. Apoptotik hücrelerin fagositozunda in vivo olarak önemli role sahip Gas6 ve protein S’in fonksiyonlarında Gla bölgelerinin fosfatidilserini bağlaması önemlidir. Gla bölgesini 4 adet EGF ve onları da seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) ile ilişkili olan 2 laminin G bölgesi izler. (Şekil 5) SHBG bölgeleri TAM reseptörlerinin bağlanması ve aktivasyonu için gereklidir (1,3).



Şekil 5: Gas6 ve protein S'in yapısal organizasyonu. Her 2 protein de tekrarlayan γ -karboksiglutamik asit rezidüleri(Gla) içeren N-terminali, 4 EGF-benzeri yapı ve 2 globuler LG bölgesi(SHBG) içeren C-terminalinden oluşur (1).

İnsanlarda Gas6 proteini dolaşımında düşük düzeylerde bulunur (0,16-0,28 nM) (7). Akut faz reaktanı benzeri işlevi vardır ve sepsis, pankreatit gibi durumlarda düzeyi artar (2,6,7). Gas6, reseptörlerine bağlanarak hücre içinde bir çok sinyal mekanizmalarını uyarır. [PI3K (fosfatidilinozitol 3-kinaz), RAS, mitojen tarafından aktiflenen protein kinaz (MAPK), SRC, PLC, ERK] . Proliferasyonu artırır ve hücre ömrünü uzatır (2).

Yapılan alışmalar u kısımları koparılmış Gas6 ve sadece C-terminal globüler tekrarlarına sahip olarak geliştirilen Gas6'nın da reseptörlerin aktivasyonunda yeterli olabildiğini göstermiştir. Bu nedenle Gas6'nın N-terminal bölgesinin -karboksilasyonda, C-terminal bölgesinin ise biyolojik aktivitesinde önemli olduğu kabul edilir (5). C-terminalindeki kalsiyum bağlayıcı kısım ve hidrofobik kısım Gas6'nın reseptörü ile ilişkisinde rol oynar. Hidrofobik kısım üzerinde meydana getirilen çeşitli mutasyonlar sonucunda reseptöre bağlanma azalır. Bu yüzden Gas6'nın reseptör bağlayıcı kısmının LG₂ bölgesindeki hidrofobik alan olduğu kabul edilir (5).

Fisher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada LG₁ bölgesindeki hidrofobik kısmın da ikinci reseptör bağlayıcı bölge olarak çalıştığı gösterilmiştir. Ayrıca Gas6'daki farklı bir peptid sekansının kalsiyum bağlayıcı kısım dışında LG₁ bölgesi üzerinde nötralizan monoklonal antikör olarak yer aldığı gösterilmiştir (5).

Protein S ve Gas6'nın benzer bölgeleri Gla ve EGF bölgeleridir. Protein S düz kas hücreleri için güçlü mitojen özellikte olması ve aralarındaki benzerlik nedeniyle Gas6'nın da hücre proliferasyonunda etkili olduğu düşünölmektedir (42).

Gas6 ve protein S'in her ikisi de TAM reseptör ailesini oluşturan Tyro3, Axl ve Mer reseptörlerinin ligandıdır ve agonisti olarak görev yaparlar. Gas6, TAM reseptörlerine karboksi ucundeki globüler bölge ile bağlanarak otofosforilasyon ile aktivasyonlarını sağlar (41). Gas6 nin bu üç reseptöre bağlanma afinitesi sırasıyla $Axl \geq Tyro3 \geq Mer$ şeklindedir (4).

Gas6 trombositlerin alfa granüllerinde bulunur (41). Trombositlerin aktivasyonu ile hücre yüzeyine çıkar. Gas6 plazma, makrofaj, bazofil, nötrofil veya perifik kanda dolaşan lenfositlerde genellikle bulunmaz. Patolojik durumlarda enflamasyon alanında, vasküler hasarda ve aterosklerotik plaklarda vasküler düz kas hücrelerinde Gas6 "up" regölasyona uğrar. Organizmadaki yaygın dağılımına bağlı olarak endotel hücrelerinde, vasküler düz kas hücrelerinde, mezengial hücrelerde, osteoklastlarda, kondrositlerde, Schwann hücrelerinde, epitelyal hücreler ve fibroblastlarda hücre yaşamının devamında ve proliferasyonunda rol

oyunar (2). Gas6, vasküler düz kas hücreleri için kemotaktik özelliğindedir (5). Trombosit sayısının artışında önemlidir (41). Gas6 düzeyi düşük olan trombositler, düşük konsantrasyondaki agonistlerine cevap veremezler. Bunun sonucu olarak Gas6-negatif transgenik farelerde hem venöz hem de arteriyel tromboza eğilim azalır. Aynı şekilde Gas6 reseptörlerinde herhangi birinin yokluğunda da trombosit agregatlarının stabilizasyonu bozulduğu için tromboza karşı doğal bir koruma sağlanır. Gas6 proteini ve TAM reseptörlerinin sentezi engellenen farelerde kanama süresi doğal tip farelere göre daha uzun bulunmuştur (41). Fakat insanlarda bu durum biraz daha farklıdır. Sensitif bir ELISA metodu kullanılarak insan plazmasında ölçülen Gas6 subnanomolar düzeydedir (0,16-0,28 nM) ve insan trombositlerinde Gas6 henüz ölçülemediği. Bu yüzden insanlarda Gas6'nın trombotik süreçteki rolü aydınlatılamamıştır. Bir grubun yaptığı revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizinde insan trombositlerinde Mer sentezi gösterilmiştir (41). Eğer insanlarda da Gas6 ve tromboz arasında anlamlı bir ilişki varsa, Gas6'nın trombosit dışındaki diğer kaynaklardan olaya dahil olduğu düşünülmektedir.

Gas6 erken embriyonel dönemle hücre siklusun başlamasında rol oynar (3). Gas6 düşüklüğü fertilizasyon başarısını olumsuz etkiler Gas6 sinyalizasyonu sitoplazmik matürasyon için önemlidir, nükleer matürasyonla ilgisi yoktur. Germinal vezikül ve M₂ oositlerde Gas6 transkripsiyonu fazladır. 2 ve 4 hücreli embriyo döneminde azalır; 8 hücreli blastosit embriyo evresinde tekrar artar (3).

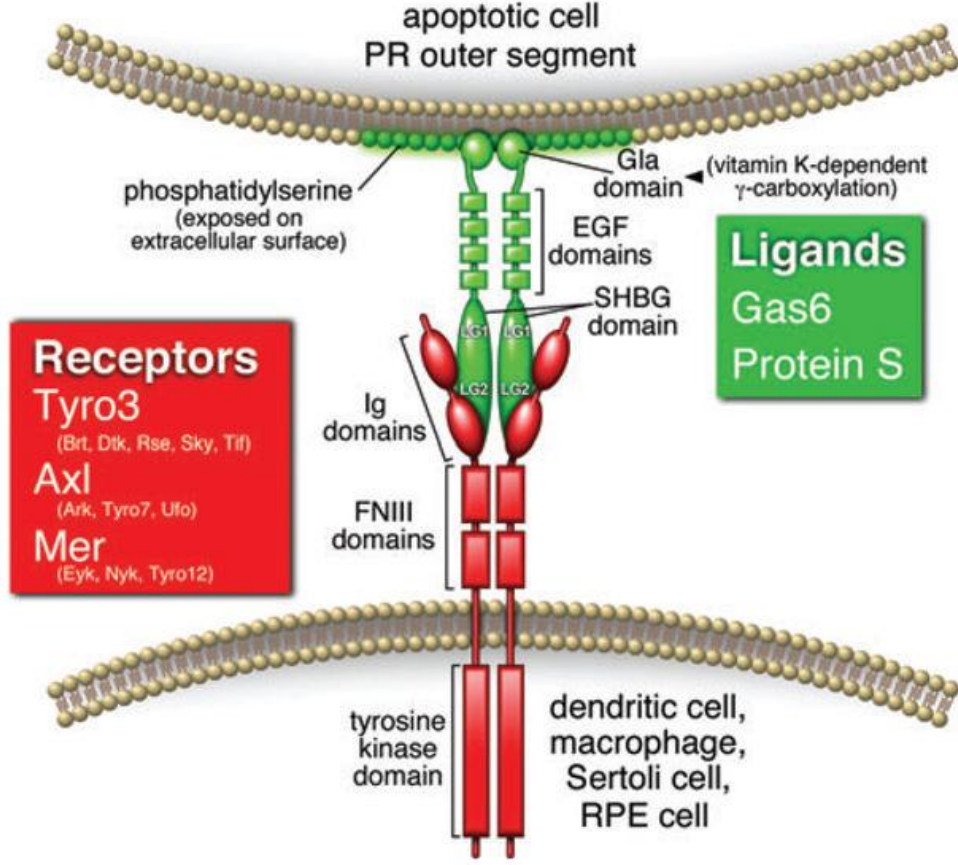
Gas6'nın büyüme ve hücre canlılığının sürdürülmesinde rolü vardır. Hücrelerin farklılaşmasını, fagositoz görevini sürdürmesini sağlar ve apoptozu engeller. Fosfatidilserine bağlanarak apoptotik hücrelerin fagositozunu kolaylaştırır (1). Axl reseptörü ile etkileşim sonucunda hücre migrasyonunu uyarması ve hücrelerarası adezyonda oynadığı rol nedeniyle büyüme faktörü benzeri görevleri olduğu anlaşılır. Gas6, vasküler düz kas hücrelerinde *scavenger* (çöpçü) reseptör sentezinin artırarak aterosklerozda rastlanan köpük hücre oluşumuna katkıda bulunur (1).

4.2.2. Gas6 reseptörleri (TAM Reseptörleri)

Tirozin kinaz reseptörleri (RTK) sitoplazmik uzantıları protein tirozin kinaz aktivitesine sahip olan transmembran reseptörlerdir. Ekstraselüler ligandı ile bağlanması sonucu dimerize olur ve aktiflenir. RTK aktivasyonu, reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle başlar. Fosforilasyon sonrasında hücre fizyolojisinde çeşitli değişiklikler meydana gelir (4).

İnsanlarda RTK'lar ekstraselüler bölgelerindeki ortak aminoasit sekanslarına ya da yapısal benzerliklerine göre 20 subgruba ayrılır (1). Bu subgruplardan biri olan TAM reseptörleri (Tyro3, Axl ve Mer) 1991 yılında tanımlanmıştır. TAM reseptörleri, hücre dışındaki N-terminal ucunda 2 adet immunglobulin (Ig) benzeri bölgeye ve 2 adet fibronektin III benzeri bölgeye sahiptir (Şekil 6). Bu bölgeler bir transmembran bölüm ile sitoplazmik tirozin kinaz bölgesine bağlanır (4,43).

TAM reseptörleri immün sistem, merkezi sinir sistemi, üreme sistemi ve kardiyovasküler sistemde yaygın olarak sentezlenir. TAM reseptörleri trombüs stabilizasyonunda, eritropoezde ve trombosit fonksiyonunda etkilidir. TAM reseptörlerini sentezleyen birçok hücre ligandlarını da sentezler. Diğer RTK'lardan farklı olarak TAM ailesinin üyelerinin sentezi postnatal dönemde artış gösterir ve erişkin döneme gelindiğinde en yüksek değerlerine ulaşırlar. TAM reseptörlerini kodlayan cDNA'ların tümör hücrelerinde daha fazla klonlandığı kanıtlanmıştır. TAM reseptörlerinden özellikle Axl'in kanser progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. TAM reseptör sinyalizasyonunun multipl skleroz (MS) etiyolojisinden ve patogenezesinden sorumlu olabileceğine dair kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır (44).



Şekil 6: TAM reseptörleri ve ligandları

TAM reseptörleri olmayan “knock-out” transgenik farelerin üretildiği bir çalışmada, farelerin yenidoğan döneminde fotoreseptörlerinin apoptoza uğradığı; 2-3 aylık olduklarında ise hiç fotoreseptörleri kalmadığı gözlenmiştir. Aynı farelerin doğumdan sonraki 3. haftada germ hücre sayılarında azalma belirgindir. Her ne kadar ayrı olaylar gibi gözükse de bu iki dejeneratif olay, TAM reseptörlerinden yoksun örneklerde apoptotik hücre ve membranlarının fagositozunun düzgün yapılmamasının bir sonucudur (4).

Axl, 1991 yılında 2 kronik myeloid lösemi hastasında transfümik bir genin ürünü olarak izole edilmiştir. Axl ismi Yunanca’da kontrol edilemez anlamına gelen ‘anaxelektro’ nun kısaltmasıdır (1). Vertebraların evrimi boyunca Axl geni korunmuştur. Axl geninin aminoasit sekansı intraselüler tirozin kinaz bölgesi olan tip-I transmembran proteinini oluşturur.

Epitelyal, mezenkimal ve hematopoetik hücrelerin de dahil olduğu vücudun birçok yerinde sentezi olur; fakat lenfosit ve granüositlerde sentezlenmez. Farelerin gelişimi sırasında Axl (*ark* olarak bilinir) sentezi 12,5. günden itibaren birçok dokuda gözlenir. Stres altındaki endotelyal hücrelerde, tümör anjiyogenezindeki proliferasyon sırasında ve hasar sonrasındaki vasküler remodelling safhasında Axl sentezindeki artış belirgindir (1). Axl'in fazla sentezi glioma ve böbrek kanseri için kötü prognoz göstergesidir (7). Axl sinyalizasyonu fagositozda etkili bir rol oynamaktadır. Axl delesyonu sonucunda fagositozun %50 azaldığı *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (1).

Tümör hücrelerinde Axl sinyalizasyonu hücreyel invazyon ve migrasyonunda önemli role sahiptir. Düşük metastatik potansiyele sahip kanser hücrelerinde Axl'in sentezinin artması sonucunda migrasyon ve invazyon yetenekleri artar (1). Axl sinyalizasyonunun engellenmesi ile metastatik tümör hücrelerinin migrasyonunun engellendiği *in vitro* olarak gösterilmiştir. Axl reseptörünün meme ve glioma tümör modellerindeki invazyon ve metastazdaki rolü son yıllarda *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir.

Normal epitel hücrelerinde Axl sentezi hiç yokken; over tümörlü olguların epitel hücrelerinin %73'ünde Axl sentezine rastlanmıştır. Bu çalışma ile over tümörlerinde Axl reseptörü normal over epiteline göre anlamlı düzeyde fazla sentezlendiği kanıtlanmıştır (43).

Tip2 over tümörlerinde Axl sinyalizasyonu tümörün agresifliği ile koreledir. Metastatik over kanseriyle ilgili yapılan fare deneylerinde plazmada çözülmüş olarak bulunan Axl (sAxl) tedavisi sonucunda tümör yükünde %63 azalma elde edilmiştir (43).

1994 yılında TAM ailesinden Axl'e benzer yapıda olan Tyro3 (Sky geni) izole edilmiştir. Brt, Rse, DTK, Tif, Sky ve Tyro3 diye çeşitli şekillerde isimlendirilir (1). İnsan Tyro3 proteininin genomik yapısı Axl ile benzerdir. Axl'de olduğu gibi embriyonik dönemin 14. gününden doğuma kadar Tyro3 sentezi belirgindir. Tyro3 ekspresyonunun özellikle beyinde fazla olması Tyro3'ün merkezi sinir sisteminin büyüme ve gelişmesindeki önemini vurgular (1). Erişkin böbrek, testis ve overlerinde Tyro3 düzeyleri yüksektir. İnsan pulmoner arter endotel hücrelerinde Tyro3 sentezinin olması vasküler reaktivite ve remodellingde rolü olduğunu

düşündürür. Kemikteki osteoklast hücrelerindeki yüksek bulunan Tyro3 düzeyleri kemik resorpsiyonunda uyarıcı rolünün olduğunu vurgular (1).

TAM ailesinin son üyesi olan Mer'in protoonkogenik ortolog geni olan c-eyk, ilk olarak tavuklarda tanımlanmıştır. Bu ortolog gen kuşlara özgü bir retrovirus ile benzerlik gösterir (1). Aynı şekilde insan protoonkogeni klonlanmış ve c-mer (MERTK geni) olarak adlandırılmıştır. Mer mRNA normal periferel dolaşımdaki monositlerde ve kemik iliğinde bulunabilir; fakat normal B ve T lenfositlerinde bulunmayıp sadece neoplastik özellik gösteren B ve T lenfositlerinde sentezlenmeye başlar (1).

Axl ve Mer, dendridik hücrelerde en çok eksprese edilen TAM reseptörleridir. Apoptotik hücrenin fagositozu için gerekli olan kaskat Mer reseptörünün otofosforilasyonu ile başlatılır. TAM reseptör tirozin kinaz aktivasyonu yokluğu veya yetersizliğinde efektif bir TAM-aracılı fagositoz olmaz (1).

TAM ailesi üyeleri olan Mer, Axl ve Tyro3, apoptotik hücrelerin monosit aracılı fagositozunda önemlidir. Hayvan modellerinde Mer reseptörünün fonksiyonunun homolog rekombinanlar kullanılarak engellenmesi sonucunda ilerleyici görme kaybı ve rod hücrelerinin dış segmentlerindeki apoptotik hücrelerin retinal pigment epitel hücreleri tarafından temizlenememesine bağlı retinal hasar meydana gelir (45). Makrofajların apoptotik hücreleri etkin olarak temizlemesi ve normal fonksiyonlarını sürdürmesi için Mer'e ihtiyaç duyarlar. Mer reseptörü olmayan farelerde apoptotik hücrelerin temizlenmesi bozulur. Mer, Axl ve Tyro3 reseptörlerinin üçünün de olmadığı mutantlarda bir çok dokuda apoptotik hücrelerin temizlenememesine bağlı olarak SLE benzeri ağır otoimmün hastalıklar gelişir. Mer reseptörü olmayan transgenik farelerin incelenmesi sonucunda Mer sinyalizasyonunun intraselüler ortamda fagositik sinyali başlattığı anlaşılmıştır (1,45).

Membrana bağlı olarak bulunan reseptörler plazma çözünmüş olarak bulunan reseptörlerin üretiminden sorumludur. Bu üretim reseptörün transmembran parçasının alternatif mRNA *splicing* i sayesinde reseptörün plazmaya salınması ile gerçekleşir. Çözünmüş halde bulunan reseptörler tam boyuttaki proteinlerden kopan parçalardır ve bu parçalar, reseptörlerin

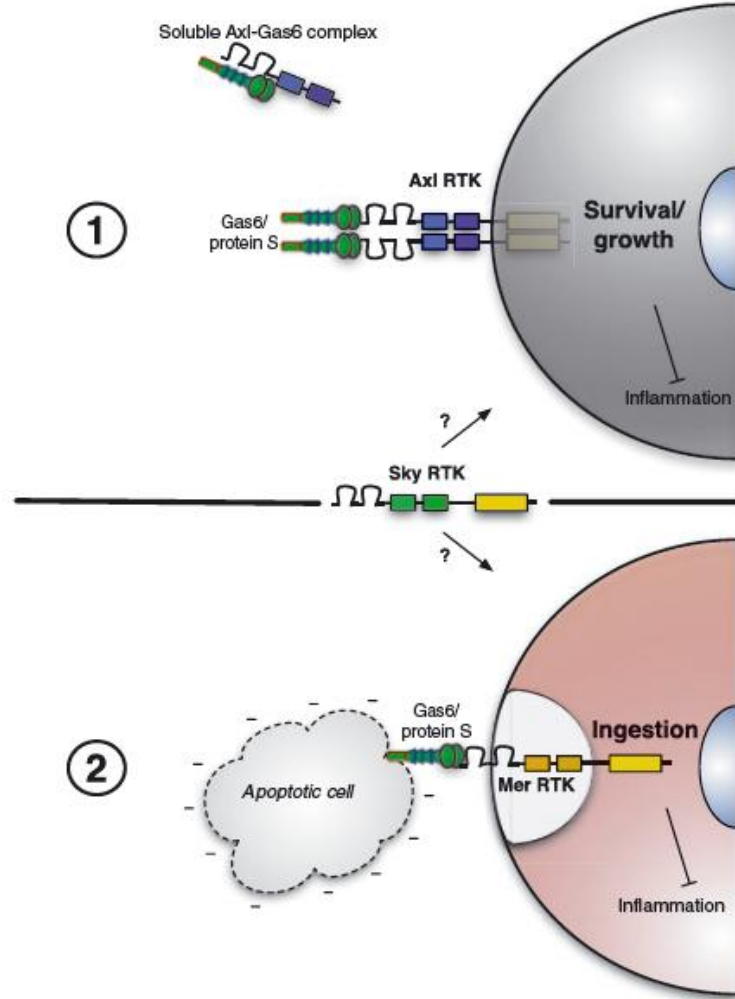
ligandlarını bağlayıp hapseder. Böylece hücreye bağlı reseptöre ligandı bağlanıp aktivitesini gösteremez. Belirli klinik durumlarda oluşan bu bağlanma ile ligandların aktivitesi engellenerek posttranslasyonel bir modifikasyon gerçekleşir (1). Dolaşımda çözülmüş olarak bulunan Axl ve Mer reseptörleri de Gas6 biyoaktivitesini bu şekilde engeller (46). (Şekil 7)

Gas6 reseptörlerinden birinin kaybı durumunda farelerde tromboza karşı direnç artar; fakat kanama zamanı değişmez ve spontan kanama meydana gelmez. Tromboza direnç megakaryositopoezdeki bozukluk nedeniyle değil trombosit fonksiyonların meydana gelen bozukluk nedeniyle koagülasyon kaskatının düzgün çalışmamasından kaynaklanır (41).

Axl reseptörünün dolaşımda çözülmüş halde bulunan fraksiyonu olan sAxl çok düşük konsantrasyonlardadır (0,3-0,9 nM). sAxl insan ve fare plazmasında 65-80 kDa arasında büyüklükte bulunur. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda Gas6 proteininin sAxl'e bağlanarak hücre yüzeylerinde yer alan diğer Gas6 reseptörleri ile etkileşime girememesi nedeniyle inaktive olduğu gösterilmiştir (2).

sMer *in vitro* şartlarda da trombosit agregasyonunu etkiler. Trombosit agregasyonundaki bozukluk pıhtı stabilizasyonunun etkin biçimde devamını engeller. Hayvan modellerinde oluşturulan trombosit inhibisyonu, kanamaya eğilimde artışa veya koagülasyon parametrelerinde bozukluğa yol açmaz (47).

Endotel hasarı sonrasında trombositler aktive olur. Başlangıç fazında hasarlı bölgeden salınan kollajen ve von Willebrand Faktör (vWF) sayesinde trombosit aktivasyonu gerçekleşir. İkinci fazda pıhtı stabilizasyonu için daha çok trombosit hasarlı bölgeye toplanır ve stabil trombosit kümeleri oluşmaya başlar. Mer tirozin kinaz yokluğunda trombosit granüllerinin sekresyonu azalması nedeniyle ikinci faz/stabilizasyon fazı bozular (47).

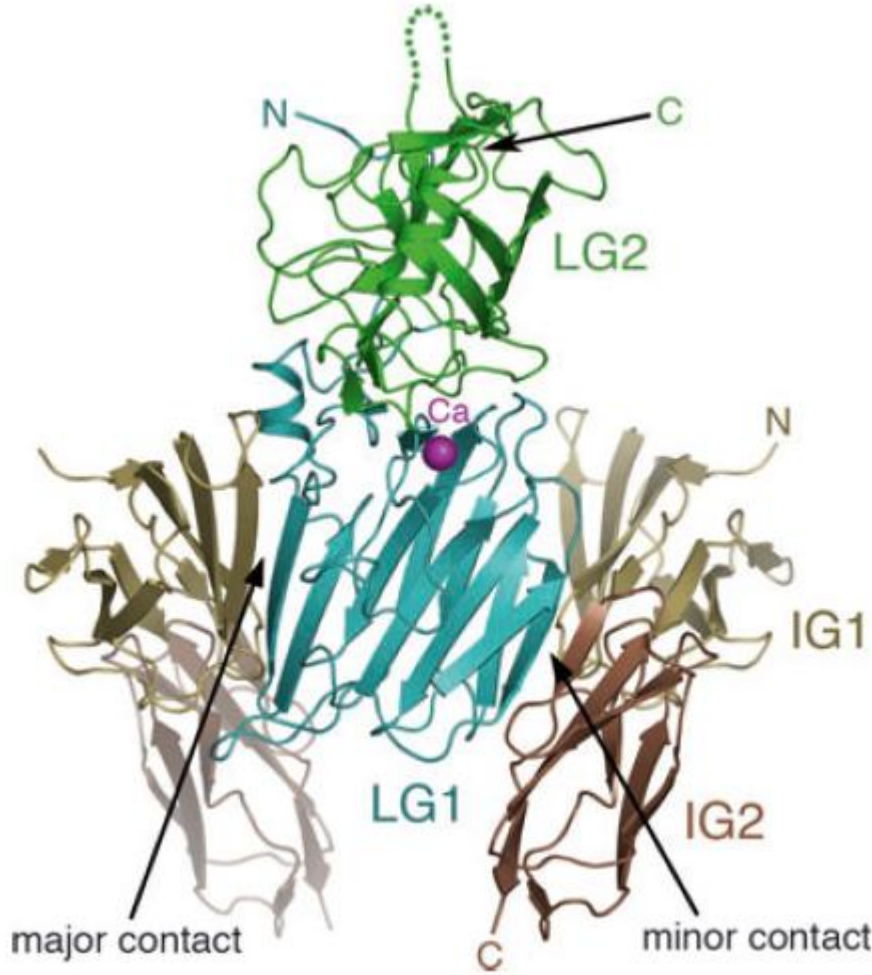


Şekil 7: Hücre canlılığının sürdürülmesi, apoptoz ve immün regülasyonda Axl'in farklı rolleri. (1) Mezenkim kaynaklı çeşitli hücre yüzeylerinde canlılığın sürdürülmesi ve büyümenin gerçekleşmesi için Gas6/protein S-Axl ilişkisi. sAxl Gas6'yı bağlayarak aktivitesini engeller. (2) Apoptotik hücre ve Mer reseptörü arasında köprü görevi gören Gas6/protein S, apoptotik hücrenin fagositozu için sitoskeletal değişikliklerin meydana gelmesine yol açar. Apoptotik hücrenin çevresinde Gas6/protein S üzerindeki Gla bölgesi ile etkileşen negatif yüklü fosfolipitler gösterilmiştir. Tyro3 de muhtemelen diğer RTK'larla benzer fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca Axl, tümör nekrozis faktör- α (TNF α) gibi proenflamatuvar sitokinleri inhibe ederek antienflamatuvar etki gösterir (1).

4.2.3. Gas6 ve TAM Reseptörleri Arasındaki İlişki

Gas6 reseptörlerinden birinin kaybı durumunda farelerde tromboza karşı direnç artar; fakat kanama zamanı değişmez ve spontan kanama meydana gelmez. Tromboza direnç megakaryositopoezdeki bozukluk nedeniyle değil trombosit fonksiyonların meydana gelen bozukluk nedeniyle koagülasyon kaskadının düzgün çalışmamasından kaynaklanır (41).

Axl reseptörünün dolaşımında çözülmüş halde bulunan fraksiyonu olan sAxl çok düşük konsantrasyonlardadır (0,3-0,9 nM). sAxl insan ve fare plazmasında 65-80 kDa arasında büyüklükte bulunur. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda Gas6 proteininin sAxl'e bağlanarak hücre yüzeylerinde yer alan diğer Gas6 reseptörleri ile etkileşime girememesi nedeniyle inaktive olduğu gösterilmiştir (1,2).



Şekil 8: Gas6'nın LG bölgesi ve Axl'in Ig bölgeleri arasındaki kristal kompleks (32)

Gas6 proteini TAM ailesini oluşturan tirozin kinaz reseptörlerinin fosforilasyonu için gereklidir. Yapılan çalışmalarda Gas6'nın Axl, Tyro3 ve Mer reseptörlerinin fosforilasyonu için gerekli olduğu kadar TAM ailesini oluşturan her bir tirozin kinaz reseptörünün varlığı diğer reseptörlerin fosforilasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (41). Örneğin Tyro3 yokluğunda diğer 2 Gas6 reseptörü olan Axl ve Mer'in ligand aracılı fosforilasyonu bozulur. Reseptörlerin trombositler üzerinde eksprese edilme oranı da ortamda bu 3 reseptörden birinin yokluğunda değişir. Yine Tyro3 üzerinde örnek verecek olursak yapılan çalışmalarda Tyro3 reseptörü olmayan trombositlerde Axl ve Mer reseptör sayılarının flow stometrik olarak ölçümü doğal tip trombositlere göre daha az bulunmuştur (41).

Gas6 yokluğunda trombositlerin agregasyon ve sekresyonu bozulur. Aynı şekilde Mer, Tyro3 veya Axl reseptörlerinin yokluğunda da trombosit agregasyon ve sekresyonu bozulur. Trombositlerin dens granüllerinde sekrete edilen ADP, ilk basamakta oluşan ve kararlı bir yapıda olmayan trombosit agregatlarının kararlı makroagregatlara dönüşümünde önemlidir. Bu olay, α -granüllerinden sekrete edilen fibrinojen, vWF ve p-selektin gibi adezyon proteinleri ile desteklenir. Tyro3 reseptörü olmayan trombositlerin düşük doz kollajen ile (2 μ g/ml) karşılaşmaları sonrasında dens granüllerin sekresyonu yeterli olmaz. (Bu işlev karşılaşma sonrasında açığa çıkan ATP'nin ölçümü ile değerlendirilmiştir). Düşük doz ADP ile oluşturulan trombosit aktivasyonu sırasında yüzeylerinde biriken p-selektin düzeylerinin ölçümüne göre değerlendirilen α -granül sekresyonu TAM reseptörlerinin yokluğunda bozuktur. Bu yüzden Gas6 reseptör eksikliği sonucunda trombositlerde etkin bir granül sekresyonu meydana gelmez (41).

Gas6'nın en çok Axl reseptörüne afinitesi vardır ve Axl için tek ligand Gas6'dır. Gas6'nın Axl'e bağlanması sonucunda reseptör dimerizasyona, tirozin kalıntıları otofosforilasyona uğrar. Otofosforilasyon sonucunda intraselüler sinyal molekülleri aktive olur. Axl sinyalizasyonunu hücre adezyonunda, invazyonunda, migrasyonunda, proenflamatuvar sitokin üretiminde, antiapoptozda, proliferasyon ve hücre yaşamının sürdürülmesinde etkilidir. Küçük hücreli dışındaki diğer akciğer kanser türlerinde ve osteosarkom hücrelerinde Axl sentezi kanser hücrelerinin adezyon yeteneği ile korelasyon gösterir. Adezyon yeteneğinin fazla

olması tümör hücrelerinin metastatik özelliğinin de fazla olmasına neden olabilir (1). Gas6 tarafından aktive edilen Axl reseptörü aracılığı hücre içinde bir çok sinyal yolları uyarılır (PI3K, RAS, mitojen tarafından aktiflenen protein kinaz-MAPK) (43).

Gas6'nın Axl'e bağlanması ile Axl fosforile olur ve PI3 kinaz/Akt yolu aktive olur (41). Bu aktivasyon hücrenin yaşamını sürdürmesinde etkilidir ve antiapoptotik etkisi vardır. Dendritik hücrelerde TNF α , IL-6 ve interferon sekresyonunu baskılayarak enflamatuvar cevabı kontrol eder. TAM ailesindeki reseptörleri eksik olan hayvanlarda otoimmün hastalıklar daha sık görülür. Büyüme sırasında Gas6 ekspresyonu azalır. Gas6, Faktör Va ve VIIa'yı inaktive eder. Gas6 ve Axl enflamasyona yanıt olarak endoteli aktive edip lökosit ekstravazasyonunu artırır. Arteriyel neointimal hasar oluşturulan fare modellerinde tüm dokularda Gas6 ve Axl'in sentezi artar. Böbrek hasarı oluşturulan hayvan modellerinde ise Gas6 ve Axl'in glomerüler sentezinin artar. Bu modellere düşük doz varfarin uygulaması sonucunda sentezin azaldığı gözlenmiştir. Bu durum meydana gelen patolojilerde etiolojide K vitaminin (ve Gas6'nın) rolünü vurgular. Gas6 üretemeyen transgenik farelerde nefrotoksik nefrite doğal tip farelere göre anlamlı derecede düşük oranda rastlanır. Transplant rejeksiyonları da enflamatuvar olayların aktivasyonuna bağlı olarak ortaya çıkar ve allograft rejeksiyona rastlanan fare modellerinde Gas6 sentezinde artış görülür (1).

Gas6 ve reseptörleri erişkin farelerin serebral korteksinde, hipokampusunda ve serbellumunda sentezlenir. Tyro3 ise merkezi sinir sisteminde en fazla sentezlenen reseptördür. *In vitro* şartlarda Gas6 hipokampal ve kortikal nöronları apoptozdan korur. Ayrıca ERK/PI3K aktivasyonu aracılığıyla hipotalamik GnRH nöron canlılığının devamına katkıda bulunur. Gas6, Schwann hücreleri ve oligodendrositleri etkileyerek santral ve periferik myelinizasyonu destekler. İnsan fetüs oligodendrosit kültürlerinde Gas6 hücre ölümünü engeller; insan Schwann hücre kültürlerinde ise Gas6 stimülasyonu sonucunda proliferasyon daha hızlı gerçekleşir. Bu yüzden Gas6/Tyro3 reseptör sistemi miyelinizasyonda etkili çeşitli nöronal ve glial hücrelerin yaşamının devamı için önemlidir (48).

Gas6 ve protein S apoptotik hücrelerin Mer-aracılı fagositozunda yer alırlar (1). İnsanlarda Mer tirozin kinaz reseptöründeki mutasyon retinitis pigmentosaya neden olur. Daha önce

yapılan alışmalar Gas6 ve protein S'in retinadaki Mer resept6rlerinin ligandları olduğunu g6stermiştir (49).

Merkezi sinir sisteminde Axl mikroglialarda, oligodendrositlerde ve n6ronlarda; bu resept6r6n ligandı olan Gas6 ise n6ronlarda, endotelial h6crelerde, astrositlerde ve beyin omurilik sıvısında sentezlenir. B6y6me-gelişme sırasında Axl ve Gas6 sentezi artar. MSS'de erişkin d6nemde Axl sentezi azalmaktadır. MS, kuprizon toksisitesi sonucu ile oluşturulan demiyelinizasyon modelinde ve bazı hastalıklarda Axl ve sAxl'in "up" reg6lasyonuna rastlanır (50).

Gas6 ve resept6rleri doğal bağışıklıkta 6nemli role sahiptir. Axl, Tyro3 ve Mer'i olmayan farelerde poliklonal B ve T h6cre hiperaktivasyonu meydana gelir. Doku infiltrasyonları, vask6lit, artrit ve y6ksek d6zeyde dolaşımda bulunan otoantik6r titreleri gibi otoimmun hastalık bulgularına rastlanır. Bu hiperaktivasyon monosit/makrofaj h6crelerindeki artmış Gas6 ve resept6rlerinin sentezi sonucunda gerçekleşir. Normalden fazla aktive olan bu monosit/makrofajların lipopolisakkarit ile karşılaşma sonrasında fazla miktarda TNF α ve IL-6 sekresyonu yapmaları nedeniyle endotoksik şoka yol açma ihtimalleri artar. Gas6 aracılığıyla gerçekleşen artmış makrofaj-lenfosit etkileşimi otoimmunit6 ve enflamasyondan sorumlu kabul edilir (48).

Axl'in intrasel6ler tirozin kinaz b6lgesinin aktivitesinin onkogenik 6zellik g6sterdiği deneysel şartlarda kanıtlanmıştır. Axl'in transmembran b6lgesinden 33 aminoasit uzaklıktaki b6lgesi farelerde t6m6r oluşumu için yeterlidir. TAM ailesinde Axl insanlarda rastlanan kanserler için başlıca onkogen olarak diğerlerinden ayrılır. Her ne kadar Tyro3 ve Mer'in de değişime uğrama 6zellikleri bilinse de kanserdeki rolleri konusunda kesin bilgiler bulunmamaktadır. Elimizde Axl hakkında daha fazla kanıt bulunması daha çeşitli dokularda sentezlendiği için veya Axl ile ilgili daha fazla sayıda çalışma yapıldığı için olabilir. Bu nedenle 6n6m6zdeki yıllarda yapılacak çalışmalar sonucunda TAM resept6r ailesinin kanserle ilişkisi hakkında daha ayrıntılı bilgiler elde edilebilir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Çalışma Grubu ve Örneklerin Toplanması

Bu çalışmaya, 30.11.2011 ve 20.09.2012 tarihleri arasında Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde doğan 80 yenidoğan (40 term, 40 preterm) alınmıştır. Araştırmaya dahil edilen bebekler doğmadan önce anne-babasına çalışmayı açıklayan aydınlatılmış onam formu verilip bebeklerden örnek alınmasını kabul eden imzalı onamları alındı. Bebeklerin kordon kanından alınan örneklerle doğumdan hemen sonra vastus lateralis kasına i.m olarak 1 mg K vitamini (Konakion®) uyguladıktan 48 saat sonra periferik venöz kandan alınan örnekler toplandı.

Çalışmaya dahil edilen bebeklerden EDTA'lı tüplere alınan umbilikal venöz kan örnekleri ve K vitamini uygulamasından 48 saat sonra alınan periferik venöz kan örnekleri yüksek hızda (3000 G) santrifüj edildi; ardından trombositten fakir plazmaları elde edildi. Örnekler -80°C'de saklandı. Gas-6 düzeyleri ELISA (R&D) kiti ile belirlendi.

5.2. Çalışmadan Çıkarılma Koşulları

Sepsis, konjenital anomali ve metabolik hastalık şüphesi olan yenidoğanlar çalışmaya dahil edilmedi.

5.3. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) Yöntemiyle Gas6 Protein Konsantrasyonunun Ölçümü

Çalışmamızda, plazma Gas6 proteininin konsantrasyonu "İnsan Gas6 Duo Set ELISA" kiti kullanılarak sandviç ELISA metoduyla ölçüldü. Gas6 ELISA kitinin aşamaları Şekil 9'da özetlenmiştir.

5.4. Kullanılan Kimyasallar

- İnsan Gas6 Duo Set ELISA Kiti (R&D)
- Sığır serum albümin (BSA) (Fraction V, Roche)
- Tween 20 (Sigma)
- Fosfat tamponlu salin (PBS) (Hyclone)
- EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (Carlo Erba)
- PVDF (polivinilidini florür) membran
- TBST ("Tris-Tween 20" tampon)
- H₂O₂
- Luminol çözeltisi
- Fiksatif çözeltisi
- "Developer" çözeltisi
- Fotoğraf filmi
- Yağsız süt tozu
- CNBr ile aktive edilmiş Sefaroz 4B jeli (Pharmacia LKB)
- İnsan Gas6 proteinine karşı farede geliştirilmiş monoklonal antikor (R&D)
- İnsan Gas6 proteinine karşı keçiden elde edilmiş antikor (R&D)
- Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) (R&D)

5.5. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- Derin dondurucu -80°C (Sanyo)
- Santrifüj (Hettich Universal 32 R)
- ELISA plağı (Nunc)
- ELISA otomatik plak yıkayıcı (Rayto)
- ELISA okuyucu (Rayto)
- HPLC (Agilent 1100 Serisi)
- Pompa (Waters 600)
- Dedektör (Agilent 1100 UV)

5.6. ELISA Yöntemi İçin Çözeltilerin Hazırlanması

- **PBS Çözeltisi**

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ ve 1.5 mM KH₂PO₄ bir miktar distile suyla çözüldü ve pH 7.4'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

- **Yıkama Tamponu**

% 0.01 Tween 20 içeren PBS çözeltisi (PBST).

- **“capture” Antikor Çözeltisi**

İnsana karşı farede geliştirilmiş 1 vial Gas6 antikorunu 1 ml PBS ile seyreltilerek son konsantrasyonu 720 µg/ml olan stok çözelti elde edildi. Bu stok çözeltilerden konsantrasyonu 4 µg/ml olan bir çalışma standardı hazırlandı.

- **Bloklama Tamponu**

Bloklama tamponu olarak %5 BSA içeren PBST çözeltisi kullanıldı.

- **Örnek Tamponu**

1 mM EDTA hazırlanarak, %1 BSA içeren PBST çözeltisinde karıştırıldı.

- **Ölçüm Antikoru Çözeltisi**

İnsan Gas6 proteinine karşı keçiden elde edilmiş biyotinle işaretli 1 vial Gas6 antikorunu, 1 ml %1 BSA içeren PBS ile seyreltilerek konsantrasyonu 18 µg/ ml olan stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden konsantrasyonu 100 ng/ml olan bir çalışma standardı hazırlandı.

- **Standart Gas6 Çözeltisi**

1 vial rekombinant insan Gas6 proteini, 0.5 ml seyreltme çözeltisiyle seyreltilerek son konsantrasyonu 80 ng/ml olan stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltilerden 2 kat seri dilasyonlarla bir dizi kalibratör hazırlandı. Bunlarla kalibrasyon eğrisi çizildi.

- **Streptavidin-HRP Çözeltisi**

Vial, üzerinde belirtilen 1:200 oranındaki çalışma konsantrasyonuna ulaşmak için %1 BSA içeren PBS ile seyreltildi ve buzdolabında saklandı.

- **Substrat Çözeltisi**

A reaktifi (Hidrojen peroksit) ve B reaktifi (Tetrametilbenzidin) 1:1 oranında karıştırılarak kullanıldı.

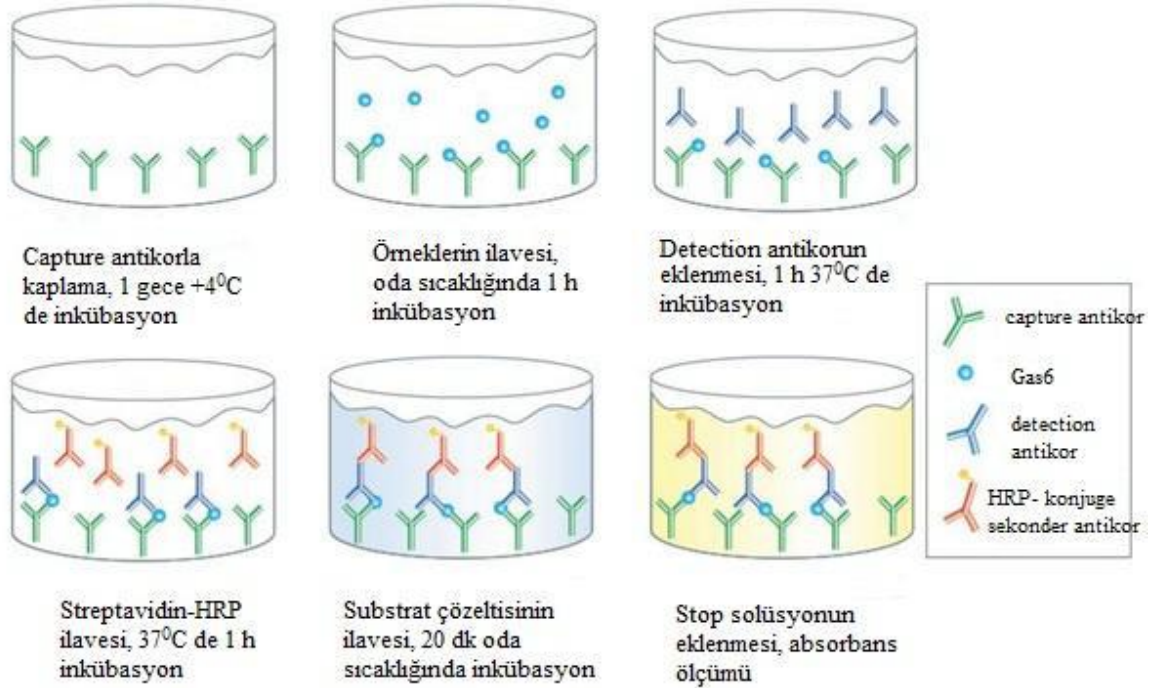
- **Stop Çözeltisi (2N H₂SO₄)**

Bir miktar distile su üzerine 11 ml H₂SO₄ eklenerek distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.

5.7. ELISA İşlem Basamakları

- 96 kuyucuklu, U kesitli ELISA plağına “capture” antikor (4 µg/ml) çözeltisinden 100 µl eklendi ve kapağı kapatılarak 1 gece buzdolabında inkübe edildi.
- Ertesi gün plak, yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı ve iyice aspire edildi; bu şekilde kuyucuklardaki bağlanmamış antikor uzaklaştırılmış oldu.
- Daha sonra her bir kuyucuğa 300 µl bloklama tamponu eklenerek 1,5 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyondan sonra tekrar 5 kez yıkama ve aspirasyon işlemi tekrarlanarak, plak örnek yüklemeye hazır hale getirildi.
- 1:40 oranında örnek tamponuyla seyreltilmiş standart ve plazma örneklerinden, kuyucuklara 100 µl eklenerek 37°C' lik etüvde 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Plak, yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı kurutulduktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl ölçüm antikor çözeltisi eklenerek 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

- 5 kez yıkama ve kurutma işleminin ardından kuyucuklara 100 µl streptavidin-HRP çözeltisi eklenip oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika bekletildi.
- Aynı şekilde yıkama işleminin hemen ardından çok taze olarak hazırlanmış substrat çözeltisinden 100 µl eklenip oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında kuyucuklara 50 µl stop çözeltisi eklenerek reaksiyona son verildi. Ardından zaman kaybedilmeden 450 nm de absorbans ölçümü yapıldı.
- Hazırlanan standart grafikten yararlanılarak örneklerin konsantrasyonu hesaplandı. ELISA işlem basamakları Şekil 9’da özetlenmiştir.



Şekil 9: ELISA yöntemiyle Gas6 düzeyinin ölçümü

5.8. İstatiksel Analizler

Bu çalışmada istatistiksel analizler SPSS 17 (statistical packages for social sciences) paket programı ile yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (ortalama, standart sapma) yanı sıra, ikili grupların karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Sonuçların istatistiksel anlamlılığı için $p < 0,05$ düzeyi esas alınmıştır.

6. BULGULAR

Çalışmaya 30.11.2011 ve 20.09.2012 tarihleri arasında Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde doğan 40 term ve 40 preterm olmak üzere toplam 80 yenidoğan alındı. Term yenidoğanların 25'i kız 15'i erkek; preterm yenidoğanların 22'si kız 18'i erkekti. 1'i term ve 4'ü preterm yenidoğan olmak toplam 5 bebekte intrauterin büyüme geriliği (İUBG) vardı. İUBG olmayan term yenidoğanların ağırlığı 2580 g – 3850 g arasında (ortalama $3255,5 \pm 324,7$ g); preterm yenidoğanların ağırlığı ise 1550 g – 2400 g arasında (ortalama $2063,5 \pm 230,42$ g) ölçüldü. Yenidoğanların 3'ü vaginal yolla (1 preterm ve 2 term yenidoğan) 77'si sezaryen ile doğdu.

Çalışmamızda 40 term ve 40 preterm yenidoğanın K vitamini öncesi ve sonrası serum Gas6 düzeyleri ölçüldü. Olguların tümü dikkate alındığında K vitamini öncesi ortalama Gas6 düzeyi $9,41 \pm 4,82$ ng/ml ve K vitamini sonrası Gas6 düzeyi $9,81 \pm 4,48$ ng/ml olarak bulundu.

K vitamini öncesi Gas6 düzeyleri preterm ve term yenidoğanlarda sırasıyla $9,075 \pm 5,30$ ng/ml ve $9,75 \pm 4,34$ ng/ml olarak belirlendi. İki değer arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,535$). K vitamini sonrası Gas6 düzeyleri preterm ve termlerde sırasıyla $10,5 \pm 5,28$ ng/ml ve $9,12 \pm 3,42$ ng/ml olarak belirlendi. İki değer arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,171$).

Pretermilerin K vitamini öncesi ve sonrasında ölçülen Gas6 düzeyleri arasında anlamlı fark belirlendi (sırasıyla $9,07 \pm 5,3$ ve $10,5 \pm 5,28$ ng/ml) ($p=0,036$).

Tablo 1'de preterm ve term bebeklerde K vitamini öncesi ve sonrası serum Gas6 protein düzeyleri gösterilmektedir.

	TERM BEBEKLER		PRETERM BEBEKLER	
	K vitamini öncesi Gas6 düzeyi (ng/ml)	K vitamini sonrası Gas6 düzeyi (ng/ml)	K vitamini öncesi Gas6 düzeyi (ng/ml)	K vitamini sonrası Gas6 düzeyi (ng/ml)
1	14,11	11,12	9,99	7,21
2	12,15	9,27	29,13	24,96
3	17,07	13,9	12,52	9,61
4	12,2	9,31	10,97	14,23
5	10,6	7,79	8,18	5,49
6	12,17	9,29	10,62	7,82
7	8,95	6,23	15,46	12,39
8	10,5	7,7	19,87	16,51
9	10,29	7,5	5,49	2,92
10	14,13	11,14	18,71	15,44
11	12,86	9,94	12,44	12,32
12	6,03	3,44	11,64	12,25
13	10,24	7,46	8,42	8,11
14	10,36	7,57	7,77	5,1
15	16,41	13,28	7,26	4,62
16	10,67	7,86	13,48	17,23
17	9,99	7,21	13,9	23,88
18	0,51	0,39	8,47	14,77
19	9,2	6,47	16,06	19,1
20	13,16	10,22	10,95	14,54
21	11,19	14,36	3,65	5,88
22	8,42	11,86	6,58	11,43
23	9,5	5,97	10,06	10,31
24	7,66	10,38	7,08	9,71
25	9,96	11	2,94	7,15
26	12,74	13,48	6,86	8,24
27	7,95	7,55	4,13	17,37
28	22,61	14,87	8,67	12,79
29	0,28	13,06	3,44	7,64
30	9,89	6,44	2,86	6,42
31	16,97	8,61	5,28	5,94

32	12,15	6,2	6,71	7,61
33	7,06	11,5	8,54	10,24
34	7,57	11,57	6,58	16,64
35	13,75	18,55	5,34	9,27
36	5,04	12,86	5,88	4,74
37	1,92	13,73	4,26	4,81
38	7,68	10,95	9,55	6,03
39	7,97	6,1	9,34	15,07
40	7,55	8,33	15,33	13,25
Ortalama	9,75±4,34	9,12±3,42	9,075±5,30	10,5±5,28
	p= 0,535	p=0,171	p= 0,535	p=0,171

Tablo 1: Preterm ve term yenidoğanlarda K vitamini öncesi ve sonrası serum Gas6 protein düzeyleri

İntrauterin büyüme geriliği (İUBG) olan 5 yenidoğanın K vitamini öncesi ortalama Gas6 düzeyi $3,7\pm 4,32$ ng/ml; İUBG olmayan yenidoğanların ortalama Gas6 düzeyi $9,76\pm 4,71$ ng/ml olarak ölçüldü. İki grup arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0,012$).

Diyabetik anne çocuğu (DAÇ) ve DAÇ olmayan yenidoğanların Gas6 düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

	K vitamini öncesi Gas6 düzeyi (ng/ml)	K vitamini sonrası Gas6 düzeyi (ng/ml)
DAÇ (n=18)	8,27±3,83	8,83±3,51
DAÇ olmayanlar (n=62)	9,74±5,06	10,1±4,71
	p=0,260	p=0,295

Tablo 2: Diyabetik anne çocukları (DAÇ) ve DAÇ olmayanların Gas6 düzeyleri

7. TARTIŞMA

Growth arrest specific protein-6 (Gas6), hemostaz, enflamasyon ve bazı kanser türleri ile ilişkisi olan nispeten yeni tanımlanmış, K vitaminine bağımlı bir proteindir (43,47,50).

Bu yeni proteinin hem işlevlerini hem de normal değerlerini saptamak amacı ile son yıllarda çok sayıda araştırma yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir. Şu andaki bilgilerimizin tamamı deneysel çalışmalardan ve erişkin popülasyonundan elde edilen verilerden oluşmaktadır. Literatürde, Gas6 referans aralıklarının oluşturulması amacıyla daha önce erişkinlerdeki düzeylerin belirlenmiş olmasına karşın yenidoğanlarda serum Gas6 düzeyi referans aralıkları ile ilgili henüz yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma hem yenidoğanlara özgü referans değerlerin oluşturulmasına bir katkı sağlamak, hem de farklı özelliklere sahip yenidoğanların K vitamini öncesi ve sonrası Gas6 değerleri arasında fark olup olmadığını ortaya koymak amacı ile yapılmıştır.

Varsayımsal olarak, K vitamini ile Gas6 arasındaki ilişki, bu proteinin birçok dokuda sentezlenmesi nedeni ile koagülasyon proteinlerinin karaciğerde sentezlenmesi ve K vitamini arasındaki ilişkiye oranla çok daha kompleksdir (2,5).

Çalışmamızda term ve preterm yenidoğanlarda K vitamini öncesi ve sonrası serum Gas6 protein düzeyleri ELISA ile ölçülmüştür.

GAS6'nın çeşitli hastalıklardaki düzeylerinin belirlenmesi için kullanılacak, güvenilirliği yüksek testlerin geliştirilmesi Gas6 ve protein S'in plazmada çok düşük konsantrasyonlarda bulunması nedeniyle zorluk yaratmaktadır (7). Bu zorluklara rağmen bir çok araştırmacı Gas6'nın sepsis sırasında plazma konsantrasyonunun arttığı ve bir akut faz reaktanı olarak görev yaptığını göstermiştir (2). Ekman ve ark. çalışmalarında Gas6 konsantrasyon artışını septisemiye rastlanan hastalarda (ağır sepsis, sepsis, enfeksiyonla birlikte olan ve olmayan sistemik inflamatuvar yanıt sendromunu içeren) ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu olmayan hastalardan kontrol grubu oluşturarak incelemiştir (2). Gas6 seviyesi hastalığın ciddiyetiyle orantılı olarak septik hastalarda yükselmektedir. Gas6 ve sAxl düzeyleri IL-6, prokalsitonin ve hasarlı organ sayısı ile korelidir (2). Dolaşımdaki sAxl'e bağlı olarak bulunan Gas6'nın hücre membranına bağlı olarak aktivite gösteren Axl'e bağlanması engellenir. Bu

yüzden sAxl'in dolaşımdaki Gas6'yı inhibe ettiği kabul edilir. Sepsis varlığında Gas6 düzeyi sAxl'e göre rölatif olarak daha fazla yükseldiği için Gas6 aracılı hücrel sinyalizasyon artar. Gas6 seviyesi sepsise özel olmamakla birlikte tüm enflamatuvar durumlarda yükselir (2). Doğal bağışıklıkta TAM reseptörleri bir fren görevi görür. Gas6 yer aldığı hücrelerde antienflamatuvar özelliği ile sitokin sentezini azaltmanın yanı sıra enflamasyon bölgesinde trombosit ve lökositlerle endotel etkileşimini yönetir (6). Gas6'nın enflamasyonda ve sepsiste yükselmesi, bu proteinin bir akut faz reaktanı olarak kullanılabilme ihtimalini ortaya çıkarmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre son adet tarihinin ilk gününden itibaren hesaplandığında 37. gebelik haftasından önce canlı doğan bebeklere preterm bebek denir (51). Preterm doğumların çoğunda neden tam olarak bilinmez. Gebelikte yaşanan stres, ilk doğum, prenatal bakımın yetersiz olması veya hiç olmaması, kronik enfeksiyon, hipertansiyon ve diyabet gibi çeşitli klinik komplikasyonlar prematür eylemin nedenlerinden sayılabilir (52,53). Fakat preterm doğum etiyojisinde en çok intrauterin enfeksiyonlar suçlanmaktadır. İntrauterin enfeksiyonlar nedeniyle enflamatuvar bir cevap oluşur ve bu enflamatuvar süreç de erken membran rüptürünü veya doğumu tetikler. Normalde steril bir çevre olan uterin kaviteye enfeksiyöz ajanların nasıl girdiği ve farklı türlere göre bu ajanların farklı enflamatuvar yanıtı nasıl yol açtığı hala tam anlaşılamamıştır (54).

Son 15 yılda preterm doğum oranı %7'den %10-12'ye yükselmiştir (55). Preterm bebeklerin yaşam oranlarının geçmiş yıllara göre artışının nedenleri arasında erken doğum tehditi olan gebelere bebeğin akciğer matürasyonunu hızlandırmak amacıyla antenatal steroid uygulanması, doğum sonrasında bebeğin hipotermiden korunması, erken dönemde uygulanan surfaktan tedavisi ve mekanik ventilasyondan ayrılan bebeklerde sonraki dönemlerde negatif etkisi olabilecek postnatal deksametazon kullanımının azaltılması sayılabilir (56).

Gebeliklerin %1-5'inde erken membran rüptürüne (EMR) rastlanır. EMR, prematür eylemin %30-40'ından sorumludur; enfeksiyon ve enflamasyon riskinde artışa neden olur (57,58).

Postnatal dönemde daha uzun süre hospitalize edilen preterm bebekler, umbilikal venöz kateterizasyon ve periferik venöz kan örneklerinin alınması gibi invaziv işlemlere term bebeklerden daha sık maruz kalmaktadır. İnvaziv işlemler sonucu endotel bütünlüğünün

bozulması ve preterm eylem sırasındaki enflamatuvar süreç ile plasenta bütünlüğünün bozulması sonucunda endotelden dolaşıma daha yüksek oranda Gas6 salınımı gerçekleşebilir.

Çalışmamızda preterm bebeklerin K vitamini öncesi ve sonrasında ölçülen Gas6 düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulundu (sırasıyla $9,07 \pm 5,3$ ve $10,5 \pm 5,28$ ng/ml; $p=0,036$). Bu farkta etkili faktörler K vitamini uygulaması ile sınırlı kalmayıp preterm bebeklerin endotel bütünlüğündeki bozukluğun da Gas6 düzeyinde artışa neden olduğunu düşündürmektedir.

Hem term hem de preterm yenidoğan grupları içerisinde ayrı bir grup olarak diyabetik anne çocukları (DAÇ) dikkat çekmekteydi. Bilinmektedir ki DAÇ'ın hemostatik parametreleri prenatal, natal ve postnatal çeşitli faktörlerden özellikle etkilenmektedir. Bu nedenle DAÇ kendi içinde ayrıca değerlendirildi.

Gestasyonel diyabet, gebelerin %2'sini etkilemekte ve gebelerin $\sim 1/1000$ 'inde insüline bağımlı diyabet ortaya çıkmaktadır (51). Diyabetik anne çocukları, doğumda makrozomik ve pletorik olarak gözlenmektedir. Ayrıca DAÇ'ın glikojen, protein ve yağ depoları sağlıklı bebeklerden daha fazla miktardadır. Yenidoğanların normal plazma hormonal paterni; düşük insülin, yüksek glukagon ve yüksek katekolamin düzeyleri şeklinde programlanmıştır. DAÇ'larda ise bu profil yüksek insülin, düşük glukagon ve düşük adrenalin olarak değişir (51).

Toplam 80 örneğin 18'i DAÇ idi (%22,5). DAÇ olmayan bebeklerde K vitamini öncesi Gas6 düzeyi $9,74 \pm 5,06$ ng/ml; DAÇ bebeklerde $8,27 \pm 3,83$ ng/ml bulundu. İki değer arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,260$). DAÇ olmayan bebeklerde K vitamini sonrası Gas6 düzeyi $10,1 \pm 4,71$ ng/ml; DAÇ bebeklerde $8,83 \pm 3,51$ ng/ml olarak izlendi. İki değer arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,295$).

Gas6 proteini birçok dokuda yaygın olarak bulunan bir protein olması nedeniyle Gas6 düzeylerinin DAÇ'larda sağlıklı bebeklere göre daha yüksek düzeylere sahip olması beklenebilir. Diğer yandan diyabeti enflamatuvar bir süreç olarak değerlendirecek olursak; enflamasyonda Gas6 düzeylerindeki gözlenen artış DAÇ'larda da beklenmelidir (2,59). Ancak çalışmamızın verileri bu hipotezi doğrulamamaktadır.

Gestasyon haftasına göre oluşturulan büyüme eğrilerinde bebeğin ağırlığının ortalama değerinin 2 SD standart deviasyon (SD) altında olması intrauterin büyüme geriliği (İUBG) olarak tanımlanmaktadır (51).

Çalışmamızda İUBG olan bebekler (n=5) incelendiğinde K vitamini öncesi ortalama Gas6 düzeyi, İUBG olmayan bebeklere göre anlamlı oranda düşük bulundu (sırasıyla $3,7\pm 4,32$ ng/ml ve $9,76\pm 4,71$ ng/ml).

Lindqvist ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise İUBG olan bebeklerin kord kanındaki Gas6 düzeyi İUBG olmayan bebeklere göre daha yüksek bulunmuştur. Bu yüksekliğin plasental yetmezliğin bir sonucu olarak ortaya çıktığı savunulmuştur (60).

Yanagita ve arkadaşları mezanşimal hücre kültür lizatı ve vasatında, Gas6 ve onun reseptörü olan Axl'in varlığını kanıtlamışlardır (61). Bu hücrelere rekombinant Gas6 ilave edilince Axl'in tirozin kinaz bölgesinin fosforillendiği ve doza bağımlı şekilde mezanşimal hücre çoğalmasının arttığı gösterilmiştir. Warfarin varlığında bu etki görülmemiş, kültür ortamına fazla K vitamini eklendiğinde warfarinin anti mitojenik etkisi ortadan kalkmıştır. Bu bulgular, K vitaminine bağımlı büyüme faktörlerinin mezanşimal hücre çoğalmasında çok önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Kültür ortamına Axl'in ekstraselüler bölgesinden ibaret bir protein (Axl-ECD) çözeltisi eklendiğinde, mitojenik etki inhibe olmaktadır. Axl, Gas6'nın bağlandığı reseptörlerden biri olduğu için, K vitaminine bağımlı büyüme faktörünün Gas6 olduğunu düşündürmektedir. Sonuç olarak Gas6'nın mezanşimal hücreler için otokrin bir büyüme faktörü olduğu fikri gittikçe önem kazanmaktadır (62).

İUBG olan bebekleri taşıyan annelerin serum büyüme faktör düzeylerinin sağlıklı gebelere göre daha düşük düzeylerde olduğu bilinmektedir (60). Gas6'nın da büyüme faktörü benzeri etkisi olması nedeniyle İUBG olan bebeklerin Gas6 düzeyleri sağlıklı yenidoğanlara göre düşük olabilir.

Çalışmamızın sonuçları bu hipotezi destekler niteliktedir.

DAÇ ve İUBG gibi özellikleri olan term ve preterm yenidoğanların Gas6 düzeylerinin sağlıklı yenidoğanlarla karşılaştırılması için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

8. SONUÇLAR

1. Bu çalışmada preterm bebeklerde K vitamini öncesi ve sonrasında ölçülen Gas6 düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.
2. Çalışmamızda yer alan ve İUBG olan yenidoğanların K vitamini öncesi ortalama Gas6 düzeyi İUBG olmayan yenidoğanların ortalama Gas6 düzeyinden anlamlı derecede düşük bulunmuştur.
3. DAÇ ve İUBG gibi özellikleri olan term ve preterm yenidoğanların Gas6 düzeylerinin sağlıklı yenidoğanlarla karşılaştırılması için daha çok vaka ile yapılacak daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

9. KAYNAKLAR

1. Hafizi S, Dahlbäck B. Gas6 and protein S: Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS Journal* 2006;273:5231–5244.
2. Ekman C, Linder A, Åkesson P, Dahlbäck B. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Critical Care* 2010;14:R158.
3. Kim KH, Kim EY, Kim Y, Kim E, Lee HS, Yoon SY, et al. Gas6 downregulation impaired cytoplasmic maturation and pronuclear formation independent to the MPF activity. *Plos one* 2011;6(8):23304.
4. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol* 2008;8(5):327–336.
5. Fisher PW, Brigham-Burke M, Wu SJ, Luo J, Carton J, Staquet K, et al. A novel site contributing to growth-arrest-specific gene 6 binding to its receptors as revealed by a human monoclonal antibody. *Biochem. J* 2005;387,727–735.
6. Hurtado B, García de Frutos P. GAS6 in systemic inflammatory diseases: with and without infection. *P. Critical Care* 2010;14:1003.
7. Ekman C, Jönsen A, Sturfelt G, Bengtsson AA, Dahlbäck B. Plasma concentrations of Gas6 and sAxl correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2011;50:1064-1069.
8. O'Donnell K, Harkes IC, Dougherty L, Wicks IP. Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis. *AJP* 1999; 154:4.
9. Gjerdrum C, Tirona C, Høiby T, Stefansson I, Haugena H, Sandal T et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *PNAS* 2010;107(3);124-1129.
10. Demirtaş F, Evim MS, Baytan B, Güneş AM. Vitamin K ve hemostaz. *Güncel Pediatri* 2010;8:113-8.
11. Suttie JW. Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *FASEB J* 1993;7:445-452.
12. Lippi G, Franchini M. Vitamin K in neonates: facts and myths. *Blood Transfus* 2011; 9:4-9.
13. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry* 28th ed.

14. Bolton-Smith C, Pirice RJG, Fenton ST, Harrington DJ, Shearer MJ. Compilation of a provisional UK database for the phylloquinone (vitamin K1) content of foods. *Br J Nutr* 2000;83(4):389-399.
15. Hodges SJ, Pilkington MJ, Shearer MJ, Chayen J, Stamp T, Catterall A et al. Depressed levels of circulating menaquinones in patients with osteoporotic fractures of the spine and femoral neck. *Bone* 1991;12(6):387-389.
16. Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 10.Baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara 2002;1480-1484.
17. Hey E. Vitamin K-what, why, and when. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003; 88(2):80-3.
18. Akev N, Can A. *Biyokimya dersleri*, İstanbul 2008; s.348-349.
19. Wu FYH, Liao WC, Chang HM. Comparison of antitumor activity of vitamins K, K1 and K2 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. *Life Sci* 1993;52(22):1797-1804.
20. Nishikawa Y, Carr BI, Wang M, Kar S, Finn F, Dowd P, et al. Growth inhibition of hepatoma cells induced by vitamin K and its analogs. *J. Biol. Chem* 1995; 270(47):28304-28310.
21. Sata N, Stumpe KH, Han B, Haussinger D, Niederau C. Menadione induces both necrosis and apoptosis in rat pancreatic acinar AR4-2J cells. *Free Rad Biol Med* 1997; 23(6)844-850.
22. Servitja JM, Masgrau R, Pardo R, Sarri E, Picatoste F. Effects of oxidative stress on phospholipid signaling in rat cultured astrocytes and brain slices. *J Neurochem* 2000;75:788-794.
23. Champe PC, Harvey RA. *Biyokimya*, 2.Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri 1997; 319.
24. Furie B, Furie BC. Molecular basis of vitamin K-dependent γ -carboxylation. *Blood* 1990;75:1753-62.
25. Ni R, Nishikawa Y, Carr BI. Cell growth inhibition by a novel vitamin K is associated with induction of protein tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1998;273:9906-11.
26. Vermeer C. γ -carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K dependent carboxylase. *Biochemical Journal* 1990;266:625-36.

27. Binkley NC, Suttie JW. Vitamin K nutrition and osteoporosis. *Journal of Nutrition* 1995;125:1812-21.
28. Türkmenoğlu Y, Taş BT, Türkkın E, Aydınol FN, Kafadar İ, Adal SE. Tek doz K vitamini yenidoğanın geç hemorajik hastalığını önlemede yeterli bir profilaksi mi? İki olgu sunumu. *Okmeydanı Tıp Dergisi* 2012;28(3):162-166.
29. Bozaykut A, Karaman S, Akyıldız B, et al. Yenidoğanın hemorajik hastalığı: Retrospektif çalışma. *Ege Pediatri Bülteni* 2002;9(2):65-67.
30. Korkut M, Özgen Ü. Yenidoğanın geç başlangıçlı hemorajik hastalığına bağlı intrakraniyal kanama vakalarının sunumu. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2001;8(4):197-199.
31. Martín-López JE, Carlos-Gil AM, Rodríguez-López R, Villegas-Portero R, Luque-Romero L, Flores-Moreno S. Prophylactic vitamin K for vitamin K deficiency bleeding of the newborn. *Farm Hosp* 2011;35(3):148-155.
32. Van Hasselt PM, de Koning TJ, Kvist N, de Vries E, Lundin CR, Berger R, et al. Netherlands study group for biliary atresia registry. Prevention of vitamin K deficiency bleeding in breastfed infants. *Pediatrics* 2008;121(4):857-63.
33. Suttie JW. Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *Faseb J* 1993;7:445-452.
34. Berkner KL. The vitamin K-dependent carboxylase. *J. Nutr* 2000;130: 1877–1880.
35. Akın DF, Sipahi K, Kayaalp T, Eğin Y, Taşdelen S, Kürekçi E et al. Factor V Leiden and prothrombin 20210A mutations among Turkish pediatric leukemia patients. *Hindawi Publishing Corporation Leukemia Research and Treatment* 2012 article ID 250432.
36. Kanagasabai Vadivel K, Bajaj SP. Structural biology of factor VIIa/tissue factor initiated coagulation. *Front Biosci.* 2012;17: 2476–2494.
37. Rezaie AR. Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways. *Curr Med Chem* 2010;17(19): 2059–2069.
38. Griffin JH, Mosher DF, Zimmerman TS, Klesis AJ Protein C, an antithrombotic protein, is reduced in hospitalized patients with intravascular coagulation. *Blood* 1982;60(1):261-264.

39. Lundwall Å, Dackowski W, Cohen E, Shaffer M, Mahr A, Dahlbäck B, et al. Isolation and sequence of the cDNA for human protein S, regulator of blood coagulation. *Proc. Natl Acad Sci* 1986;83:6716-6720.
40. Fair DS, Marlar DJ. Quantitation of human protein S in plasma of normal and warfarin-treated individuals by radioimmunoassay. *Thromb. Res* 1984;15;36(6):527-535.
41. Scherrer AA, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J. Clin. Invest* 2005;115:237–246.
42. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Molecular And Cellular Biology* 1993;4976-4985.
43. Rankin EB, Fuh KC, Taylor TE, Krieg AJ, Musser M, Yuan J, et al. Axl is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer. *Cancer Res* 2010;70(19).
44. Binder MD, Xiao J, Kemper D, Ma GZM, Murray SS, Kilpatrick TJ. Gas6 increases myelination by oligodendrocytes and its deficiency delays recovery following cuprizone-induced demyelination. *Plos One* 2011;6(3):e17727.
45. Wu Y, Singh S, Georgescu MM, Birge RB. A role for Mer tyrosine kinase in $\alpha\beta 5$ integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *Journal of Cell Science* 2005;118, 539-553.
46. Tshiperson V, Li X, Schwartz GJ, Raine CS, Zagardo BS. GAS6 enhances repair following cuprizone-induced demyelination. *Plos One* 2010;5(12):e15748.
47. Sather S, Kenyon KD, Lefkowitz JB, Liang X, Varnum BC, Henson PM et al. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood* 2007;109:1026-1033.
48. Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, Leone MA, Puta E, Naldi P et al. Elevation of Gas6 protein concentration in cerebrospinal fluid of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Journal of the Neurological Sciences* 2008;269:138–142.

49. Chen Y, Lu Q, Lu Q, Wang N. Gene expression profile changes caused by the dysfunction of Mer during retinal pigment epithelium phagocytosis. *Chinese Medical Journal* 2011;124(8):1145-1155.
50. Weinger JG, Brosnan CF, Loudig O, Goldberg MF, Macian F, Arnett HA et al. Loss of the receptor tyrosine kinase Axl leads to enhanced inflammation in the CNS and delayed removal of myelin debris during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation* 2011;8:49.
51. Kliegman RM, Stanton B, St. Geme J, Schor N, Behrman RE. *Nelson Textbook of Pediatrics*, 19th Edition. 2011.
52. de Almeida AC, de Jesus AC, Lima PF, de Araújo MF, de Araújo TM. Maternal risk factors for premature births in a public maternity hospital in Imperatriz. *Rev Gaucha Enferm* 2012;33(2):86-94.
53. Basu R, Malig B, Ostro B. High ambient temperature and the risk of preterm delivery. *Am J Epidemiol* 2010;15;172(10):1108-17.
54. Jefferson KK. The bacterial etiology of preterm birth. *Adv Appl Microbiol.* 2012;80:1-22.
55. Mumdzhev H. The late preterm infants--time to put our mind. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2012;51(5):38-45.
56. Moore T, Hennessy EM, Myles J, Johnson SJ, Draper ES, Costeloe KL et al. Neurological and developmental outcome in extremely preterm children born in England in 1995 and 2006: the EPICure studies. *BMJ.* 2012 Dec 4;345:e7961.
57. Hájek Z, Horáková V, Koucký M, Dokoupilová M, Plavka R, Pařízek A. Acute or expectant management in premature labour with preterm premature rupture of the membranes. *Ceska Gynekol.* 2012 Aug;77(4):341-6.
58. van der Ham DP, Vijgen SM, Nijhuis JG, van Beek JJ, Opmeer BC, Mulder AL et al. Induction of labor versus expectant management in women with preterm prelabor rupture of membranes between 34 and 37 weeks: a randomized controlled trial. *PLoS Med.* 2012;9(4):e1001208.
59. Fourcot A, Couchie D, Chobert MN, Zafrani ES, Mavier P, Laperche Y et al. Gas6 deficiency prevents liver inflammation, steatohepatitis, and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011 Jun;300(6):G1043-53.

60. Lindqvist PG, Balogh I, Dahlbäck B. Umbilical cord plasma levels of growth-arrest specific protein 6 in intrauterine growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(1):22-6.
61. Yanagita M. Gas6, warfarin, and kidney diseases. *Clin Exp Nephrol.* 2004 Dec;8(4):304-9.
62. Uras F, Uras AR. Yeni Gla-proteinleri: Gas6 ve Matriks Gla-Proteini. *Tromboz Hemostaz ve Anjioloji.* Ulutin, O. (Ed) . 2006;39-51.