

1. GİRİŞ

Tromboz kanın damar içerisinde patolojik bir şekilde pıhtılaşması durumudur. Batı dünyasında ve toplumumuzda giderek artan bir ivme ile hastalık ve ölümlere neden olmaktadır. Tromboz olayı, kan akımındaki değişiklikler, damar duvarı değişiklikleri, pıhtılaşma faktörleri ve bunların inhibitörlerinin kan düzeylerindeki değişiklikleri sonucu ortaya çıkmaktadır (Lane ve Grant, 2000; Chung ve Gregory, 2003/2004).

Tromboz gelişimi, multifaktöriyel olup çok sayıda kalıtsal ve çevresel faktörün değişik mekanizmalarla rol aldığı karmaşık bir süreç ile meydana gelmektedir (Rosendaal, 1999). Arteriyel ve venöz sistemde, bu süreçte farklı etmenlerin olduğu düşünülmektedir. Arteriyel sistemde endotel hasarı ve trombositlerin fonksiyonel bozukluklarının tromboz gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Venöz tromboz vakalarında ise genellikle pıhtılaşma sistemini kontrol altında tutan doğal inhibitör mekanizma bozukluklarına rastlanmaktadır (Anton ve Massicotte, 2001; Lanzkowsky, 2000; Revel-Vilk ve Massicotte, 2003). Bununla birlikte kalıtsal trombofililerin tamamının venöz tromboza eğilim yarattığı da çeşitli çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Bucciralli ve diğ., 1999; İliçin ve diğ., 1996).

Tromboz eğilimini arttırdığı bilinen risk faktörleri; genetik, çevresel koşullar veya bunların etkileşimi ile oluşabilir. Risk faktörlerinin çok sayıda olmasına karşın son yıllarda moleküler düzeydeki çalışmalarla yeni risk faktörleri tanımlanmaktadır. Bunlar arasında; faktör V (FV) Leiden ile aktive edilmiş protein C'ye direnç, antitrombin III, protrombin 20210G>A, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) mutasyonları, yüksek faktör VIII (FVIII) düzeyi, hiperhomosisteinemi, protein C ve protein S yetersizlikleri gibi genetik bozukluklar sayılabilir. Hipertansiyon, dislipidemi, şeker hastalığı gibi damar duvarında değişiklikler yapan metabolizma hastalıkları da tromboz eğilimini artırır (Baykal ve diğ., 1999). Birey birden fazla risk faktörü etkisinde kaldığı zaman tromboz riski de artmaktadır.

Kan pıhtılaşmasını düzenleyen proteinlerin genlerinde meydana gelen kusurların, kalp krizi (Myocardial Infarction:MI), felç, akciğer embolisi, derin ven trombozu (Deep Vein Thrombosis:DVT), tekrarlı düşük, ölü doğum ve diğer gebelik komplikasyonları için risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir. Kalıtsal trombofili, dünyada olduğu kadar, ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur. Toplumumuzda, hastalığa genetik yatkınlığı olan bireylerin tanımlanması erken dönemde önlem alınarak, hastalığın toplum ve bireyde yaratacağı olumsuz etkilerin azaltılması açısından önem taşımaktadır. Trombotik hastalıkların önlem ve tedavisindeki gelişmelere katkıda bulunmak ve tromboz patogenezini aydınlatmak amacı ile son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik temelli çalışmalar yapılmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, genel kısımlar bölümünde tez konusu olan tromboz patogenezi ve biyokimyası hakkında temel bilgiler verildi. Ayrıca pıhtılaşma sürecinde görev alan faktörlerle ilgili kalıtsal bozukluklar ve faktör VIII geninin yapısı ve işlevi hakkında bilgiler verilerek, tromboz ile aralarındaki ilişki, literatür bilgilerine dayanarak irdelendi. Tezin malzeme ve yöntem bölümünde, faktör VIII düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan yöntem ve faktör VIII ölçüm kiti hakkında, DNA ekstraksiyon yöntemi ve bu yöntemde kullanılan DNA izolasyon kiti hakkında bilgi verildi. Yine bu bölümde, incelenmesi istenen faktör VIII gen bölgesinin eksonlarının çoğaltılmasını hedefleyen polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR) ve uygulama koşulları, tek zincir konformasyon analizi (Single Strand Conformation Analysis: SSCA) ve uygulama koşulları, SSCA analizi sonuçlarına göre uygulanan DNA dizi analizi tekniği detayları ile birlikte belirtildi. Bulgular bölümünde, yapılan çalışmalara ait elde edilen DNA'ların miktar tayini için yapılan spektrofotometrik ölçüm değerleri, agaroz, poliakrilamid, SSCA jellerine ait jel görüntüleri verildi. Yine tezin bu bölümünde faktör VIII genin eksonlarında yapılan dizi analizi sonuçlarına göre belirlenen farklılıklar değerlendirilerek verildi. Tezin tartışma ve sonuç bölümünde, bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular daha önce yapılmış benzer çalışma bulguları ile karşılaştırıldı. Tezin son kısmı olan kaynaklar bölümünde ise tezin yazımı esnasında yararlanılan literatür bilgilerine yer verildi. Özgeçmiş bölümünde de tezin yazarı ile ilgili bilgiler sunuldu.

Hasta grubu, İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalına Venöz Tromboz tanısı ile gelen, birbirleri ile akrabalık ilişkisi olmayan, 45 yaş altı 20 bireyden oluşturuldu. Kontrol grubu da birbirleri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan ve kalp damar hastası olmayan 20 bireyden oluşturulmaya özen gösterildi.

Çalışmaya katılan tüm bireylerden 5 ml sitratlı ve 5 ml EDTA'lı tam kan alındı. Alınan sitratlı tüplerdeki kan numuneleri serum faktör VIII düzeyi belirlenmesi çalışmasında kullanıldı. EDTA'lı tüplerde alınan kan numunelerinde ise klasik DNA izolasyon yöntemleri kullanılarak genomik DNA'lar elde edildi. İlgili genin promotor bölgesi ve tüm ekson bölgeleri uygun primer çiftleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu koşullarında çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri tek zincir konformasyon analizi yöntemi ile incelenerek faktör VIII gen bölgesindeki mutasyon/polimorfizmlerinin belirlenmesi hedeflendi. SSCA jel bilgilerine göre, normal SSCA modellerinden farklılık gösteren DNA ürünleri otomatize DNA dizi analizi sistemi ile incelendi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. HEMOSTAZ

Kan pıhtılaşması, hemostaz (homeostasis) olarak adlandırılan vücut savunma mekanizmasının önemli bir parçasıdır. Kan; gaz transportu, metabolizma, immün savunma ve hormonlar yoluyla hücresel iletişim dahil birçok anahtar fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynar. Kan bu görevlerini yapmak için sıvı halini sürdürmek zorundadır. Kanın diğer bir hayati işlevi yaralanmayı takiben vasküler endotel, dolaşan trombositler ve pıhtılaşma (koagülasyon) faktörleri denilen karmaşık enzim serileri arasındaki etkileşimler yoluyla kan pıhtılaşmasını sağlamaktır. Bütün bu aktivitelerin toplamı hemostaz adını alır. Hemostaz 3 ana elementten oluşur (Guyton ve Hall, 1996; Ulutin, 1997).

1. Vasküler endotel
2. Trombositler
3. Pıhtılaşma sistemi

2.1.1. Vasküler Endotel

Kan damarlarının çeperi pek çok önemli biyolojik işleve sahip olan endotel hücrelerinin ince bir tabakasından oluşmuştur. Damar endoteli trombojenik olmayan bir iç yüzey oluşturduğu gibi seçici bir geçirgenlik işlevini de üstlenir. Travma ve bazı damar hastalıklarında bu yüzeyin bozulması trombositlerin ve pıhtılaşma sisteminin aktivasyonuna izin veren değişikliklerle sonuçlanır.

Damar endotel hücrelerinin dış membranı antitrombotik özelliklerden sorumludur. Hücre membranının yüzeyi heparan sülfat gibi kompleks mukopolisakkaritlerinden oluşan glikokaliks denilen özel bir tabaka ile kaplıdır. Heparan sülfat, antitrombin III (ATIII) denen doğal antikoagülanı üretmektedir. ATIII antikoagülan etkisini, fibrinojeni fibrine dönüştürmekten sorumlu enzim olan trombinin inhibe ederek gösterir. Dış membran ayrıca bazı reseptörleri içerir. Trombomodulin böyle bir membran

reseptörüdür, trombinle etkileşir ve protein C denen doğal antikoagülanın aktif hale dönüşmesinde rol oynar. Aktive olan Protein C, Faktör V ve VIII'i inaktive eder ve damar endotelini uyararak doku plazminojen aktivatörünün (Tissue Plasminogen Activator:TPA) salgılanmasını sağlar. TPA, plazminojenin plazmine dönüşmesinde görev alan önemli bir maddedir. Plazmin ise fibrinin parçalanmasından sorumlu olan proteolitik bir enzimdir. Damar endoteli ayrıca prostasiklin ve diğer antitrombotik özellikleri ileleten maddelerin üretiminden sorumludurlar. Prostrasiklin, trombosit aktivasyonuna ket vurarak kan damarının çapını artırır ve vazodilasyonu uyarır. Endotel hücreleri hemostazda önemli diğer maddeleri de üretirler. Bunlar arasında travma sonrası hasarlı subendotel ile trombositlerin etkileşiminde önemli olan kollagen tip IV gibi kollagen molekülleri sayılabilir. Fibronektin gibi nonkollagen tip proteinler hücre aglutinasyonu, agregasyonu ve adezyonunda rol oynarlar. Damar endotel hücreleri ayrıca FVIII'i de kısmen sentezlerler. Dolaşan FVIII molekülü bimoleküler bir kompleks yapı olup, prokoagülan özelliği vardır ve Von Willebrand faktör (Von Willebrand Factor:VWF) adını alır. VWF, aktive olmuş trombositlerin membranı üzerinde özgün bir reseptörle etkileşerek hemostazda kritik rol oynar böylece trombosit adezyonu kolaylaşır (Emerk, 1994; Noll ve Lusener, 1995; Ulutin, 1994).

2.1.2. Trombositler

Dolaşımdaki trombositler hemostazın sürdürülmesinde ana elementlerdir. Fonksiyonları travma sonrası değişik subendotelyal yapılarla etkileşim üzerine odaklanmıştır. Damar hasarı trombositlerin adezyon, aktivasyon ve agregasyon olaylarını başlatır. Hemostatik tıkaç (trombosit tıkaçı) kanamanın mekanik olarak durdurulmasına neden olur ve yüzeyde fibrin oluşturan değişik koagülasyon faktörleri gibi davranır. Kanamanın uzun süreli durdurulması ve yaranın iyileşmesi için ayrıca fibrin, eritrosit ve trombosit de gereklidir. Trombositler 2-3 mm çapındaki küçük hücrelerdir. Kemik iliği veya diğer hematopoetik yerlerde megakaryosit adı verilen dev öncü elementlerden oluşurlar. Trombositlerin çekirdeği yoktur ve hücre gelişiminin son aşamasını temsil ederler. Hemostazda önemli pek çok sitoplazmik yapı içerirler. Trombositler milimetreküpte 150.000–450.000 arasında bulunur. Dolaşan trombositlerin hasarlı damar endoteli ile ilişkisi trombositleri aktive eden bir seri reaksiyonun başlamasına neden olur ve hemostatik bir tıkaç oluşumuna yol açar.

Trombositler mitokondri, mikrotübüller, mikrofilamentler, glikojen granülleri ve α -granül ile yoğun cisimcikler (ATP, ADP, iyonize kalsiyum, histamin, serotonin ve epinefrin) adı verilen depolama organellerini içerir. Trombositte özgü proteinler Beta tromboglobulin, trombospondin, trombosit faktör 4, trombosit kökenli büyüme faktörü, kemotaktik faktör ile bakterisidal faktörlerdir. Plazma proteinleri (albumin, fibrinojen, FV, FVIII, VWF, fibronektin) yüzey etkileşimleri veya membran sistemi yoluyla dolaşan kandan trombositin içerisine emilirler. Yoğun cisimcikler içerisindeki nukleotid öncüleri gerekli enerjinin oluşumu ve membran aktivitelerini sağlarlar.

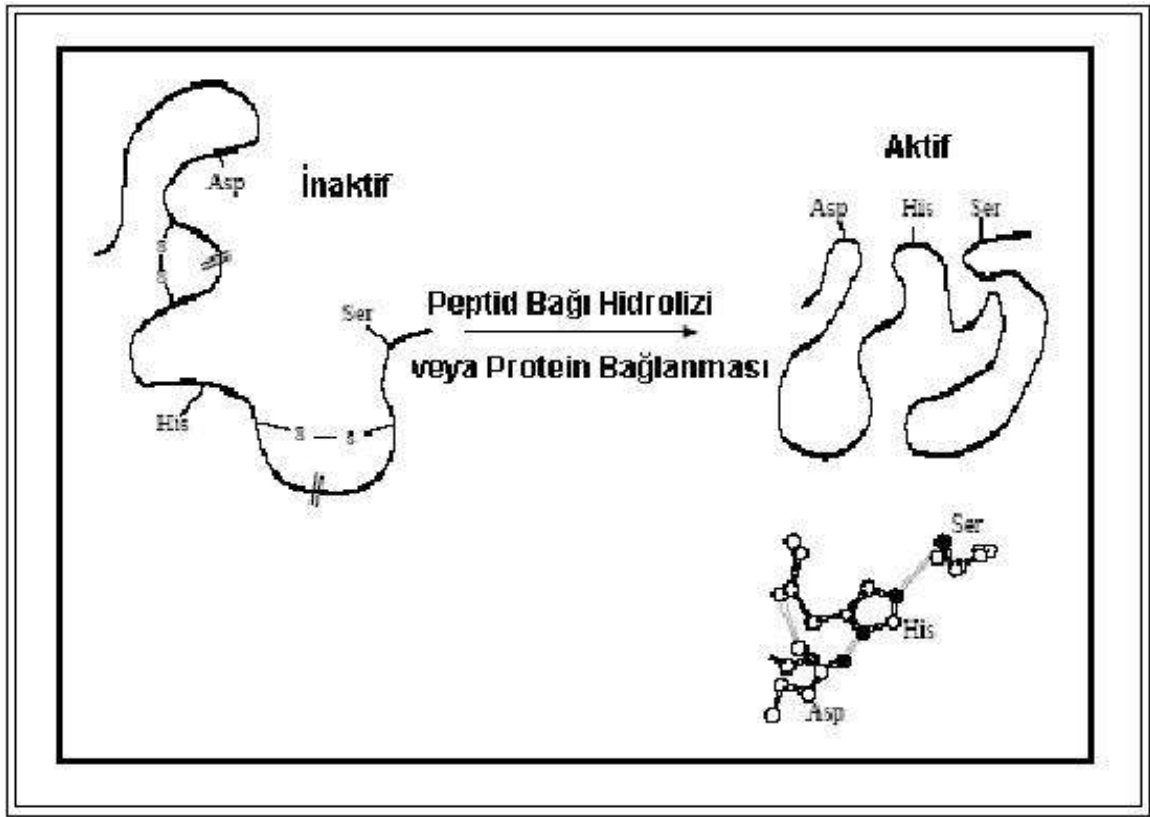
Normalde insan trombosit kanda yaklaşık 10 gün dolaşır ve sonra Retikulo Endotelial Sistem (RES) tarafından kaldırılır. Vasküler hasar trombosit yanıtı denilen bir dizi olayı başlatır. Belirli subendotelial yapılarla (kollagen, elastik doku) birleşen damar endotel hücrelerinin bozulumu trombosit adezyonunu uyarır. Trombosit adezyonu VWF'nin trombosit membranı ile etkileşmesiyle düzenlenir. Adezyon sonrası trombositler salgılama reaksiyonunu kolaylaştıran bir biçim değişikliğine uğrar, α -granüller ve yoğun cisimcikler yüzey sistemi içine bileşenlerini salarlar ve bu bileşenler trombosit membranlarının içi ve çevresine yerleşir. Agregasyon hemostatik tıkaçın oluşumuyla sonuçlanır ve değişiklikler koagülasyon faktörlerinin fibrin oluşturmak için etkileşeceği yüzeye destek verir. Hemostatik tıkaç daha sonra kan pıhtısına dönüşür (Lee ve diğ., 1993; Terzioğlu ve diğ., 1993; Ulutin, 1976).

2.1.3. Pıhtılaşma (Koagülasyon) Sistemi

Pıhtılaşma olayı, sıvı haldeki kanın akamaz duruma gelmesi, katılaşmasıdır. Pıhtılaşma süreci değişik plazma proteinlerinin etkisiyle düzenlenir. Bu koagülasyon proteinleri kofaktörler, fosfolipid ve Ca iyonları ile birlikte enzimatik reaksiyon serilerinde rol oynarlar. Pıhtılaşma reaksiyonu üç sisteme bağlı olarak gelişir. Bunlar endojen yol [faktör VIII, IX, XII, prekallikrein, yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (High Molecular Weight Kininogene:HMWK)], ekzojen yol (faktör VII ve doku faktörü) ve ortak yol (faktör II, V, X ve fibrinojen) dur. Endojen sistem, dolaşan kanda bulunan prokoagülan yapılardır. Diğer taraftan ekzojen sistem, dolaşan kanda bulunan enzimleri ve vücut dokularından kökenlenen enzimleri kullanır. Her iki yolda, bir grup enzim kofaktör ve iyondan oluşan ve protrombini aktif trombine dönüştüren protrombinaz

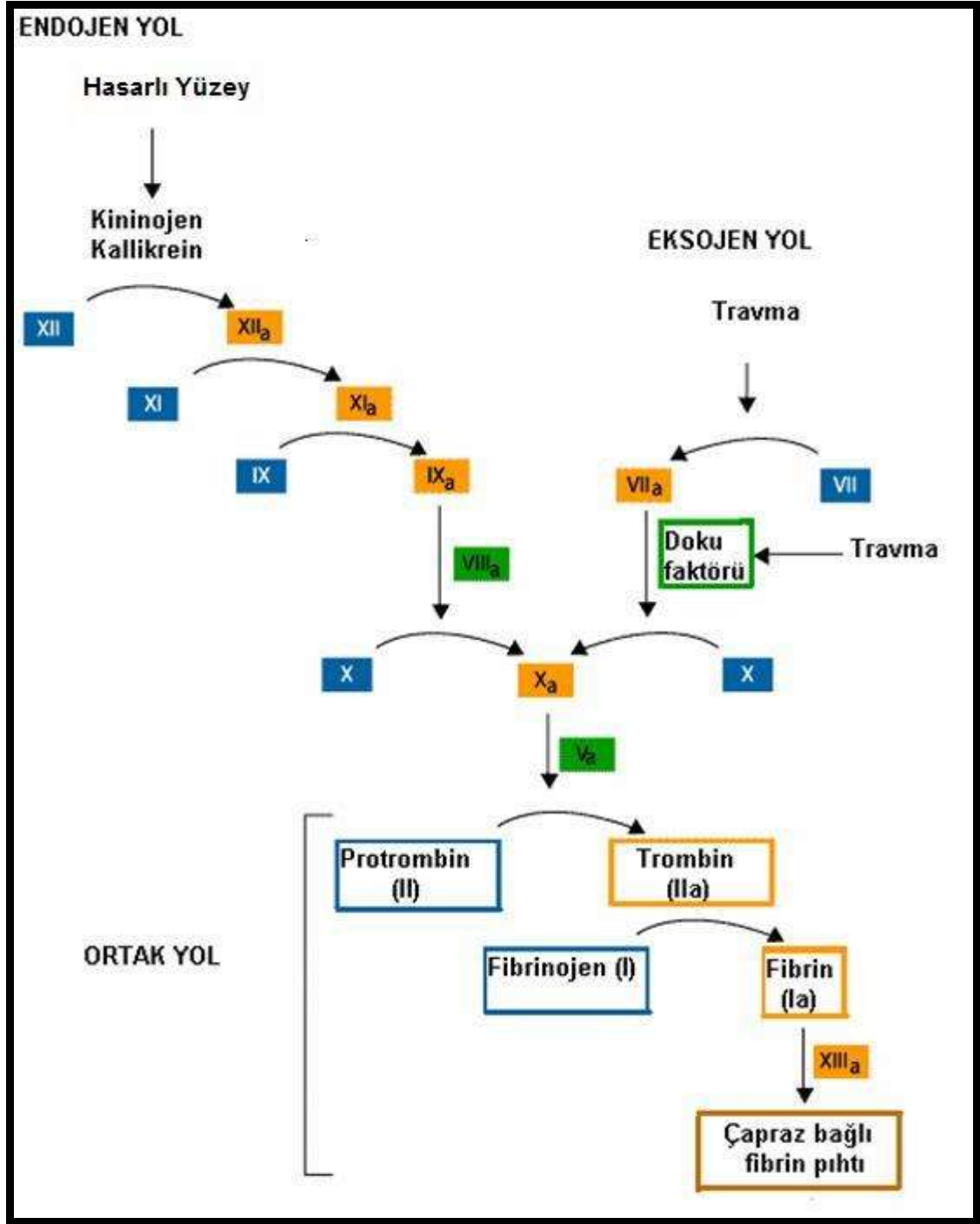
kompleksi adı verilen kompleksi oluşturur. Sonra aktiflenmiş trombin fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalizler (Ulutin T, 1997).

Pıhtılaşma olayı, zimojen (inaktif enzim öncüsü) aktivasyonu reaksiyonları serisidir (Şekil 2.1) (Tollefen, 2006). Her bir kademede zimojen, peptid bağlarının kesilmesi ile aktif proteaza dönüştürülmektedir. Bu kademelerde; proteazlar, zimojenler, kofaktörler, kalsiyum iyonları ve *in vivo* trombositler ile *in vitro* fosfolipid bileşenleri tarafından oluşturulan yüzeyler rol oynamaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.1: İnaktif proteinin proteolitik kesim veya başka bir proteinin bağlanması ile aktif hale gelmesi (Tollefen, 2006).

Hidroliz disülfid(S-S) bağların kesmekte ve aktif faktörde His (Histidin), Asp (Aspartat) ve Ser (Serin) bakiyeleri aynı hizaya gelmektedir (Tollefen, 2006).



Şekil 2.2: Kan Pıhtılaşma Kademeleri (Berg ve diğ., 2001)

Fibrin pıhtı endojen, eksojen ve ortak yolda görev alan pıhtılaşma faktörlerinin birlikte iş görmeleri ile şekillenmektedir. Endojen yol, faktör XII (Hageman faktör)'nin hasarlı bir damar yüzeyi ile temasa geçip aktif olması ile başlamaktadır. Eksojen yol, travma ile tetiklenmektedir, bu durum faktör VII'nin aktif olmasına ve kan damarlarından doku faktörü adı verilen bir lipoprotein salınımına neden olmaktadır. Kan pıhtılaşma kademelerinde, pıhtılaşma faktörülerinin inaktif formları mavi, aktif formları ise sarı ("a" ile belirtilmektedir) renk ile gösterilmektedir. Reaksiyonu teşvik eden kofaktörler yeşil renk ile gösterilmektedir. Bu sürecin en çarpıcı özelliği; bir pıhtılaşma faktörünün aktif formunun bir sonraki pıhtılaşma faktörünün aktiasyonunu katalizlemesidir (Berg ve diğ., 2001).

Kan pıhtılaşma kademelerinde görev alan faktörler ve moleküler ağırlıkları Tablo 2.1'de verilmektedir.

Tablo 2.1:Pıhtılaşma faktörleri ve moleküler ağırlıkları (Tollefen, 2006)

Faktör	Moleküler Ağırlığı (Dalton:Da)
Fibrinojen	330.000
Protrombin	72.000
Faktör V	300.000
Faktör VII	50.000
Faktör VIII	300.000
Faktör IX	56.000
Faktör X	56.000
Faktör XI	160.000
Faktör XIII	320.000
Faktör XII	76.000
Prekallekrein	82.000
HMWK	108.000

2.1.3.1. Endojen Yol

Kan koagülasyonunun endojen yolu, kontakt aktivasyon denen bir süreç tarafından başlatılan enzimatik reaksiyonlar dizisidir (faktör XII'nin (FXII) aktivasyonu üzerinde merkezlenen bir yüzey ve yük süreci, Şekil 2.2). Fizyolojik olarak, kontakt aktivasyon vasküler travma tarafından başlatılan uyarılar ile oluşur. Bağ doku elementlerinin (kollagen) bozulumu ve açığa çıkması, FXII'nin zimojen formunun aktif enzim şekline dönüşmesi buna destek sağlar. İnaktif FXII, prekallikrein ve yüksek moleküler ağırlıklı kininojen denilen 2 proteinle temas ederek aktifleşir. FXII aktivasyonunun kan koagülasyon süreci üzerine pek çok özgün etkisi vardır. Faktör XI (FXI), inaktif zimojeni aktif serin proteaz olan FXIa'ya dönüşür. Bu aktifleşmiş koagülasyon faktörleri de faktör IX (FIX) zimojenini aktif enzim FIXa şekline dönüştürür. Aktiflenmiş FIX, iyonize kalsiyum, fosfolipidler ve aktiflenmiş FVIII ile beraber, protrombinaz kompleksinde anahtar bir başlatıcı olan faktör X'u (FX) FXa'ya dönüştürür. Ayrıca FXII'nin aktivasyonu, plazminojen aktivasyonu yoluyla gerçekleşen fibrinolizis denen bir süreçle depolanmış fibrinin parçalanmasını kolaylaştırır. Öncü protein olan plazminojen, fibrinin yıkımında önemli bir enzim olan plazmine dönüşür. Aktiflenmiş FXII, faktör VII'yi (FVII) FVIIa'ya dönüştürerek kan koagülasyonunun ekzojen yolla etkileşmesini sağlar (Ulutin, 1997).

2.1.3.2. Ekzojen Yol

Ekzojen yolun aktivitesi FVII ve faktör III'ün (FIII) (doku faktörü) etkileşimleri üzerine odaklanmıştır (Şekil 2.1). FVII, dolaşan plazmada az miktarda bulunan K vitamini bağımlı bir proteindir. Hem zimojen hem de aktiflenmiş formlarında prokoagülan aktiviteye sahip olması bakımından serin proteazlar arasında tektir. Bu özellik FVII'nin kan koagülasyonunda önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Doku faktörü de diğer koagülasyon faktörleriyle karşılaştırıldığında farklıdır ve bu madde dolaşım sistemi dışında beyin, böbrek, dalak ve damar endotel hücrelerinde de bulunmaktadır. Hem protein hem de lipid elementlerine sahiptir. Doku faktörünün protein kısmı çeşitli fosfolipidlerle etkileşme yeteneğindedir ve FVII'nin FVIIa'ya dönüşümünü katalizler.

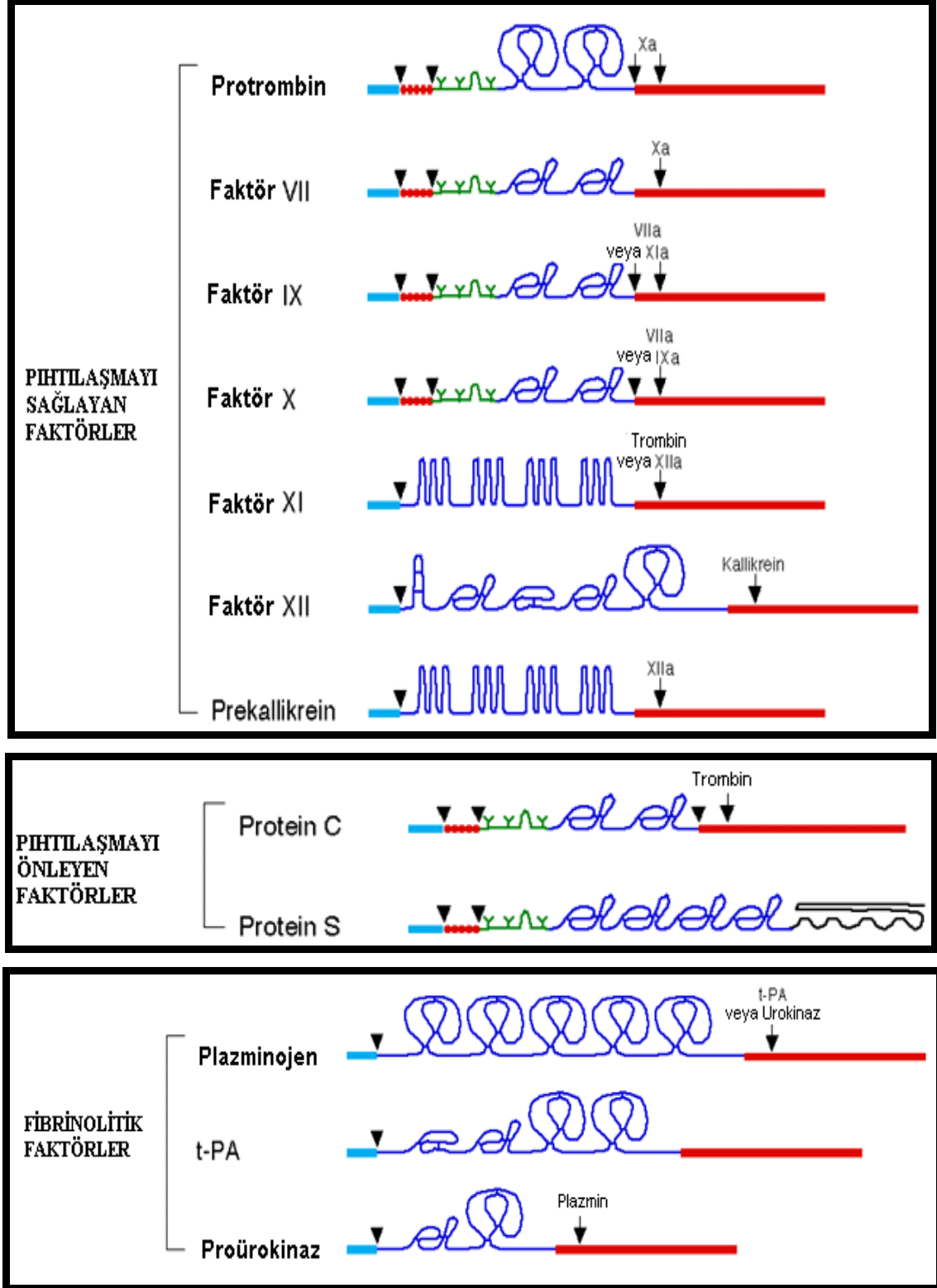
Ekzojen yolun başlıca rolünün, FVII'nin aktivasyonu ile kan koagülasyonunun başlangıcında olduğu bilinmektedir. Aktiflenmiş FVII, doğrudan doğruya FX zimojenini, protrombinaz kompleksi için önemli bir bileşen olan aktif enzim şekline dönüştürür. Bu önemli enzim reaksiyonu, endojen yolda FIX'un FIXa'ya dönüştürme yeteneği dolayısıyla dolaylı olarak katalizler. Böylece FXa'nın miktarı her iki aktivitenin tamamını temsil eder (Ulutin, 1997; Lee ve diğ., 1993).

2.1.3.3. Ortak Yol

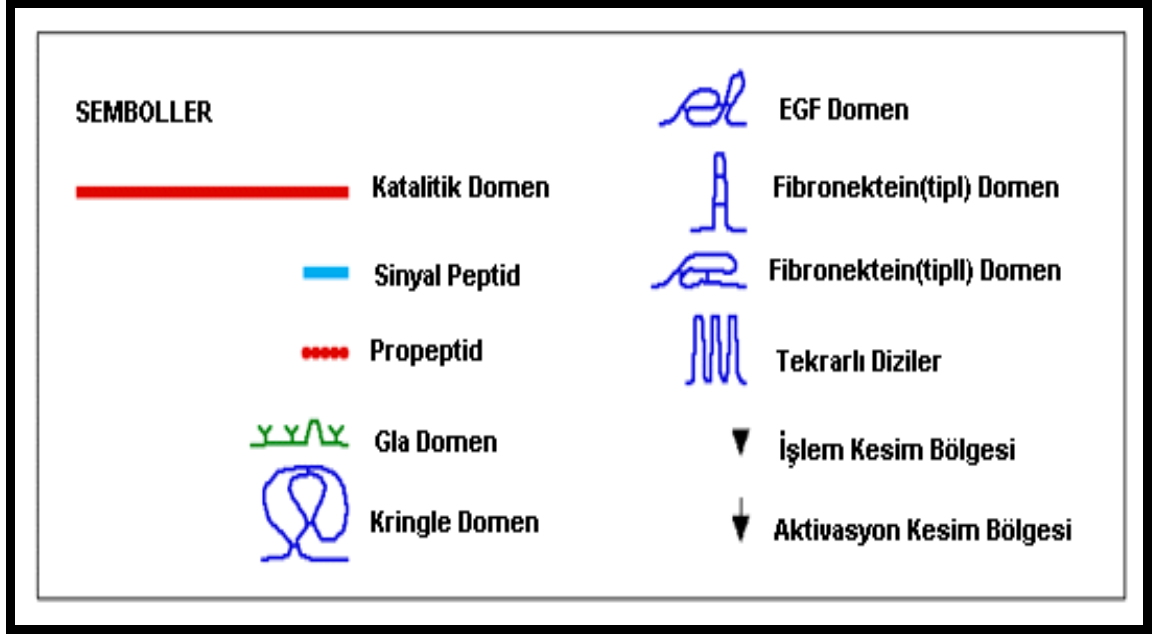
Kan koagülasyonunun hem endojen hem de ekzojen yollarının son aktivitesi FX'un aktivasyonudur. FX'un aktiflenmesinden sonra olan reaksiyonlar ortak yol adını alır. Aktiflenmiş FX, protrombinaz kompleksi denen bir grup molekülü oluşturmak için FII, FV, Ca iyonları ve trombosit fosfolipidleri gibi diğer prokoagülanlarla birleşir. Protrombinaz kompleksi protrombinin trombine dönüşümünü katalizler. Trombin dolaşan fibrinojeni fibrine dönüştürür. Koagülasyon süreci faktör XIII'ün (FXIII) etkisi sonucu fibrin stabilizasyonu ile sonlanır (Guyton ve Hall, 1996; Ulutin, 1976).

Pıhtılaşmaya katılan bazı proteaz zimojenlerin yapısı (protrombin, FVII, FIX, FX, FXI, FXII, ve prekallikrein vb.) Şekil 2.3'te gösterilmektedir. Her bir protein, karaciğerden salınmakta ve bir sinyal peptid taşımaktadır. Bu sinyal, onun endoplazmik retikulum (ER)'a taşınımı sırasında ortadan kaldırılmaktadır. Her bir zimojenin karboksil ucunda (C ucu) yaklaşık olarak 200 amino asit bakiyesi tripsine benzerdir. Bu bölge Ser, Asp ve His bakiyeli proteazın aktif bölgesini (katalitik domein) içermektedir. Proteinler, epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor:EGF) ve fibronektin gibi diğer

proteinlere benzer çeşitli domeinlerde içermektedir. Bu domeinler, proteazlar ve onların substratları, kofaktörleri ve/veya inhibitörleri arasındaki özgün etkileşimleri sağlamaktadır (Tollefen, 2006).



Şekil 2.3: Pıhtılaşma faktörlerinin yapısının şematik olarak gösterilmesi (Tollefen, 2006).



(Şekil 2.3'ün devamı)

2.1.4. Hemostazda Biyolojik Kontrol

İnsan vücudunda oluşan bir hasarın sınırı, vasküler endotelin hasarından, ana kan damarlarının yaygın travmasına kadar uzanır. Uygun fizyolojik yanıtlar, hemostazın sistemik aktivasyonu olmadan, lokal olarak yara yerinde oluşur. Fizyolojik denge, değişik biyolojik kontrol mekanizmaları içeren hemostatik mekanizmaların damar endoteli, trombositler ve kan koagülasyon sistemi üzerine etkileri ile sağlanır. Damar endoteli, trombositler ve koagülasyon sistemi hemostatik yanıtta işlev görür. Bu yanıtları kontrol eden çok sayıda biyolojik kontrol mekanizması bulunmaktadır. Bu mekanizmaların en önemlileri;

1. "Geri-bildirim" inhibisyon
2. Fibrinolizis
3. Doğal inhibitörlerdir.

2.1.4.1. "Geri-bildirim" İnhibisyon

Özel bir enzim ürünü, kendisinin ve diğer ürünlerin oluşumunu bir veya daha çok reaksiyon üzerine ilerletici (pozitif "geri-bildirim") ya da ket vurucu (negatif "geri-bildirim") yönde etki ederek düzenleyebilir. Biyokimyasal düzeyde, "geri-bildirim" mekanizmalar iki ana yol izler. Birinci tip "geri-bildirim", özel bir yoldaki veya

enzimatik reaksiyon dizisindeki ana reaksiyonu değiştiren bir ürünün değişimiyle sonuçlanır. İkinci mekanizma, özel bir yol içerisinde diğer enzimlere bağlanan aşırı bir enzim ürününün üretimini kapsar, böylece daha ileri kademelerdeki reaksiyonlara ket vurulur. Kan pıhtılaşmasında “geri-bildirim”in klasik örneği vücutta trombinin duyarlı biçimde kontrol edilmesidir. Trombin kan koagülasyonunun başlangıcında düşük konsantrasyonlarda oluştuğu için, FV ve FVIII’in oluşum ve aktivitesi üzerine pozitif bir etkisi vardır. Koagülasyon ilerledikçe, daha yüksek konsantrasyonlarda trombin oluşurmaya başlar.

Kan koagülasyonundaki “geri-bildirim” mekanizmaların diğer örnekleri, FXa ve FVII, FVIIa ve FXII, trombin ve FXIII arasındaki etkileşimlerdir. Ayrıca FXII’nin aktivasyonu ve prekallikrein’in kallikreine dönüşümü arasında benzer bir ilişki vardır (Ulutin T, 1997).

2.1.4.2. Fibrinolizis

Vücutta fibrin birikimi fibrinolizis denen karmaşık bir mekanizma tarafından düzenlenir. Bu enzim sistemi fibrinin kimyasal parçalanmasıyla kan pıhtısını eritir. Fibrinolizis plazmin denen proteolitik bir enzimin üretimiyle düzenlenir. Etkinleşmiş plazmin öncü bir glikoprotein olan plazminojenden köken alır. Saf plazminojen sınırlı proteoliz ile plazmine dönüşür. Bu dönüşüm doku plazminojen aktivatörü, ürokinaz ve streptokinaz dahil olmak üzere çeşitli biyolojik maddeler tarafından uyarılır. Kan koagülasyonu sırasında, plazminojen ve trombin trombus oluşumunda bir araya gelir. Plazminojen önce fibrine zayıf olarak bağlanır. TPA gibi aktivatörler pıhtının matriksi içine girer ve plazminojenin fibrine bağlanmasını hızlandırırlar ve böylece plazmine dönüşüm kolaylaşır. Bütün bu aktivite α_2 -antiplazmin inhibitörü tarafından plazminin nötralizasyonunu önleyen kan pıhtı alanı içerisinde yer alır (Guyton ve Hall, 1996; Francis ve Marder. 1987; Kane, 1984).

2.1.4.3. Doğal İnhibitörler

Antikoagülan bir etki gösteren ve doğal olarak oluşan çok sayıda protein inhibitörü vardır ve bu durum kan pıhtılaşmasının biyolojik kontrolüne yardımcı olur. Bunlar ATIII, Protein C-S sistemi, α_2 -antiplazmin, α_1 -antitripsin, α_2 -makroglobulin ve C-1 inhibitör gibi inhibitör sistemleri kapsar. Bu inhibitörlerin vücuttaki üretimi

prokoagülant substratları nötralize etmek için yeterlidir. İnhibitörler sağlıklı koşullarda aşırı aktive olmuş prokoagülanları hızla ve etkin bir şekilde nötralize eder ve böylece pıhtılaşma sürecini düzenler. Bu inhibitörlerin kazanılmış veya konjenital yokluğu hastanın trombotik bozukluklara eğilimi olmasına neden olur (Witt, 1985).

2.2. TROMBOZ

Kanamaya neden olan bozukluklar yüzyıllardır bilindiği halde, bunun tersi yani tromboza neden olan bozuklukların tanımı oldukça yenidir. Rudolph Virchow'un 1856'da tarif ettiği triad hala geçerli olup buna göre tromboz gelişiminde 3 faktör rol oynamaktadır (Chung ve Gregory, 2003/2004).

1. Damar hasarı
2. Kan akımında yavaşlama
3. Kanın bileşimindeki değişiklikler

Ailesel trombozlar yüzyılın başından itibaren dikkat çekmeye başladığı halde, pıhtılaşma sistemindeki bilgilerin netlik kazanması ile birlikte ancak 1960'lardan sonra kalıtsal trombofililer aydınlatılmaya başlanmıştır. İlk olarak 1965'de antitrombin eksikliğinin tromboza eğilim yaptığı gösterildi. Daha sonra 1981'de protein C ve 1984'de protein S eksikliği saptandı (Ido ve diğ., 1996). Fakat bu üç kalıtsal eksiklik trombozların ancak %10-15'ini oluşturmaktadır. Dahlback'ın 1993'de aktif protein C (APC) direncini ve 1994'de Bertina'nın faktör V Leiden mutasyonunun tanımlaması ile kalıtsal tromboz nedenlerinin % 20 kadarı anlaşılmış oldu (Couture ve diğ., 1998). Homosistein metabolizmasının tromboza etkisi 1994'de açıklandı. Protrombin genindeki mutasyon sonucunda oluşan trombozlara ise 1996'dan itibaren tanı koyulmaya başlandı. Faktör düzeylerinde yükseklik ve tromboz ilişkisi ise 2000'li yıllarla birlikte gündeme geldi. Tüm bu buluşlara karşın günümüzde kalıtsal temelli trombozların %40-60'ında neden gösterilememektedir (Couture ve diğ., 1998; Emerk, 1994).

Klinik çalışmalar ve toplum taramaları kalıtsal tromboz nedenlerinin hemen hemen tamamının venöz tromboza eğilim yarattığını göstermektedir (Allaart ve diğ., 1993; Mannucci ve diğ., 1999). Genetik faktörleri taşıyan bireylerde de tromboz riski artmakla

birlikte bazen trombotik atak geçirmemeleri de olasıdır. Bu durum tek başına kalıtsal nedenlerin yeterli olmadığını tromboz gelişiminde bazı çevresel faktörlerin de katkısı olduğunu göstermektedir (Laffan ve Tuddenham, 1998; Lane ve diğ., 1996; Walker, 2000)

2.2.1. Çevresel Tromboz Nedenleri

- İleri yaş
- Damarsal bozukluklar: ateroskleroz, *diabetes mellitus*, vaskülitler (Behçet hastalığı vs.), prostetik materyaller (Bick ve Kaplan, 1998).
- Reolojik bozukluklar
 - a) Staz (immobilizasyon, cerrahi girişimler, bazı kalp yetersizlikleri, gebelik (Walker, 2000; Reitsma ve diğ., 1995).
 - b) Hiperviskozite (myeloproliferatif hastalıklar, Waldenström makroglobulinemisi, multipl myelom, orak hücre anemisi, akut lösemi)
- Trombosit fonksiyon bozuklukları (myeloproliferatif hastalıklar, paroksimal noktürnal hemoglobinüri) (Reitsma ve diğ., 1995).
- Hormonal değişiklikler (gebelik, postpartum dönem, östrojen ve türevlerinin kullanımı, oral kontraseptif kullanımı) (Martinelli ve diğ., 1999).
- Diğerleri: (obezite, hiperlipidemiler, antifosfolipid sendromu, yaygın damar içi pıhtılaşması, travma, maligniteler, (Trousseau sendromu), fibrinojen yüksekliği, nefrotik sendrom, inflamatuvar barsak hastalıkları, protrombin kompleksi konsantrasyonlarının kullanımı, trombotik trombositopenik purpura, heparine bağlı trombositopeni, radyoterapi, FVII yüksekliği, Von Willebrand faktör yüksekliği, ilaçlar) (Lane ve diğ., 1996; Bick ve diğ., 1998; Davie ve Reiner, 1995).

2.2.2. Kalıtsal Trombozda Yer Alan Faktörler

Kalıtsal venöz trombozda çoğunlukla pıhtılaşma sistemini kontrol altında tutan doğal inhibitör mekanizma bozukluklarının rol oynadığı gösterilmiştir. Bu risk faktörlerinden en iyi tanımlanan aktif protein C resistansı, protein C, Protein S, antitrombin III eksiklikleridir. İlk trombotik epizotla gelen hastaların yaklaşık yarısında bu eksikliklerden birinin trombozda altta yatan etken olduğu gösterilebilmektedir (İliçin ve diğ., 1996; Laffan ve Tuddenham, 1998).

Tablo 2.2: Kalıtsal venöz tromboz nedenleri

KALITSAL TROMBOZ NEDENLERİ		
Bozukluk	Toplum sıklığı	Trombozda sıklık
Protein C eksikliği	% 0.2	% 3
Protein S eksikliği	% 0.1	% 1-2
Antitrombin eksikliği	% 0.02	% 1
APC direnci	% 3-6	% 20
Hiperhomosisteinemi	% 5-10	% 10-25
Protrombin 20210 alleli	%1-2	% 6
FVIII yüksekliği	% 11	% 25

Nadir Rastlanan Tromboz Nedenleri:

- Disfibrinojenemi
- Hipo-displazminojenemi
- Heparin kofaktör II eksikliği
- Histidinden zengin glikoprotein eksikliği veya yüksekliği
- FXII eksikliği
- Plazminojen aktivatör inhibitör düzeyi yüksekliği
- Doku plazminojen aktivatör eksikliği
- Trombomodulin gen mutasyonları (İliçin ve diğ., 1996).

2.2.2.1. Protein C Eksikliği

Protein C 1960/1961'de ilk kez Seeger'in laboratuvarında Mammen ve diğ. tarafından bir laboratuvar çalışmasında izole edilmiş ve Autoprotrombin II antikoagulan diye adlandırılmıştır. 1976'da Stenflo plazmadan K vitamini bağımlı yeni bir faktör izole etti ve bu proteini kromatografide 3'üncü fraksiyon olan C fraksiyonunda elde ettiği için buna protein C adını verdi (Amiral ve Martinoli, 1985). Seeger laboratuvarında Stenflo'nun proteini ile Mammen ve diğ. Autoprotrombin IIA'sını karşılaştırarak bunların aynı madde olduğunu gösterdi. Bugün Autoprotrombin IIA yerine protein C terimi tercih edilmektedir (Ulutin, 1997).

Protein C bir serin proteaz olup, 62.000 Da moleküler ağırlığında, iki polipeptid zincirinden oluşur. Hafif zincir 155 aminoasit, ağır zincir 262 aminoasit olmak üzere protein toplam 417 aminoasitten oluşmuştur (Miyata ve diğ., 1996). Protein C karaciğerde yapılan K vitamini bağımlı bir proteindir. Karaciğerde inaktif öncül olarak sentezlenir ve β -hidroksilasyon, γ -karboksilasyon ve glikolizasyon sonrası disülfid bağları ile birbirine bağlı olan çift zincirli olgun protein olarak kana salgılanır (Reitsma ve diğ., 1995; Couture ve diğ., 1998). Trombin, protein C'yi Arg 159 ile Leu 170 noktalarından keserek 12 aminoasitlik bir bölgeyi ayırır ve protein C'yi aktif hale getirir. Aktif protein C (APC) faktör Va ve faktör VIIIa'yı inhibe eder (Couture ve diğ., 1998; Soria ve diğ., 1996., Ireland ve diğ., 1996).

Protein C geni 2. kromozomda q13-14 bölgesinde bulunup 11.2 kb DNA uzunluğundadır. 9 ekson ve 8 introndan oluşmaktadır. Diğer K vitamini bağımlı proteinlerle yapı ve dizi homolojisi gösterir (Davie ve Reiner, 1995; Kario ve diğ., 1998). Protein C molekülünde, aktivasyon, aktif bölge, protein substrat bağlama, protein S (kofaktör bağlama) ve yüzey bağlanma bölgesi olmak üzere en az beş işlevsel bölge vardır (Marlar ve Mastovich, 1990).

Kalıtsal Protein C eksikliğine bağlı tromboz eğilimi ilk kez 1981 yılında tanımlanmıştır (Zheng ve diğ., 1994). Genetik geçişi genellikle otozomal dominant biçiminde olan protein C eksikliğinin iki tipi vardır. Tip I' de proteinin moleküler yapısı normal olup antijenik aktivitesi düşüktür. Tip II' de ise antijenik protein C miktarı normal olup molekül bozuk ve işlevsizdir (İliçin ve diğ., 1996; Doig ve diğ., 1994; Millar ve diğ., 1995). Bugüne kadar protein C geninde 160 farklı mutasyon tanımlanmıştır (Reitsma ve diğ., 1995). Protein C'nin plazma normal değerleri her iki cinsten 18-60 yaş gurubunda % 70 –140 arasında olup yeni doğan ve 12 yaş öncesi gurupta daha düşük değerdedir. Protein C eksikliği bulunan hastaların çoğu tip I heterozigottur. Bunlarda protein düzeyi % 50 civarında, homozigotlar da ise % 0' a yakındır ve ağır trombotik bozukluk vardır. Venöz tromboz ya da akciğer embolisiyle başvuran hastaların % 6-10'unda kalıtsal protein C eksikliği görülmüştür, eksikliğin genel toplumda sıklığı 200–300'de bir olarak tahmin edilmektedir (İliçin ve diğ., 1996).

2.2.2.2. Protein S Eksikliği

Protein S ilk kez 1977 yılında Discipio tarafından tanımlanmış olup protein, 70.000 Da moleküler ağırlığında 635 aminoasit büyüklüğünde, sentezi K vitaminine bağımlı tek zincirli bir plazma glikoproteinidir (Bick ve Kaplan, 1998; Lippincott,1999). Karaciğerde, endotel hücrelerinde, megakaryositlerde ve testis leyding hücrelerinde sentezlenir. Normal bireylerde plazma konsantrasyonu 25 µg/ml'dir (Davie ve Reiner, 1995). Protein S aktif protein C'nin FVa ve FVIIIa'yı inaktivasyonunda enzimatik olmayan kofaktördür. Plazmada %40'ı serbest, %60'ı C4b bağlayıcı protein ile bağlı olarak dolaşır (Emerk, 1994; Doig ve diğ., 1994). Sadece serbest kısmı aktive protein C'ye kofaktörlük yapar. Protein S protein C'den bağımsız olarak kendisi de tenaz ve protrombinaz komplekslerini inhibe edebilir, bu reaksiyon aktif protein C'den bağımsızdır. Protein S ayrıca tirozinkinaz reseptörüne ve damar düz kas hücrelerinde özgün reseptörlere bağlanarak hücre çoğalmasına katılır. Protein S geni 3. kromozomda 3p11.1-3p11.2 bölgesinde bulunmaktadır (Bick ve Kaplan, 1998).

Trombozdaki risk faktörlerinden biri de protein S (PS) eksikliğidir. Otozomal dominant kalıtım gösterir (Bick ve Kaplan, 1998). Kalıtsal PS eksikliğine bağlı tromboz eğilimi ilk kez 1984 yılında tanımlanmıştır. Açıklanamayan venöz trombozla başvuran 45 yaş altındaki hastaların %5-10'unda kalıtsal PS eksikliği bulunur. Hastalığın en sık şekli olan tip I PS eksikliğinde total PS antijeni ve PS aktivitesi birlikte azalmıştır. Tip IIa'da serbest PS düzeyi düşük, total PS düzeyi normaldir. Tip IIb'de ise yalnızca PS aktivitesi düşüktür. Nadir varyant tip III PS eksikliklerinde çeşitli moleküler bozukluklar vardır. C4b BP düzeyindeki değişiklikler de serbest PS oranı dolayısıyla PS aktivitesini etkiler (İliçin ve diğ., 1996, Davie ve Reiner, 1995).

Tip I PS: toplam ve serbest protein S miktarı azalmıştır.

Tip II PS: toplam ve serbest protein S normal, fonksiyonu bozuktur.

Tip III PS: toplam protein S normal, serbest protein S azalmıştır.

Protein S geninde 13'den fazla mutasyon bildirilmiştir (Küçükaya, 1999). Homozigot PS eksikliğinde, PC eksikliğinde olduğu gibi yenidoğan purpura fulminansı gelişebildiği gibi belirtisiz PS eksikliği de olabilir. Belirtili PS eksikliğinin kliniği, PC ya da AT III eksikliğinden farklı değildir. Tromboz ilk kez 25-30 yaşlarında görülür.

Olguların üçte ikisinde hastalığın başlangıcı 35 yaşından öncedir (Bick ve Kaplan, 1998). Toplumda sıklığı %0.1, trombozlularda %1-2 olup trombotik riski 10 kat artırmaktadır (Küçükkaya, 1999).

2.2.2.3. Antitrombin Eksikliği

İlk kez 1939 yılında Brinkhous tarafından tanımlanmıştır. Antitrombin (eski terminolojide antitrombin III) 58.000 Da moleküler ağırlığında 432 amino asitlik bir plazma glikoproteinidir (Ulutin, 1997). Serin proteaz inhibitörleri ailesinin bir üyesidir ve karaciğerde sentezlenir. Antitrombin trombinin primer inhibitörüdür, ayrıca diğer serin proteazları da (FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, kallikrein) inhibe eder ve dolayısıyla fibrin oluşumunun en güçlü fizyolojik inhibitörüdür (Walker, 2000; Lippincott, 1999; Linz, 1985). Etkisi heparin veya heparin benzeri moleküllerin varlığında yaklaşık 1000 kat artar (Walker, 2000). Antitrombin geni 1. kromozomda q23-q24 bölgesinde bulunup, 6 intron ve 7 eksondan oluşan 16 kb'lik bir gendir (Bick ve Kaplan, 1998).

Kalıtsal trombotik hastalıkların altında yatan neden olarak ilk tanımlanan durum ATIII eksikliğidir. Başlıca trombin ve FXa'nın inhibitörü olan ATIII'ün trombozlara neden olduğu, ilk olgunun yayınlandığı 1965 yılından bu yana bilinmektedir. Kalıtımı genellikle otozomal dominanttır, ancak değişik kalıtım şekilleri de tanımlanmıştır. Sıklığı 2000-5000'de bir olarak tahmin edilmektedir. Hastaların çoğu heterozigottur ve ATIII antijeni ve aktivitesi birlikte azalmıştır (tip I ATIII eksikliği). Trombinle birleşen bölgede değişikliğe neden olan tip II RS "Reactive Site" ATIII eksikliğinde ise antijen miktarı normal, ancak aktivite düşüktür. Bunlardaki moleküler bozukluk genellikle AT-III molekülünde tek amino asit değişikliğidir. Heparin bağlayan bölgede (Heparin Binding Site) değişikliğe neden olan mutasyonlarda (tip II HBS) ise tromboz nadirdir, ancak heparine bağlanma bozuktur, bu nedenle heparine direnç görülür (İliçin ve diğ., 1996; Letich ve diğ., 1987).

Tip II RS: Antitrombin' in 'reaktif bölge' bozukluğu (11 mutasyon tanımlanmıştır).

Tip II HBS: 'Heparin bağlanma bölgesi' bozukluğu (11 mutasyon tanımlanmıştır).

Tip II PE: 'Pleotropik etki' çok işlevli bozukluk (9 mutasyon tanımlanmıştır) (İliçin ve diğ., 1996).

Homozigot antitrombin eksikliği henüz bildirilmemiştir ve büyük olasılıkla yaşamları bağdaşmamaktadır (Ulutin,1997; Linz, 1985). Genel populasyonda prevalansı

olan hastalarda yaklaşık olarak %20 civarındadır (Bloemankamp ve diğ., 2000; Rosendaal ve diğ., 2002).

Protrombin ve faktör V Leiden mutasyonlarını heterozigot olarak taşıyan bir bireyde, tromboz riskinin yaklaşık olarak 20 kez (Townson-Dizon ve diğ., 1997) ve bu mutasyonları taşıyan bir kadında hamilelik sırasındaki riskin ise 100 kez (Murphy ve diğ., 2000) arttığı bildirilmektedir. Ayrıca faktör V Leiden gibi kalıtsal trombofili bozuklukları olan kadınlarda, bir yıl süreli doğum kontrol hapı kullanımının tromboz riskinin çok fazla yükselmesine neden olduğu gösterilmektedir (Alfirevic ve diğ., 2001).

2.2.2.5. *Protrombin 20210 Alleli*

Protrombin, K vitaminine bağlı olan pıhtılaşma faktörüdür. İnsan protrombini 72.000 Da moleküler ağırlıklı 579 amino asitlik bir moleküldür. Basit polipeptid zinciri şeklinde olup, yapısında % 10'dan fazla karbonhidrat bulunur. Protrombin hidroliz ile trombin molekülüne dönüşerek fibrinojenden fibrin oluşumunda görev alır.

Protrombin geni 11p11-q12 kromozom bölgesinde yer almaktadır. Gen bölgesi yaklaşık 21 kb uzunluğunda olup 14 ekson ve 13 introndan oluşmaktadır. Genin yaklaşık %90'ı intronlardan ibarettir (Soria ve diğ., 2000). Protrombin, karaciğerde sentezlenen tek zincirli bir glikoproteindir. Protrombinin, aminoucu bölgesi 10 adet karboksi-glutamat amino asit bakiyesi taşımaktadır. Serin bağımlı aktif proteaz kısmı, molekülün karboksil ucu bölgesinde yer alır. Protrombin, trombosit membranında Va ve Xa faktörlerinden oluşan karmaşık yapıya bağlanarak, trombosit yüzeyinden salınan aktif iki zincirli trombin molekülünü meydana getirmek üzere, faktör Xa tarafından iki konumda proteolitik kesimden geçmektedir (Butenas ve diğ., 1999).

Protrombin geninin, venöz tromboemboli (VTE) hikayesi olan ailelerde venöz tromboz için aday gen olduğu düşünülmeye başlandıktan sonra, 1996 yılında Poort ve ark. protrombin geninde, protrombin20210G>A mutasyonunu buldular (Smirnov ve diğ., 1999). Bu mutasyon, protrombin geninin proteine çevrimi yapılmayan 3' ucundaki 20210. pozisyonundaki guanin bazının adenin bazıyla yer değişimidir ve Protrombin20210G>A mutasyonu olarak adlandırılmaktadır (Girolami ve diğ., 1999). Protrombin20210G>A mutasyonu, ilk olarak homozigot normal (G20210G) genotipi

olan kişilere kıyasla, heterozigot mutant (G20210A) genotipi olanların plazma protrombin seviyesinin yüksek olduğunun belirlenmesi ile aydınlatıldı (Bovill ve diğ., 2000). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, protrombin20210G>A mutasyonunun 3' ucundaki işlenmede artışın ve 3' ucu kesim sinyalinin tanımadaki artışa neden olduğu belirlendi. Bu durum protrombin için, mRNA molekülünün birikmesi ve protein sentezinin artması ile sonuçlanmaktadır (Vanderbroucke ve diğ., 2001).

Butenas ve diğ., (1999) artan plazma protrombin seviyelerinin VTE'de etkili olduğunu ileri sürdüler (Martinelli ve diğ., 1998). Protrombin20210G>A mutasyonu ve VTE arasındaki ilişki çok sayıda çalışma ile gösterildi (Endler ve diğ., 2001). Bununla birlikte, homozigot mutant 20210A allelinin VTE ile ilişkisi bilinmesine karşın, homozigot mutant protein S, C ve faktör V Leiden mutasyonları kadar önemli bir risk faktörü olmadığı bildirilmektedir (Manniatis ve diğ., 1982). Bazı çalışmalarda, protrombin20210G>A allelinin faktör V Leiden ve/veya homozigot mutant MTHFR677C>T mutasyonları ile birlikte olduğu durumlarda, tromboz riskinin arttığı gözlemlendi (Sambrook ve diğ., 1989).

2.2.2.6. Metilentetrahidrofolat redüktaz Gen Mutasyonları ve Hiperhomosisteinemi
Metilentetrahidrofolat redüktaz Gen Mutasyonları hem arteriyel hem de venöz tromboza neden olabilen tek kalıtsal tromboz nedenleridir (Rosendaal, 1999). MTHFR geni 1p36.3 kromozom bölgesinde yer almaktadır. cDNA dizisi 2.2 kb uzunluğunda olup 11 eksondan oluşmaktadır. Bu genin ana ürünü 77.000 Da büyüklüğündedir ancak, 70.000 Da büyüklüğünde olan izoformları bazı dokularda gözlenmektedir (Tsai ve diğ., 1994).

Homosistein, metiyoninden metabolize olan sülfürlü bir amino asittir. Homosistein, 5-metil tetrahidrofolat varlığında, B12'ye bağımlı metiyonin sentaz (MS) tarafından metiyonine dönüşmektedir. Daha sonra, 5,10-metilen tetrahidrofolat, MTHFR ile 5-metil tetrahidrofolata indirgenmektedir. Karaciğer ve böbrekte homosistein metilasyonu, betain-homosistein metil transferaz aracılığıyla gerçekleşmektedir (Puca, 2002).

Total plazma homosistein (THcy) seviyesindeki artış, arteriyel ve venöz tromboz için önemli bir risk faktörüdür. Vitamin B12 ve folat, homosistein metabolizmasındaki

gerekli kofaktörlerdir ve bu vitaminlerin eksikliğinde hiperhomosisteinemi veya diğer bir deyişle homosistein seviyesinde artış meydana gelmektedir. Homosistein metabolizmasında görev alan ve Hcy seviyesi artışı ile koroner arter hastalıklarının ortaya çıkışından sorumlu olan birkaç tane genetik polimorfizm vardır. Bunların içinde en iyi tanımlananlar, MTHFR geninde belirlenen mutasyonlardır. MTHFR geni üzerinde belli başlı iki nokta mutasyonu bulunmaktadır. Bunlar; MTHFR677C>T ve 1298A>C mutasyonlarıdır (Tsai ve diğ., 1994).

MTHFR677C>T mutasyonu, MTHFR geni üzerinde 677. pozisyondaki sitozin (C) bazının timin (T) bazına transisyonudur. Mutasyon, MTHFR'in katalitik domeinindeki, alanin amino asidinin valin amino asidine dönüşümüne neden olmaktadır (Frosst ve diğ., 1995). Bu substitüsyon, homozigot ve heterozigot bireylerde, sırasıyla, %70 ve %35 olmak üzere MTHFR enziminin aktivitesini azaltmaktadır. MTHFR677C>T mutasyonunun moleküler genetiği 1997 yılında belirlendi. Kodlanan protein, 37 °C ve daha yüksek ısılarda daha düşük enzimatik aktiviteye sahip olduğu için, bu mutasyon termolabil mutasyon olarak da adlandırılmaktadır. 677C>T homozigotlardan alınan örnekler, 37 °C'da %50-60 daha düşük aktivite gösterirken 46°C'da enzim aktivitesi yaklaşık olarak %65 azalmaktadır (Chango ve diğ., 2000).

MTHFR gen bölgesi üzerindeki bu mutasyon sonucunda, plazma homosistein seviyesinde artış gözlenmekte ve çeşitli klinik tablolar oluşmaktadır. Homosistein, günümüzde kardiyovasküler, serebrovasküler ve periferal vasküler hastalıklar için doza bağımlı bir tarzda etkili olan diğer risk faktörlerinden (sigara, şişmanlık vs.) bağımsız majör bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Chango ve diğ., 2000). Homosistein, arterlerdeki düz kas hücrelerinde DNA sentezini arttırarak, arterosklerotik hastalıkların meydana gelmesinde rol oynamaktadır (Weisberg ve diğ., 1998). Yüksek plazma homosistein seviyelerinin derin ven trombozu (Deep Vein Thrombosis:DVT) için risk faktörü olduğu bildirilmektedir (Frosst ve diğ., 1995).

MTHFR1298A>C varyantı ise MTHFR geninin 7. eksonundaki bir nokta mutasyonu olup, 1298. pozisyondaki adenin bazının sitozin bazına transisyonudur. Bu mutasyon, MTHFR enziminin regülatör domeinindeki glutamin amino asidinin alanin amino asidine değişimine neden olmaktadır (Poort ve diğ., 1996). MTHFR1298A>C ve

MTHFR677C>T (1298A>C/677C>T) genotipi olan ikili heterozigotlarda *in vitro* koşullarda enzim aktivitesinin yaklaşık olarak %50 azaldığı ve olayın biyokimyasal profilinin artan homosistein ve azalan folat seviyelerine neden olan, homozigot 677C>T mutasyonuna benzediğı gösterildi (Zivelin ve diğ., 1998).

Normal açlık plazma homosistein konsantrasyonu 5-15 µmol/L iken, hafif hiperhomosisteinemi de 15-30 µmol/L, orta hiperhomosisteinemi de 30-100µmol/L, ciddi hiperhomosisteinemi de 100µmol/L dir. Genel popülasyonda % 5-10 oranında homosistein oranı yüksek bulunurken trombozda % 25'lere çıkmakta ve tromboz riskini 3-4 kat artırmaktadır (Rosendaal, 1999).

2.2.2.7. Faktör VIII Yüksekliğı

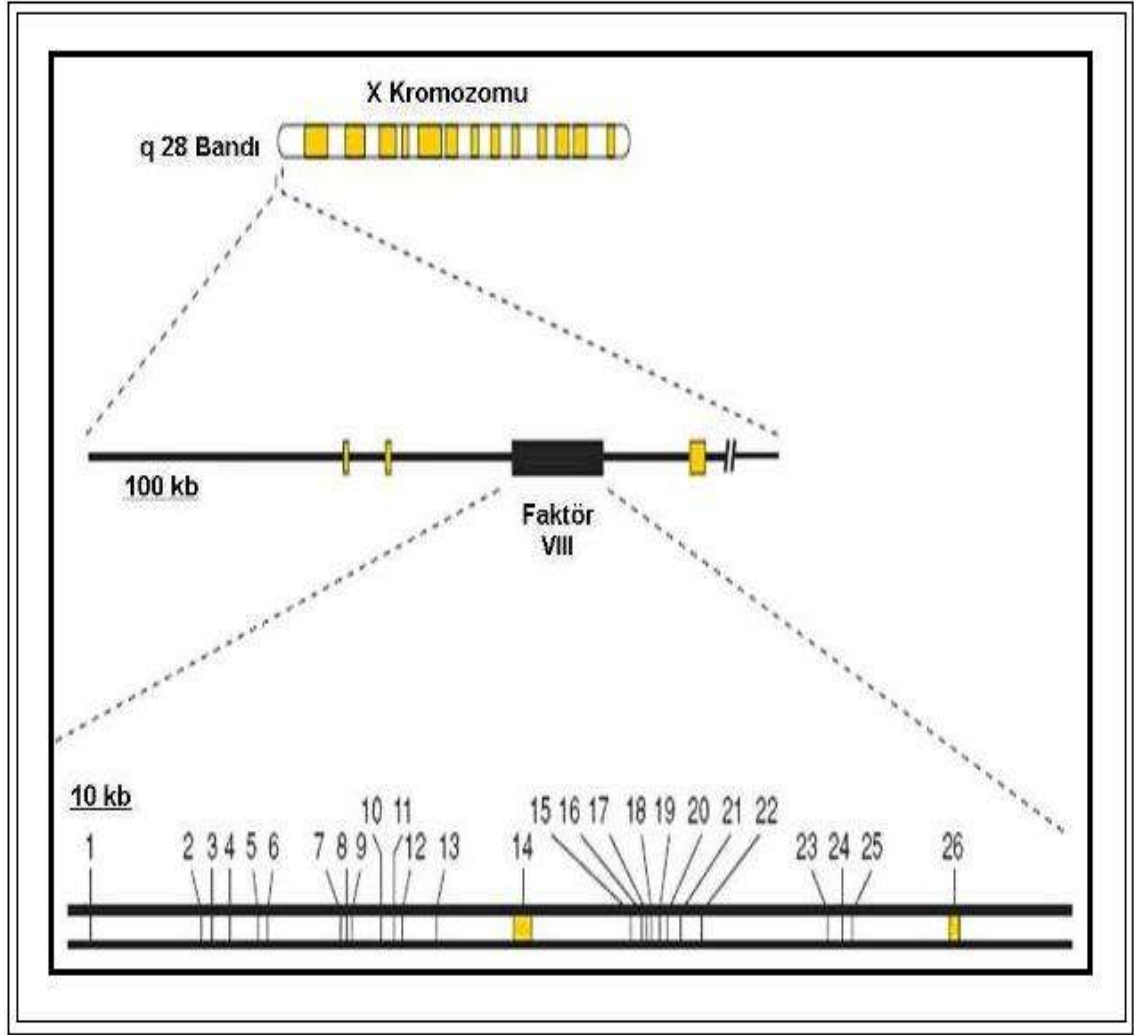
Son yıllarda yapılan araştırmalar derin ven trombozlu hastalarda FVIII düzeyinin yüksek olduğunu ve bu durumun ailesel olabildiğı bildirilmektedir (Walker, 2000). Faktör VIII konsantrasyonu ile tromboza yatkınlık arasında, yalnızca FVIII'in bir akut faz proteini olmasıyla açıklanamayacak bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Genel popülasyonun % 11'inde faktör VIII düzeyi 150 IU/dL üzerinde bulunurken trombozlu hastalarda bu oran % 25'e çıkmıştır. Yüksek konsantrasyondaki bireylerde tromboz riski 6 kat artmaktadır (Walker, 2000; Marlar ve diğ., 1990). Akut faz proteinleri akut fazda plazmadaki konsantrasyonları stres, kaza, ameliyat vb. koşullara bağılı olarak artan proteinlerdir. Ancak henüz FVIII artışına neden olan genetik bir değışim tanımlanamamıştır (Kamphuisen ve diğ., 1998).

Bu kapsamda, faktör VIII geni ve moleküler analizi tez konusunu oluşturduğu için ana başlık altında daha ayrıntılı bir şekilde açıklanacaktır.

2.3. FAKTÖR VIII GENİ

Venöz tromboz yılda yaklaşık 1000 insanın karşı karşıya kaldığı, tıpta ayrı bir öneme sahip olan bir hastalıktır. Pıhtılaşma faktörü VIII, hemofilide olduğu kadar trombofilide de büyük rol oynamaktadır. F VIII kendi başına proteolitik etki göstermeyen, fosfolipitlere ve Faktör IX'a bağlı bir kompleksin yapısında Faktör X'un aktivasyonunu hızlandıran bir kofaktördür (İliçin ve diğ., 1996). Faktör VIII ve Faktör V'in inaktivasyonu, kofaktörü Protein S ile birlikte aktive protein C aracılığı ile gerçekleşmektedir. Pıhtılaşma ve antikoagülasyon arasındaki dengeyi bozan risk faktörlerinin Protein C sistemiyle ilişki olduğu saptanmıştır.

İnsan Faktör VIII geni 1982 ile 1984 yılları arasında Gitschier ve diğ., (1984). araştırma grubu tarafından klonlanmıştır ve 186000 bç büyüklüğünde bilinen en büyük genlerden birisidir. X kromozomunun uzun kolunun üzerinde Xq28 pozisyonunda lokalize olmuştur (Poustka ve diğ., 1991; Freije ve diğ., 1992). Şekil 2. 4'te de görüldüğü gibi Faktör VIII proteinini 24'ünün büyüklüğü 69bç (ekson 5) ve 313 bç (ekson 1) arasında değişen toplam 26 ekson kodlamaktadır. Diğer iki ekson, ekson 14 ve 26, daha büyük olup 3106 ve 1958 bç uzunluğundadırlar. 26. eksonun büyük bir bölümü translasyona uğramamaktadır. Ekson 14 bütün genin yaklaşık % 40'ını oluşturmaktadır. FVIII'in eksonları arasında yer alan intronların büyüklüğü ise 200 bç (intron 17) ile 32,4 kb (intron 22) arasında değişmektedir. İntronsuz Faktör VIII dizisi yaklaşık 9000 bç'nden oluşmaktadır ve 2351 aminoasitlik öncül bir proteini kodlamaktadır. İntron 22, FVIII geni içerisindeki en büyük intron olmasının yanı sıra özel yapısıyla da önem taşımaktadır. İntronda F VIII A (Levinson ve diğ., 1990) ve F VIII B (Levinson et al. 1992) olarak adlandırılan iki ek transkript bulunmaktadır ve FVIII proteininin yapımında rol almamaktadırlar. F VIII B, transkripsiyonu Faktör VIII geni ile aynı yönde gerçekleşir ve sonuçta 2500 bç'lik bir transkript kodlar. F VIII A introna sahip değildir ve transkripsiyonu Faktör VIII genine ters yönde gerçekleşir. F VIII A ve F VIII B'nin kodladığı proteinlerin fonksiyonları henüz bilinmemektedir (Ün, 2002).



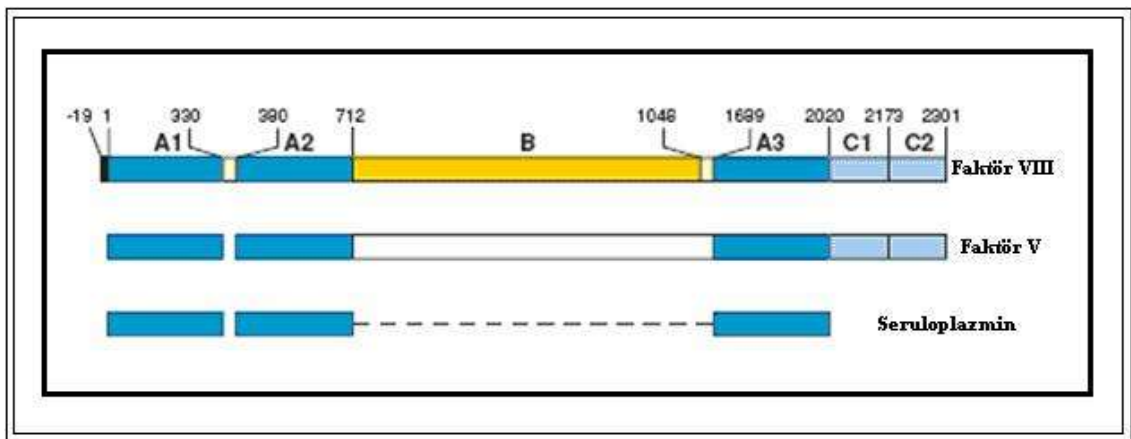
Şekil 2.4: Faktör VIII geninin yapısı (Ohlhoff, 2001)

Faktör VIII antijenine karşı monoklonal antikorlarla yapılan immunohistolojik çalışmaların sonuçları (Zelechowska ve diğ., 1985) ve hepatositlerdeki Faktör VIII mRNA'sının varlığı gösterilmiştir. Farelerde kantitatif PCR ile FVIII mRNA miktarı belirlendiğinde ilk sırada karaciğer gelirken ikinci sırada böbrekler bulunmaktadır (Holestelle ve diğ., 2001). Karaciğer kesitleri *in situ* hibridizasyon yöntemi ile incelendiğinde, FVIII mRNA'sının ağırlıklı olarak sinusoidal hücrelerde ve Kupffer hücrelerinde bulunduğu belirlenmiştir. Diğer dokularda da Faktör VIII mRNA'sının kanıtlanmış olmasına rağmen, Faktör VIII'in başlıca karaciğerde yapıldığı tahminini beraberinde getirmektedir (Wion ve diğ., 1985).

N ucundan C ucuna doğru domein yapısı A1-A2-B-A3-C1-C2 şeklindedir. Farklı türler arasında B domeini dışında kalan amino asitler yüksek homoloji göstermektedir. 3 A domeini Ca bağlar ve katalitik aktivite için gereklidir. A2 ve diğer A domeinlerindeki mutasyonlar proteinin stabilitesini azaltarak hemofiliye yol açar. A2 ve A3 domeinleri FIXa ile etkileşir (Pipe ve diğ., 2001; Thompson, 2003).

C1 ve C2 domeinleri dizi benzerliği göstermelerine karşın, C1 lipid bağlama bölgesini içermez. C2 önemli bir VWF bağlama bölgesi içerir. C1, VWF'ün C2'ye bağlanmasını kolaylaştırır. C2'de trombin ve FXa bağlama bölgeleri de bulunmaktadır (Nogami ve diğ., 1999; Nogami ve diğ., 2000).

Faktör VIII proteini Şekil 2.5'ten de anlaşılacağı üzere kendini tekrarlayan bir domen yapısına sahiptir: A1- A2- B- A3- C1- C2 (Vehar ve diğ., 1984). Bu yapı Faktör V'in yapısıyla benzerlik göstermektedir. Fakat B-domeinleri birbirleriyle ilişkili değildir. Seruloplazmine olan benzerlik A-domeinlerinin yerleşimine dayanmaktadır: A1-A2-A3 (Vehar ve diğ., 1984; Koschinsky ve diğ., 1986; Kane ve diğ., 1986). C-domeinleri discoidin ve Mamma karsinom hücrelerinde bulunan bir reseptör-tirozin kinaz (Johnson ve diğ., 1993) ile benzerlik göstermektedir. B-domeinleri ile protein dizisi veritabanlarındaki diğer proteinler arasında ise homolojiye rastlanmamıştır (Ün, 2002; Ohlhoff, 2001).



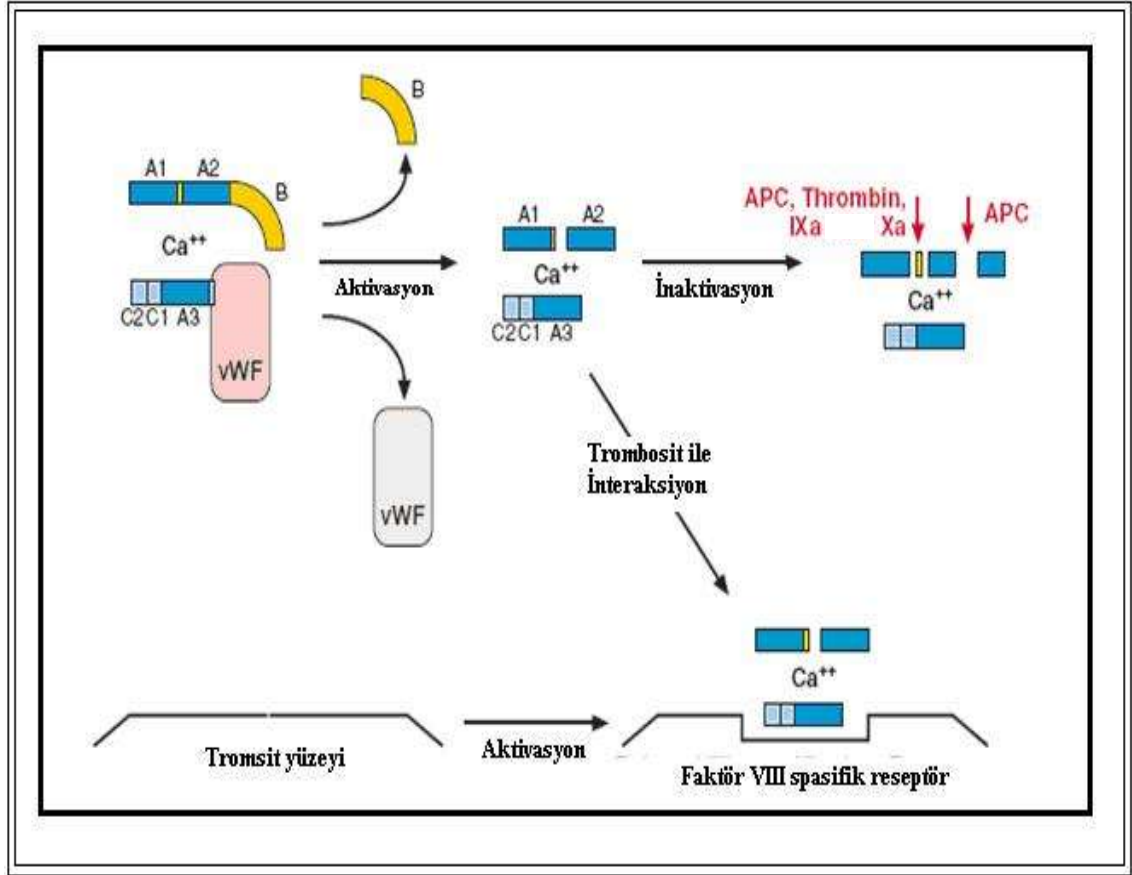
Şekil.2.5: Faktör VIII Domein Yapısının Faktör V ve Seruloplazmin ile karşılaştırılması (Ohlhoff, 2001).

Faktör VIII bir sekresyonun öncesinde ve sonrasında proteolitik işlem için çok duyarlıdır. Faktör VIII A1, A2 ve B domeinlerinden oluşan ağır zincir ile A3, C1 ve C2 domenlerinden oluşan hafif zincirden oluşmaktadır (Vehar ve diğ., 1984). Rekombinant olarak sentez edilmiş kusurlu B-domenine sahip Faktör VIII'den elde edilen sonuçlar bu domenin pıhtılaşma aktivitesi için işlevsiz olduğunu göstermiştir (Eaton ve diğ 1986).

İnaktif Faktör VIII plazmada Von-Willebrand faktörünü sirküle etmektedir. Bu bağlantı onu proteolitik kesimden korumaktadır. Bu bağlantı bozulduğunda plazmadaki Faktör VIII konsantrasyonu düşer. Faktör VIII insanlarda kofaktör olarak Faktör IX aracılığıyla pıhtılaşma faktörü X'un aktivasyonunun fosfolipit yüzeyinde katalizinden sorumludur. Böylece pıhtılaşma uyarımını birkaç kat artırır.

Proteolitik kesim, aktivasyonun yanı sıra inaktivasyonda da rol oynamaktadır. Faktör VIII kofaktör rolünü üstlenebilmek için öncelikle iki belli noktadan kesilmelidir. Bu modifikasyon iki domen arasındaki sınır bölgelerinde, biri 372 aminoasidinde A1- ve A2 domenleri sınırında, diğeri ise 1689 aminoasidinde B- ve A3 domenleri sınırında gerçekleşmektedir (Pittman ve diğ., 1994, Hill-Eubanks ve diğ., 1989). İlk kesim yeri A2- domeni bağlantı noktası ile buluştuğunda ikinci kesim yerinin Von Willebrand faktörüyle olan bağlantısı çözülür (Leyte ve diğ., 1991). Bu şekilde Faktör VIII C2-domeni aracılığıyla fosfolipit membranlarla ilişki kurarak membrana bağlı Faktör IX-X kompleksinin oluşumunu sağlar.

Aktive faktör VIII'in degradasyonu proteolitik kesimle üç adımda gerçekleşir. R336. amino asidinden aktive protein C'nin (APC) kesmesi ile olur ve faktör VIII'in yanı sıra trombin, Faktör IX ve Faktör X'un inaktivasyonu gerçekleşirken, 1719 amino asidinde yalnızca Faktör IX'un inaktivasyonu gerçekleşmektedir. APC'nin inaktivasyonu için en etkili kesim yeri ise pozisyon R562'dir (Vehar ve diğ., 1984, Walker ve diğ., 1987, O'Brien ve diğ., 1992). Aktivasyonun ve inaktivasyonun aşamaları Şekil 2.6'da şematize edilmiştir.



Şekil 2.6: Faktör VIII aktivasyonu ve inaktivasyonu.(Ohlhoff, 2001)

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. OLUŞTURULAN ÇALIŞMA GRUBU

Bu tez kapsamında çalışılan hasta grubu, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Damar Polikliniği tarafından Venöz Tromboz teşhisi konmuş olan 20 kişiden oluşturulmuştur. Hasta grubuna alınacak bireylerde öncelikle Faktör VIII düzeyi ölçümü yapılmıştır ve Faktör VIII düzeyleri yüksek çıkan bireyler çalışma grubuna alınmışlardır. Kontrol grubu ise birbiri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan, herhangi bir tromboz tanısı konmamış, kan pıhtılaşma sistemini etkileyecek herhangi bir ilaç kullanmayan ve kalp damar hastası olmayan bireylerden seçilmeye özen gösterilmiştir. Ancak kontrol grubu oluşturulurken bireylerin aile hikâyeleri göz önüne alınmamıştır.

3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1. Faktör VIII Düzeyinin Belirlenmesi

Tüm bireylerden alınan 5 ml sitratlı tam kan örnekleri serum faktör VIII düzeyi belirlenmesi çalışmasında kullanılmıştır. Faktör VIII düzeyi 150 IU/dl üzerinde olan bireylerde tromboz riski artmaktadır. Bu sınırın üstünde olan kişilerden hasta grubu oluşturulmuştur. Faktör VIII düzeyi STA- Deficient VIII (Statik Zamanlama Analizi: *Static Timing Analysis=STA*) kiti ile belirlenmiştir. Faktör VIII analiz kiti; seçici immuno-adsorpsiyon yöntemi ile faktör VIII'i ortadan kaldırılmış dondurulmuş insan plazmasıdır. Bu kit; dışarıdan eklenen ve faktör VIII içeren örnekler ile pıhtılaşma olayının gerçekleşmesini sağlamaktadır. Faktör VIII pıhtılaşma faktörünü içermeyen örnek ya da hatalı faktör VIII'e sahip örnek pıhtılaşma olayının dengeli bir şekilde gerçekleşmesini sağlayamaz böylece pıhtılaşma olayının olup olmamasına bağlı olarak eklenen örneğin faktör VIII içerip içermediği ayrımı veya düzey belirlemesi yapılabilmektedir (Oger ve diğ., 2003).

3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada, Venöz Tromboz tanısı konulmuş ve faktör VIII düzeyi yüksek tespit edilmiş hastalardan ve kontrol grubu bireylerden 5 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan kan materyalleri kullanıldı. EDTA'lı kandan Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak, DNA izolasyon işlemi yapıldı.

Steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde, 300 µl EDTA'lı kan örneği ve 900 µl hücre parçalama solüsyonu eklenerek iyice karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mikrosantrifüj tüpü, oda sıcaklığında 16000 g de 20 saniye santrifüj edildi ve dökelti atılarak, çökelti halindeki beyaz kan hücreleri tekrar süspanse olana kadar vorteks ile karıştırıldı. Üzerine 300 µl hücre çekirdeği parçalama çözeltisi eklenerek iyice süspanse edildi. Ardından 1,5 µl RNase solüsyonu nükleus lizatına eklenerek birkaç kez karıştırıldı ve karışım 37°C'lik su banyosunda 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında karışım tekrar oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu. Sonra protein çöktürme solüsyonu nükleus lizatına eklendi ve 20 saniye vorteks ile karıştırıldı. Ardından oda sıcaklığında 16000 g de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dökelti, içinde 300µl oda sıcaklığında isopropanol bulunan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı, proteinleri içeren çökelti ise atıldı. Mikrosantrifüj tüpü DNA iplikçik halinde görünür hale gelene kadar karıştırıldı. Sonra oda sıcaklığında 16000 g de 1 dakika santrifüj edildi ve DNA küçük beyaz pellet şeklinde çöktü. Üst sıvı atıldı, üzerine oda sıcaklığında 300 µl %70'lik etanol eklenerek, DNA pelleti çalkalanarak iyice yıkandı ve 16000 g de 1 dakika santrifüj edildi. Pellet 15 dakika etanol uçana kadar kurutuldu. Kuruyan DNA pelletinin üzerine çözündürme solüsyonu eklendi ve 4°C'de gece boyu inkübasyona bırakılarak çözündürüldü.

3.2.3. Genomik DNA'nın Kalitatif Analizi

DNA'nın kalitatif miktar tayini, %1'lik agaroz jelde yapılmıştır. 0.80 g agaroz tartılıp 80 ml 0,5 M TAE tamponunda ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda kaynatılarak iyice eritildi. Tampon sıcaklığı 50-55 °C'ye kadar soğuması beklendi ve DNA'nın UV ışığı altında görülebilmesi için 1,25 µl EtBr (10 mg/ml) eklenerek, elektroforez kasetine döküldü ve kaset soğukta bekletildi. Donmuş olan jel, içinde 0,5 x TAE yürütücü tamponu bulunan

elektroforez tankına alındı. DNA'ların 3 µl'si elektroforez yükleme solüsyonu ile karıştırılarak jel kuyucuklarına yükleme yapıldı. Jel 120 V'ta 20 dakika yürütüldü. UV ışık altında kontrol edilen genomik DNA bantlarının fotoğrafı çekildi.

3.2.4. Genomik DNA'nın Kantitatif Analizi

İzole edilen genomik DNA kantitatif tayini spektrofotometrik ölçümler ile yapıldı. Tris-EDTA tamponu ile 1/50 oranında seyreltilen örneklerin, UV-spektrofotometresinde 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakılarak, çift zincirli DNA konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Hayashi, 1993).

DNA Konsantrasyonu= $OD_{260} \times 50 \times \text{Seyreltme oranı}$

DNA molekülünün saflığı 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değerinin 280 nm dalga boyunda okunan absorbans değerine oranı belirlenerek kontrol edilmiştir (Qiu-Qiong ve Touitou, 1993).

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (*Polymerase Chain Reaction: PCR*)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı *in vitro* DNA sentezi yöntemidir. PCR tekniği, 1985'te Kary Mullis ve arkadaşlarınca ortaya atılmış, daha sonra Saiki ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Saiki ve diğ., 1988). PCR yöntemi kısaca bir gen ya da DNA bölgesinin, bu hedef bölgenin uç bölgelerine bağlanan oligonükleotid primerler aracılığıyla bir dizi eşleme geçirerek çoğaltılması işlemidir. PCR'ın çalışma prensibi; tekrarlanan 3 basamağa dayanır. Bu evreler;

1. Çoğaltılacak bölgeyi içeren DNA molekülünün yüksek sıcaklıkta denatürasyonu.
2. Özgül hibridizasyona olanak verecek sıcaklıkta primerlerin hedef bölgelerle birleşmesi.
3. Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklık olan 72°C'da, primerlerin uzamasıdır.

PCR işleminin özgülüğü, çok iyi tanımlanmış primer oligonükleotidlerin seçilmesiyle sağlanır. Bunlar, çoğaltılacak DNA bölgesine bağlanacak olan ve bağlanma bölgesini tamamlayıcı yapıda, sentetik DNA parçalarıdır. İlk yapılan DNA çoğaltımı uygulamalarında, *E.coli* DNA polimeraz III Klenow fragmenti kullanılırken, günümüzde bu enzimin yerine, *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen ve yüksek sıcaklığa dayanıklı bir enzim olan Taq DNA Polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Taq DNA Polimeraz enzim proteini 85.000 Da moleküler kütleli olup, çoğaltma aktivitesini 72°C’da gösterir ve 95°C’da inkübe edildikten sonra bile işlevsel kalır.

Polimeraz enzimleri, aktivite için serbest magnezyum iyonlarına gereksinim göstermektedir. Başarılı bir çoğaltma için en uygun magnezyum derişiminin bilinmesi gerekir. Her dNTP’den (deoksiribonükleotid trifosfatlardan) 0.2 mM kullanıldığında en uygun magnezyum derişimi 1.5-4.0 mM arasındadır. PCR işleminin kaç döngü uygulanacağı, başlangıçtaki DNA molekülünün sayısına bağlıdır. 1-100 kopya DNA molekülü ile başlanıyorsa 30-45 döngü, 1.000-100.000 ile başlanıyorsa 20-30 döngülük PCR yeterli olmaktadır.

3.2.5.1. PCR Bileşenleri

Bu tez çalışmasında faktör VIII geni promotor bölgesi ve 26 ekson bölgesi PCR koşulları literatür bilgilerinden modifikasyonlar ile belirlendi. Her bir bölge için temelde uygulanan PCR bileşenleri Tablo 3.1, Tablo 3.2, Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’te verilmektedir.

Tablo 3.1: Ekson 14A, Ekson 14B, Ekson14C, Ekson 14G, Ekson 15 ve Ekson 16 bölgelerini çoğaltmak amacı ile uygulanan PCR bileşenleri.

PCR BİLEŞENLERİ	µl/TÜP	SON KONSANTRASYON
Steril bidistile H ₂ O	18	-
5 X Buffer	2.5	0.5X
MgCl ₂ (25 mM)	1.0	1 mM
dNTP (25 mM)	0.3	0.3 mM
Primer1 (10 pmol/µl)	1.0	10 mM/25 µl
Primer2 (10 pmol/µl)	1.0	10 mM/25 µl
Taq polimeraz (5U/µl)	0.2	1 U/25 µl
DNA (150 ng/µl)	1.0	150 ng/25 µl
Toplam hacim	25.0	

Tablo 3.2: Ekson 4, Ekson 10, Ekson 14H ve Ekson 21 bölgelerini çoğaltmak amacı ile uygulanan PCR bileşenleri.

PCR BİLEŞENLERİ	$\mu\text{l}/\text{TÜP}$	SON KONSANTRASYON
Steril bidistile H ₂ O	17.5	-
5 X Buffer	2.5	0.5X
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	1.5 mM
dNTP (25 mM)	0.3	0.3 mM
Primer1 (10 pmol/ μl)	1.0	10 mM/25 μl
Primer2 (10 pmol/ μl)	1.0	10 mM/25 μl
Taq polimeraz (5 U/ μl)	0.2	1 U/25 μl
DNA (150 ng/ μl)	1.0	150 ng/25 μl
Toplam hacim	25.0	

Tablo 3.3: Promotor 2, Ekson 2, Ekson 6, Ekson 11, Ekson 12, Ekson 13, Ekson 14D, Ekson 14E, Ekson 17, Ekson 18, Ekson 19, Ekson 20, Ekson 23, Ekson 24, Ekson 25 bölgelerini çoğaltmak amacı ile uygulanan PCR bileşenleri

PCR BİLEŞENLERİ	$\mu\text{l}/\text{TÜP}$	SON KONSANTRASYON
Steril bidistile H ₂ O	15.5	-
5 X Buffer	5.0	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1.0	1 mM
dNTP (25 mM)	0.3	0.3 mM
Primer1 (10 pmol/ μl)	1.0	10 mM/25 μl
Primer2 (10 pmol/ μl)	1.0	10 mM/25 μl
Taq polimeraz (5U/ μl)	0.2	1 U/25 μl
DNA (150 ng/ μl)	1.0	150 ng/25 μl
Toplam hacim	25.0	

Tablo 3.4: Promotor 1, Ekson 1, Ekson 3, Ekson 5, Ekson 7, Ekson 8, Ekson 9, Ekson 14F, Ekson 14J, Ekson 14K, Ekson 22 ve Ekson 26 bölgelerini çoğaltmak amacı ile uygulanan PCR bileşenleri.

PCR BİLEŞENLERİ	$\mu\text{l}/\text{TÜP}$	SON KONSANTRASYON
Steril bidistile H ₂ O	15	-
5 X Buffer	5.0	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	1.5 mM
dNTP (25 mM)	0.3	0.3 mM
Primer1 (10 pmol/ μl)	1.0	10 mM/25 μl
Primer2 (10 pmol/ μl)	1.0	10 mM/25 μl
Taq polimeraz (5U/ μl)	0.2	1 U/25 μl
DNA (150 ng/ μl)	1.0	150 ng/25 μl
Toplam hacim	25.0	

3.2.5.2. PCR Primerleri

Bu çalışmada yapılan PCR işlemlerinde, faktör VIII geninin promotor bölgesinin ve 26 ekson bölgesinin çoğaltılabilmesi için kullanılan özgün oligonükleotid çiftlerinin isimleri ve dizileri Tablo 3.5'te verilmektedir. Faktör VIII geninin promotor bölgesine ve eksonlarına özgün belirlenen primer çiftleri, değişik literatür bilgilerinden yararlanılarak oluşturulmuş ve ticari olarak primer sentezi yapan firmalardan temin edilmiştir (Arrunda ve diğ., 1995; Berger ve diğ., 2005).

Tablo 3.5: Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kullanılan primer isimleri ve baz dizileri.

Primer Adı	Primer Dizisi
F8 P1-F	F-5' GAG CTC ACC ATG GCT ACA TTC
F8 P1-R	R-5' TCC TGT CAC TCC TCT TCT CAG
F8 P2-F	F-5' AGG TCA GAA GCC ATT GGA GG
F8 P2-R	R-5' CCC ACT GGA TGT GCT CAG CA
F8 E1-F	F-5' AAT CCT ATC GGT TAC TGC TTA
F8 E1-R	R-5' AGC ATC ACA ACC ATC CTA AC
F8 E2-F	F-5' TGG AAG CAT TAC TTC CAG CT
F8 E2-R	R-5' AAC TGC AAC CTC AAG ATT GG
F8 E3-F	F-5' TGC TTC TCC ACT GTG ACC T
F8 E3-R	R-5' ATC TAG TAA ATG TTA AGA AAT ACA
F8 E4-F	F-5' GTA CAG TGG ATA TAG AAA GGA C
F8 E4-R	R-5' GAT TCA GTT GTT TGT ACT TCT C
F8 E5-F	F-5' CTT ACT GTC AAG TAA CTG ATG
F8 E5-R	R-5' CTT CAT TCC TGA ACA GTA ATG
F8 E6-F	F-5' TCC CAC TTA TTG TCA TGG AC
F8 E6-R	R-5' TAC AGA ACT CTG GTG CTG AA
F8 E7-F	F-5' GGC AAG AGC TGT TGG TTT G
F8 E7-R	R-5' TGT CCA GTA AAT TTT ATT AAA AGT
F8 E8-F	F-5' CCA TAT AGC CTG CAG AAA CA
F8 E8-R	R-5' CTG ATG CTC AGC TAT GTT AG
F8 E9-F	F-5' CTA ACA TAG CTG AGC ATC AG
F8 E9-R	R-5' AGA TCA TGT CCA TTG GAG ACA A

F8 E10-F	F-5' CTA GCC TCA AAT TAC TAT AAT G
F8 E10-R	R-5' ACT TTA GAC TGG AGC TTG AG
F8 E11-F	F-5' TGC GAC TTT AGC TTC CAC TT
F8 E11-R	R-5' ACT GAC CTA TAT TGC AAA CCA
F8 E12-F	F-5' TGC CAT CGC TTT CAT CAT AG
F8 E12-R	R-5' CAT TCA TTA TCT GGA CAT CAC
F8 E13-F	F-5' AAC AAT CTA CTT TTT TGG AAG A
F8 E13-R	R-5' CCT CAA GGA AGA AAA TGC TA
F8 E14A-F	F-5' GAC CTG TGA TAT AAT GAT A
F8 E14A-R	R-5' GAA AAA GTC TCA TAT TTG GC
F8 E14B-F	F-5' CCT TGG TTT GCA CAC AGA AC
F8 E14B-R	R-5' TGT ATT ATC AGT ACC TGC TG
F8 E14C-F	F-5' AGC AAC AGA GTT GAA GAA AC
F8 E14C-R	R-5' CTA ATA TAT TTT GCC AGA CT
F8 E14D-F	F-5' AAC AAA ACT TCC AAT AAT TC
F8 E14D-R	R-5' AGA GTT CTT TCC ATG AGT CC
F8 E14E-F	F-5' CCC CAT TCC ACC AGA TGC AC
F8 E14E-R	R-5' ATC TTG AAG TAC TGG AGC AT
F8 E14F-F	F-5' TAC ATA CAG TGA CTG GCA CT
F8 E14F-R	R-5' GAC CAC TGG GTT GAG GTG TC
F8 E14G-F	F-5' CAC GCA ACG TAG TAA GAG AG
F8 E14G-R	R-5' GCC AAC CTC TCT TTG ATC AC
F8 E14H-F	F-5' TAT AGA AAG AAA GAT TCT GG
F8 E14H-R	R-5' CAG GTC TGT TTG CTT CAT TC
F8 E14J-F	F-5' CCC TAC GGA AAC TAG CAA TG
F8 E14J-R	R-5' TCT TCA TTT CAA CTG ATA TG
F8 E14K-F	F-5' AGG ACT GAA AGG CTG TGC TC
F8 E14K-R	R-5' AAG AGT TTC AAG ACA CCT TG
F8 E15-F	F-5' AGA TGA AGT GGT TAA CTA TGC
F8 E15-R	R-5' GTG GGA ATA CAT TAT AGT CAG
F8 E16-F	F-5' AGC ATC CAT CTT CTG TAC CA
F8 E16-R	R-5' TCA GTA GAT TCC AGA ATG ACA
F8 E17-F	F-5' TGT CAT TCT GGA ATC TAC TGA
F8 E17-R	R-5' CAC TCC CAC AGA TAT ACT CT

F8 E18-F	F-5' AGA GTA TAT CTG TGG GAG TG
F8 E18-R	R-5' CTT AAG AGC ATG GAG CTT GT
F8 E19-F	F-5' GCA AGC ACT TTG CAT TTG AG
F8 E19-R	R-5' AGC AAC CAT TCC AGA AAG GA
F8 E20-F	F-5' ACG TTG AGT ACA GTT CTT GG
F8 E20-R	R-5' ACT AAT AGA AGC ATG GAG ATG
F8 E21-F	F-5' TCT CTG TTT CTT TAC TTG GG
F8 E21-R	R-5' GTG ATA CAT TTC CCA TCA TTG
F8 E22-F	F-5' AAA TAG GTT AAA ATA AAG TGT TAT
F8 E22-R	R-5' TGG AAG CTA AGA GTG TTT GT
F8 E23-F	F-5' GTC TTA TGT AGA TGT TGG ATG
F8 E23-R	R-5' AGT CTC AGG ATA ACT AGA ACA
F8 E24-F	F-5' CAG TGG AAG CTG CTC AGT AT
F8 E24-R	R-5' CCC ATA ACC AAA CTT CCT TG
F8 E25-F	F-5' AGT GCT GTG GTA TGG TTA AG
F8 E25-R	R-5' TTG CTC TGA AAA TTT GGT CAT A
F8 E26-F	F-5' CCA ATA AAT GCT ATC TTT CCT C
F8 E26-R	R-5' CTG AGG AGG GAG AGG TGA

3.2.5.3. DNA Polimeraz Enzimi ve Tamponu

PCR sırasında, termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus* 'tan izole edilen ticari Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. Bu enzim, çok yüksek sıcaklıklara dayanıklı ve yaklaşık 70-75 °C sıcaklık, pH 9.0'da DNA'nın 5' ucundan 3' ucuna doğru polimeraz aktivitesi göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan Taq DNA polimeraz enzimi 5U/ μ l'dir (PROMEGA). PCR tamponu olarak ise MgCl₂ içermeyen 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) ve %1 TritonX-100 içeren 5X tampon kullanıldı.

3.2.5.4. PCR Programları

Tablo 3.6, Tablo 3.7, Tablo 3.8, Tablo 3.9, Tablo 3.10, Tablo 3.11'de faktör VIII geninin promotor ve 26 ekson bölgesini çoğaltmak amacı ile yapılan PCR'larda, bu bölgelere özgü PCR programları gösterilmektedir. Bu programlar optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenmiştir.

Tablo 3.6: Ekson 3, Ekson 6, Ekson 12, Ekson 14A, Ekson 14B, Ekson 14C, Ekson 14D, Ekson 14E, Ekson 14G, Ekson 15, Ekson 16, Ekson 18, Ekson 19, Ekson 23, Ekson 24 ve Ekson 25' in çoğaltılmasında uygulanan PCR programı.

PROGRAM TÜRÜ	DERECE (°C)	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
İlk denatürasyon	95	2'	-
Denatürasyon	94	45''	30
Bağlanma	53	45''	
Uzatma	72	45''	
Son uzatma	72	5'	-
Bekleme	10	10'	-

': Dakika, '': Saniye

Tablo 3.7: Ekson 3'ün çoğaltılmasında uygulanan PCR programı.

PROGRAM TÜRÜ	DERECE (°C)	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
İlk denatürasyon	95	2'	-
Denatürasyon	94	45''	30
Bağlanma	54	45''	
Uzatma	72	45''	
Son uzatma	72	5'	-
Bekleme	10	10'	-

': Dakika, '': Saniye

Tablo 3.8: Ekson 1, Ekson 4, Ekson 7, Ekson 8, Ekson 9, Ekson 10, Ekson 13, Ekson 14J, Ekson 17, Ekson 21, Ekson 22'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR programı.

PROGRAM TÜRÜ	DERECE (°C)	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
İlk denatürasyon	95	2'	-
Denatürasyon	94	45''	30
Bağlanma	55	45''	
Uzatma	72	45''	
Son uzatma	72	5'	-
Bekleme	10	10'	-

': Dakika, '': Saniye

Tablo 3.9: Promotor 1, Promotor 2, Ekson 2, Ekson 11, Ekson 14 H ve Ekson 20'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR programı.

PROGRAM TÜRÜ	DERECE (°C)	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
İlk denatürasyon	95	2'	-
Denatürasyon	94	45''	30
Bağlanma	57	45''	
Uzatma	72	45''	
Son uzatma	72	5'	-
Bekleme	10	10'	-

': Dakika, '': Saniye

Tablo 3.10: Ekson 14K'nın çoğaltılmasında uygulanan PCR programı.

PROGRAM TÜRÜ	DERECE (°C)	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
İlk denatürasyon	95	2'	-
Denatürasyon	94	45''	30
Bağlanma	59	45''	
Uzatma	72	45''	
Son uzatma	72	5'	-
Bekleme	10	10'	-

': Dakika, '': Saniye

Tablo 3.11: Ekson 14F ve Ekson 26'nın çoğaltılmasında uygulanan PCR programı.

PROGRAM TÜRÜ	DERECE (°C)	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
İlk denatürasyon	95	2'	-
Denatürasyon	94	45''	30
Bağlanma	61	45''	
Uzatma	72	45''	
Son uzatma	72	5'	-
Bekleme	10	10'	-

': Dakika, '': Saniye

Tablo 3.12: Optimizasyonu yapılan bölgeler için PCR koşulları.

Ekson Numarası	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	[MgCl ₂]
Promotor 1	57	1.5 mM
Promotor 2	57	1 mM
Ekson 1	55	1.5 mM
Ekson 2	57	1 mM
Ekson 3	54	1.5 mM
Ekson 4	55	1,5 mM
Ekson 5	53	1,5 mM
Ekson 6	53	1 mM
Ekson 7	55	1.5 mM
Ekson 8	55	1.5 mM
Ekson 9	55	1.5 mM
Ekson 10	55	1.5 mM
Ekson 11	57	1 mM
Ekson 12	53	1 mM
Ekson 13	55	1 mM
Ekson 14A	53	1 mM
Ekson 14B	53	1 mM
Ekson 14C	53	1 mM
Ekson 14D	53	1 mM
Ekson 14E	53	1 mM
Ekson 14F	61	1.5 mM
Ekson 14G	53	1 mM
Ekson 14H	57	1.5 mM
Ekson 14J	55	1.5 mM
Ekson 14K	59	1.5 mM
Ekson 15	53	1 mM
Ekson 16	53	1 mM
Ekson 17	55	1 mM
Ekson 18	53	1 mM
Ekson 19	53	1 mM
Ekson 20	57	1 mM
Ekson 21	55	1.5 mM
Ekson 22	55	1.5 mM
Ekson 23	53	1 mM
Ekson 24	53	1 mM
Ekson 25	53	1 mM
Ekson 26	61	1.5 mM

3.2.6. DNA Analiz Yöntemleri

3.2.6.1. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin varlığı, % 2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. 1,6 gr agaroz tartılıp, 80 ml 1xTAE tamponunda eritildi. Karışım 50-55 °C'a geldikten sonra, içine 3 µl EtBr (3 mg/ml) eklenip, elektroforez kasetine dökülerek soğuması beklendi. 20-30 dakika sonra polimerleşen jel, içinde 1xTAE tampon bulunan elektroforez tankına alındı. Elektroforez yükleme tamponu eklenerek, 5 µl PCR ürünleri jele uygulandı. 120 V'da 25-30 dakika yürütüldü. Oluşan bantlara UV ışık altından bakıldı.

3.2.6.2. Tek Zincir Konformasyon Analizi (Single Strand Conformation Analysis:SSCA)

Denatüre edilmemiş tek sarmal halindeki DNA, proteinin ikincil yapısına benzer bir konformasyona sahiptir. Aynı DNA dizisindeki tek bir nükleotid farklılığı gerek delesyon (deletion= aradan bir nükleotid eksilmesi), gerek insersiyon (insertion= araya nükleotid girmesi), gerekse substutisyon (substution= bir bazın başka bir nükleotide dönüşmesi durumu, nokta mutasyonu) bu konformasyonda bir değişikliğe neden olur. Bu konformasyon farklılığı DNA dizisinin jel elektroforezlerindeki göçme hızını etkiler. Göçme hızındaki bu farklılık denatüre edici olmayan poliakrilamid jelinde yeni veya heterodupleks bantlar olarak ortaya çıkar.

SSCA, analiz edilecek PCR ürünlerinin denatürasyonu ile elde edilen tek zincirli DNA'ların farklı konsantrasyonlardaki polakrilamid jel ve elektroforez koşullarında bant modellerinin belirlenmesine yarayan bir tekniktir. Teknikte dikkat edilmesi gereken belli koşullar vardır. Bunalar; sıcaklık, PCR reaksiyonları ve jel matriksidir.

SICAKLIK: En önemli kriterlerden biridir, oda sıcaklığında veya 4 °C'da elektroforez yapılmaktadır.

PCR REAKSİYONLARI: PCR sırasında optimum primer konsantrasyonları kullanmak önemlidir. Çünkü aşırı primer tek zincirli bantların hareketlerini etkilemektedir.

JEL MATRİKSİ: Birbirinin tamamlayıcısı olan tek zincirlerin daha iyi ayrılması için, poliakrilamid jel hazırlanırken akrilamid oranına göre, çapraz bağlayıcının (N,N'Bisakrilamid) yüzdesi daha düşük olmalıdır (Sambrook ve diğ ., 1989).

Bu çalışmada faktör VIII gen bölgesinin promotor ve 26 ekson bölgesi üzerindeki olası mutasyon/polimorfizmleri belirlemek için Tek Zincir Konformasyon Analizi (SSCA) tekniği'nden yararlanıldı. Faktör VIII gen bölgesine yönelik uygulanan SSCA çalışmaları PCR'ları, 3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu bölümü'nde belirtilen koşullara göre yapıldı.

Faktör VIII gen bölgesine ait PCR ürünleri denatürant olmayan poliakrilamit jellere yüklendi. Optimizasyon çalışmaları en iyi rezolüsyon paternlerini belirlemek için farklı sürelerde (12-21 saat), farklı voltajlarda (200-300 V) ve çeşitli konsantrasyonlardaki poliakrilamit jeller kullanılarak yapıldı. Çalışmada kullanılan poliakrilamit jellerin konsantrasyonu analizler esnasında çeşitli denemeler sonucunda belirlendi.

SSCA yöntemi için kullanılan poliakrilamit jeller ayırma jeli ve yükleme olmak üzere iki aşamada hazırlandı. Ayrıma ve yükleme jellerinin konsantrasyonları arasında %2'lik fark olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıma jellerinde %8'lik (29:1), %7'lik (29:1) ve %6'lık (29:1) poliakrilamit jellerde en iyi sonuçlar alındı. Belirlenen ayırma jelleri konsantrasyonlarına göre de yükleme jelleri konsantrasyonları %6'lık (29:1), %5'lik (29:1) ve %4'lük (29:1) olarak ayarlanmıştır. Tek zincir ürünleri büyüklüklerine göre değil, konformasyonlarına göre ayrılacağı için yapılan analizlerde DNA markırı kullanılmadı. Stok poliakrilamit jel ile ayırma ve yükleme jellerinin içerikleri ve hazırlanışları Tablo 3.13, Tablo 3.14, Tablo 3.15, Tablo 3.16, Tablo 3.17 ve Tablo 3.18'de verilmektedir.

Tablo 3.13: % 6'lık poliakrilamit yükleme jel solüsyonunun hazırlanması.

İÇERİK	MİKTAR
%30 (29:1) (29 g akrilamit ve 1 g bis-akrilamit)	2 ml
Distile su	7 ml
%10 APS (Amonyum peroksidisülfat)	100 µl
10XTEB	1 ml
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametil Etilen Diamin)	20 µl

Tablo 3.14: % 8'lik poliakrilamit ayırma jel solüsyonunun hazırlanması.

İÇERİK	MİKTAR
%30 (29:1) (29 g akrilamit ve 1g bis-akrilamit)	10.8 ml
Distile su	25.2 ml
%10 APS (Amonyum peroksidisülfat)	250 µl
10XTEB	4 ml
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametil Etilen Diamin)	50 µl

Tablo 3.15: % 5'lik poliakrilamit yükleme jel solüsyonunun hazırlanması.

İÇERİK	MİKTAR
%30 (29:1) (29 g akrilamit ve 1g bis-akrilamit)	1.6 ml
Distile su	7.4 ml
%10 APS (Amonyum peroksidisülfat)	100 µl
10XTEB	1 ml
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametil Etilen Diamin)	20 µl

Tablo 3.16: % 7'lik poliakrilamit ayırma jel solüsyonunun hazırlanması.

İÇERİK	MİKTAR
%30 (29:1) (29 g akrilamit ve 1g bis-akrilamit)	9.2 ml
Distile su	26.8 ml
%10 APS (Amonyum peroksidisülfat)	250 µl
10XTEB	4 ml
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametil Etilen Diamin)	50 µl

Tablo 3.17: % 4'lük poliakrilamit yükleme jel solüsyonunun hazırlanması.

İÇERİK	MİKTAR
%30 (29:1) (29 g akrilamit ve 1g bis-akrilamit)	1.3 ml
Distile su	7.7 ml
%10 APS (Amonyum peroksidisülfat)	100 µl
10XTEB	1 ml
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametil Etilen Diamin)	20 µl

Tablo 3.18: % 6'lık poliakrilamid ayırma jel solüsyonunun hazırlanması.

İÇERİK	MİKTAR
%30 (29:1) (29 g akrilamid ve 1 g bis-akrilamid)	8 ml
Distile su	28 ml
%10 APS (Amonyum peroksidisülfat)	250 µl
10XTEB	4 ml
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametil Etilen Diamin)	50 µl

Ayırma jeli yapılırken Tablo 3.14, Tablo 3.16 ve Tablo 3.18'deki ayırma jelleri için belirtilen bileşenler 100 ml'lik beher içerisinde sırasıyla karıştırıldı. Daha sonra bu karışımın 10-15 dakika vakumlu pompa ile havası alındı. Ardından polimerizasyonun hızlı bir şekilde gerçekleşmesi için APS ve TEMED jel karışımına eklendi ve ayırma jeli kasete döküldü. Ayırma jeli yüzeyinin düzgün polimerleşmesi için polimerizasyon gerçekleşmeden önce üzeri 2 ml dH₂O ile kapatıldı. Ayırma jelinin polimerleşmesinin ardından aynı şekilde hazırlanan yükleme jelide üzerine döküldü. Jellerin dökülme işlemi, 50 ml'lik plastik enjektör ucuna takılan 20-200 µl'lik mikropipet ucu yardımı ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde gerçekleştirildi. Yükleme jelinin döküm işlemi bitir bitmez 30 kuyucuklu tarak yerleştirildi ve yaklaşık saat polimerizasyon için beklendi (Mathieu-Daude ve diğ., 1996).

Jel elektroforezi işlemleri aşağıdaki sıraya göre yapıldı. Elektroforez işlemleri sırasında kullanılan tampon çözeltilerin içerikleri Tablo 3.19 ve tablo 3.20'de verilmiştir.

- PCR ürünleri (20 µl), 20 µl yükleme solüsyonu ile karıştırıldı ve ardından 95 °C'da 5 dakika denatüre edildikten sonra buza gömülüp 10 dakika bekletildi ve daha sonra poliakrilamid jeli yüklendi.
- Elektroforez işlemi 200-300 V sabit güçte, 12-21 saat süresince gerçekleştirildi. Elektroforez işleminde yürütme tamponu olarak 1XTBE tamponu kullanıldı.
- Yürütme işlemi sonunda camlar birbirinden ayrıldı ve jel uygun boyuttaki plastik boyama kabına alındı.
- Elektroforez işleminin sonunda poliakrilamid jelde farklı patern gösteren bantların gözlenebilmesi için gümüş boyama yapıldı.

Tablo 3.19: SSCA yükleme solüsyonunun hazırlanışı.

İSİM	İÇERİK	SON KONSANTRASYON
SSCA YÜKLEME SOLÜSYONU	NaOH	10 mM (w/v)
	Formamid	% 95 (v/v)
	Bromofenol mavisi	% 0.05 (w/v)
	Ksilen siyanol (X.C.)	% 0.05 (w/v)

Tablo 3.20: Stok SSCA yürütme tamponunun hazırlanışı.

İSİM	İÇERİK	MİKTAR
TBE TAMPONU 5X/1 litre	Trizma baz	54 g
	Borik asit	27.5 g
	0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)	20 ml

3.2.7. Gümüş Boyama Yöntemi

DNA bantlarının belirlenmesi amacı ile poliakrilamit jeller, elektroforezin bitimini takiben gümüş boyama tekniği uygulanarak boyandı. Gümüş boyama tekniğinde kullanılan tamponlar ve içerikleri aşağıdaki Tablo 3. 21’de verilmektedir.

Tablo 3.21: Gümüş boyama tekniğinde kullanılan tampon çözeltiler ve içerikleri.

İSİM	İÇERİK
Fiksasyon solüsyonu	%10 Etil alkol (v/v) %0.5 Asetik asit (v/v)
Boyama solüsyonu	%0.1 Gümüş nitrat (w/v)
Geliştirme solüsyonu	%1.5 NaOH (w/v) %0.01 NaBH ₄ (w/v) %0.4 Formaldehit (v/v)
Durdurma solüsyonu	%0.75 NaCO ₃ (w/v)

Jeldeki DNA’ların görüntülenmesi amacı ile yapılan gümüş boyamanın aşamaları aşağıda verildi (Tullo ve Sbisà, 2002)

- Jel, fiksasyon çözeltisinde 10 dakika bekletildi.
- Fiksasyon çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra jel 1 dakika dH₂O ile yıkandı.

- Daha sonra 4°C'a kadar soğutulmuş gümüş nitrat çözeltisinde 30 dakika bekletildi.
- Jel 1 dakika dH₂O ile yıkandı.
- Ardından jel, geliştirme solüsyonu ile DNA bantları görünür hale gelene kadar bekletildi.
- Geliştirme solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra reaksiyonun durdurulması için jel % 0.75 lik NaCO₃ solüsyonunda 3 dakika bekletildi.
- Son olarak jel, dH₂O ile yıkandı ve kurutulmaksızın seffaf bir plastik koruyucuya alınıp 4°C'da saklandı.

Gümüş boyama tekniği ile boyanan jellerin renkli fotğrafları çekildi ve/veya bilgisayar programı ile taranarak saklandı.

Faktör VIII geninin promotor bölgesi ve 26 eksonunun SSCA tekniği ile analizi sonucunda 5 ekson bölgesinde farklı paternler gösteren bireyler saptandı. Bu bölgelere ait bireylerin PCR'ları tekrarlandı ve saflaştırma işleminden sonra dizileme analizine gönderildi.

3.2.8. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR sonucu elde edilen ürünlerin tamamı saflaştırma işleminde kullanıldı. Saflaştırma işlemi "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche 11 732 668 00) kullanılarak üreticinin önerdiği protokole göre aşağıdaki gibi yapıldı.

- PCR ürünlerinin üzerine 100 µl bağlanma tamponu eklendi ve iyice süspansedildikten sonra santrifüj kolonuna aktarıldı.
- 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Tüpün altında kalan sıvı atıldı ve kolonlara 100 µl yıkama tamponu eklendi. 13.000 rpm'de tekrar santrifüj edildi ve tüpün altında kalan sıvı atıldı.

Yıkama tamponu ile yıkama aşaması ikinci kez tekrarlandı. Kolonlar 1.5'lik yeni santrifüj türlerine aktarıldı. Tüplere 30 µl ayrıştırma tamponu eklendi ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüjün ardından saflaştırılmış DNA elde edilmiş oldu.

3.2.9. DNA Dizi Analizi

Faktör VIII geni promotor ve 26 ekson bölgesi PCR'ları için yapılan SSCA çalışmaları sonucunda; bu gen bölgeleri ile ilgili olarak SSCA paternleri belirlendi. Bu paternlere göre değişiklik gösteren 13 hastaya ait PCR örneği tespit edildi. Bu PCR örneklerinde, bilinmeyen bir mutasyon ya da polimorfizmin varlığının belirlenmesi için PCR ürünlerinin ait olduğu hasta DNA'ları tespit edilerek DNA dizi analizi tekniği ile doğrulanması hedeflendi.

Faktör VIII genin belirlenen bölgelerinde SSCA ile farklı bir patern saptanan hastalara ait DNA'lar otomatize sistemlerde DNA dizi analizini ticari olarak yapan bir firma olan İONTEK'e gönderildi. Son yıllarda gerek rutin gerekse araştırma amacı ile otomatize DNA dizi analizi sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tip genetik analiz sistemleri bir kerede floresan işaretli DNA parçalarını otomatik olarak, kapiler jel elektroforezi ile ayıran, saptayan ve analiz eden sistemlerdir. DNA dizi analizi çalışması Sanger'in dideoksi zincir sonlanması yönteminin değişikliğe uğratılmış şekli ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; DNA polimeraz, uzayan zincire nükleotidleri eklerken normal bir nükleotid yerine onun dideoksisi gelirse bu nükleotidde serbest 3'OH grubu bulunmadığından zincir uzaması sonlanmakta, böylelikle farklı uzunlukta DNA bantları oluşmaktadır. Dizileme sistemindeki bu dideoksi nükleotidlerin başka bir özelliği floresan bir madde ile işaretli olmalarıdır. Böylelikle farklı boyutlardaki bu DNA bantları aynı zamanda floresan ile işaretlenmektedir. DNA bantları; kapiler jel elektroforezi ile uzunluklarına göre ayrılırlar, bu ayrıma göre bir profil oluşumu sağlanmaktadır, böylelikle dört deoksiribonükleotid bazın DNA'daki dizi belli olmaktadır.

Bu çalışmada faktör VIII geninin 5 farklı bölgesine ait 13 bireye ait PCR ürünleri incelendi. Bunun için ilk olarak, incelenmesi istenen DNA örneklerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu bölümünde belirtilen bölgelere özgü PCR koşulları ve PCR programları ile tekrar çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgeler PCR saflaştırma işleminden sonra, Polimeraz Zincir Reaksiyonu bölümünde verilen özgül ileri (forward) primerleri, bağlanma sıcaklıkları ve dizi boyutu bilgileri ile birlikte İONTEK firmasına gönderildi. Alınan sonuçlar faktör VIII gen bölgesi dizi bilgileri ile karşılaştırılarak yorumlandı.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA GRUBU

Çalışma kapsamına alınan 20 venöz trombozlu hastanın 7'sini (%35) kadın, 13'ünü (%65) erkek birey oluşturmuştur. Hastaların yaşları 01 ile 42 arasında değişmektedir. Ortalama yaş, kadınlarda 23 ± 15 ; erkeklerde 23 ± 18 ; tüm hastalarda ise 23 ± 17 'dir. Kontrol grubunda çalışılan 20 kişinin, 7'sini (%35) kadın, 13'ünü (%65) erkek birey oluşturmuştur. Kontrol grubu kişilerin yaşları 40 ile 85 yaş arasında değişmektedir. Kadınların yaş ortalaması 47 ± 5 ; erkeklerin yaş ortalaması 50 ± 14 ve tüm kontrollerin yaş ortalaması ise 49 ± 12 'dir. Çalışma kapsamına alınan venöz trombozlu hastalara 1-20 arasında numaralar verildi, sağlıklı kontrol grubu bireylere ise 21-40 arasında numaralar verilmiştir.

4.2. YÖNTEMLER

4.2.1. Faktör VIII Düzeyinin Belirlenmesi

Faktör VIII düzeyleri, 20 kişilik hasta grubu ve 20 kişilik kontrol grubunu oluşturan bireylere ait 5'er ml'lik sitratlı tüplere alınan kan materyallerinde STA-Deficient VIII (Statik Zamanlama analizi: *Static Timing Analysis=STA*) kiti kullanılarak ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen sonuçların ortalamaları Tablo 4.1'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol gruplarına ait Faktör VIII düzeyleri sonuçları.

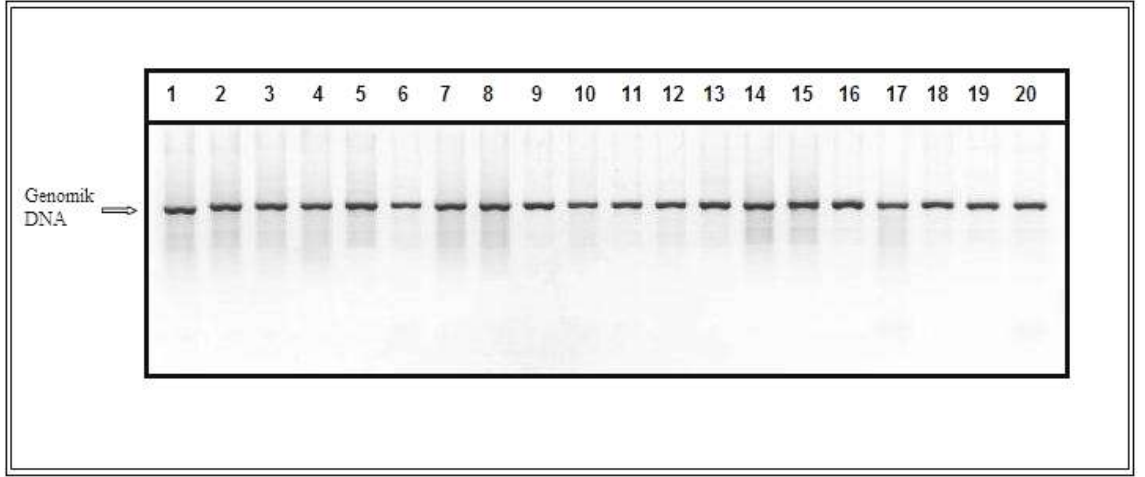
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
Faktör VIII Düzeyi	237 ± 46	122 ± 38

4.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu, 20 kişilik hasta grubu ve 20 kişilik kontrol grubunu oluşturan bireylere ait 5'er ml'lik EDTA'lı tüplere alınan kan materyallerinden, Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

4.2.3. Genomik DNA'nın Kalitatif Analizi

İzole edilen genomik DNA'lar %1'lik agaroz jel (w/v) elektroforezinde analiz edildi. 20 farklı bireyin genomik DNA'larına ait bantlar ultraviyole (U.V.) ışık altında parlak ve net tek bant halinde gözlemlendi ve örnek genomik DNA fotoğrafı çekildi.



Şekil 4.1: Genomik DNA'ların %1'lik (w/v) agaroz jeldeki örnek görünüşleri.

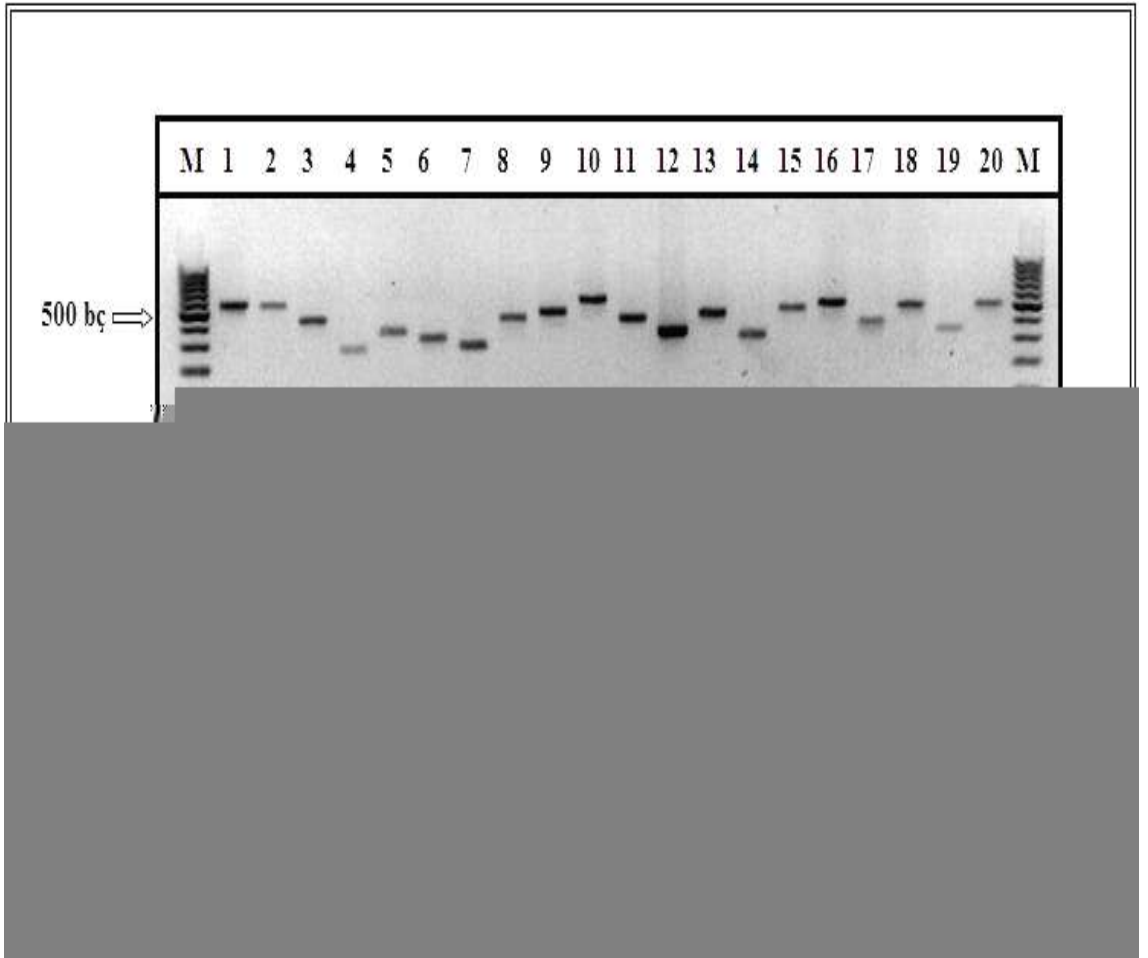
1-20 numaraları, bireylerin genomik DNA'larının yüklediği kuyuları göstermektedir.

4.2.4. Genomik DNA'nın Kantitatif Analizi

İzole edilen genomik DNA'nın kantitatif analizi, spektrofotometrik yöntemle yapıldı. Spektrofotometrik analizler sonucunda, O.D.₂₆₀ değerinden yola çıkılarak saptanan DNA konsantrasyonları birbirinden farklılık göstermekle birlikte bütün örnekler 100 ng/ml olacak şekilde TE tamponu ile dilüe edildi. Çalışmaya dahil edilen DNA'ların tümü, saflığı O.D.₂₆₀ O.D.₂₈₀ değerlerinin birbirlerine olan oranı alınarak değerlendirildi ve sonuçlar 1.62 ile 1.77 olarak belirlendi.

4.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

Genomik DNA'lardaki hedef gen bölgeleri, Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde belirtildiği gibi PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Bu amaçla; uygun oligonükleotidler kullanılarak, faktör VIII geninin promotor bölgesi ve 26 ekson bölgesi mutasyon/polimorfizm taramasında kullanılmak üzere farklı PCR programları ve koşulları uygulanarak çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezine yüklenip U.V. ışık altında incelendi ve PCR bantlarının fotoğrafı çekildi. Şekil 4.2 de örnek PCR bantları gösterilmektedir.



Şekil 4.2: PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jeldeki görünümüleri.

M harfi markır, 1-37 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyuları göstermektedir.

Her kuyucuktaki promotor bölgesi ve ekson bölgeleri şu şekildedir. (1=P1, 2=P2, 3=E1, 4=E2, 5=E3, 6=E4, 7=E5, 8=E6, 9=E7, 10=E8, 11=E9, 12=E10, 13=E11, 14=E12, 15=E13, 16=E14A, 17=E14B, 18=E14C, 19=E14D, 20=E14E, 21=E14F, 22=E14G, 23=E14H, 24=E14J, 25=E14K, 26=E15, 27=E16, 28=E17, 29=E18, 30=E19, 31=E20, 32=E21, 33=E22, 34=E23, 35=E24, 36=E25, 37=E26)

P: Promotor, E: Ekson

Faktör VIII geninin promotor ve 26 ekson bölgesinin PCR sonucu çoğaltılan gen bölgelerinin boyutları Tablo 4. 2’de verilmektedir.

Tablo 4.2: PCR ile çoğaltılan promotor ve ekson bölgelerinin boyutları.

EKSON NUMARLARI	PCR BOYUTU (bç)
P1	539
P2	545
E1	430
E2	277
E3	346
E4	319
E5	280
E6	424
E7	434
E8	548
E9	417
E10	347
E11	445
E12	320
E13	477
E14A	518
E14B	392
E14C	499
E14D	350
E14E	501
E14F	385
E14G	440
E14H	345
E14J	483
E14K	347
E15	349
E16	526
E17	492
E18	413
E19	342
E20	313
E21	152
E22	280
E23	350
E24	343
E25	373
E26	232

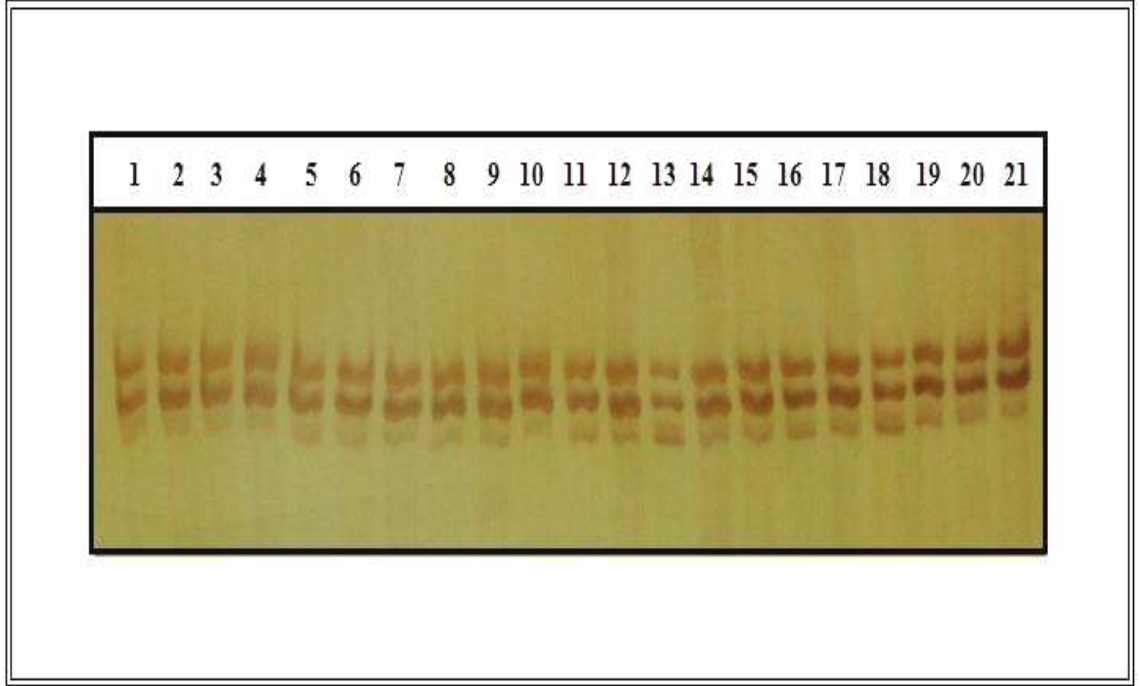
4.2.6. DNA Analiz Yöntemleri

4.2.6.1. Tek Zincir Konformasyon Analizi (SSCA) Bulguları

Faktör VIII gen bölgesi promotor ve 26 eksonunda, yüksek faktör VIII düzeyi ile ilişkilendirilecek herhangi bir mutasyon/polimorfizmin var olup olmadığını belirlemek amacı ile SSCA tekniğinden yararlanıldı. SSCA tekniği klinik olarak venöz tromboz tanısı konmuş 20 kişilik hasta grubu ve 20 kişilik sağlıklı kontrol grubu bireylerin tümüne uygulandı. Bu amaçla faktör VIII gen bölgesi promotor ve 26 ekson bölgesi için Malzeme ve Yöntem Bölümünde belirtilen koşullarda PCR yapıldı. PCR ürünleri, DNA çift sarmalını tek zincir haline getirmek için Tablo 3.19’da belirtilen SSCA yükleme solusyonu ile 1:1 oranında karıştırılarak 95 °C’da denatüre edildi. Denatüre olmayan değişik konsantrasyonlardaki SSCA poliakrilamid jellerine yüklenerek 200-300 V’ta 12-21 saat elektroforez tekniği ile analiz edildiler.

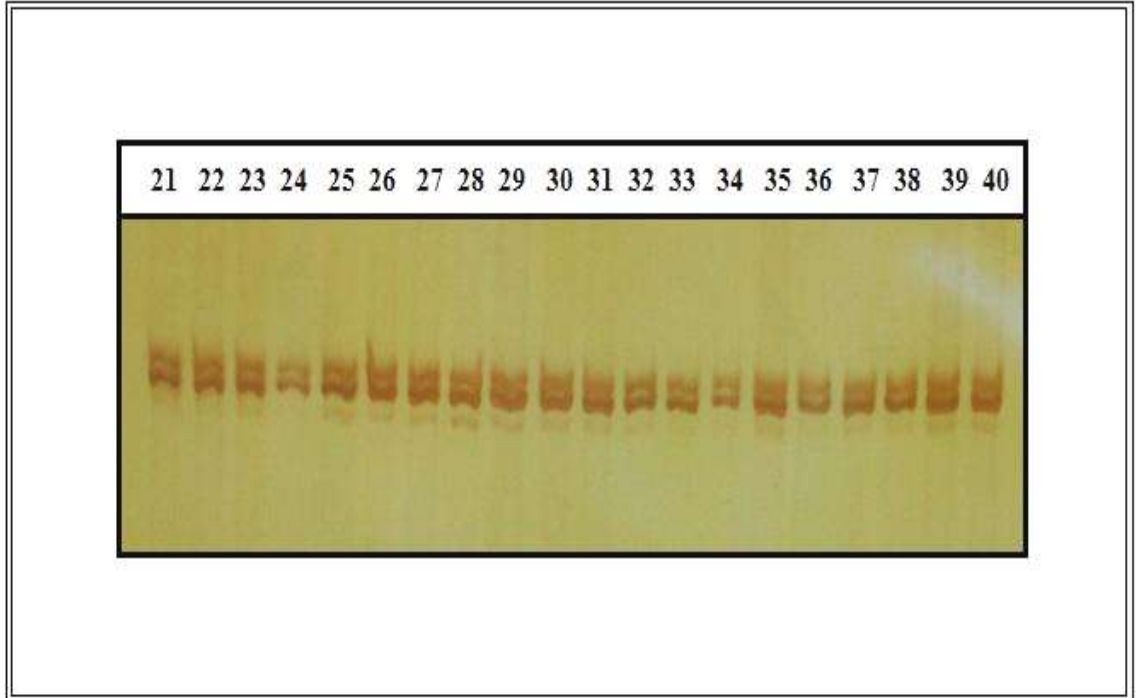
Bu analizler sonucunda Faktör VIII gen bölgesinin promotor ve tüm eksonlarına ait 37 farklı bölgenin SSCA yöntemi ile incelemeleri tamamlandı. Her bir SSCA poliakrilamid jeline 20 hasta birey ile birlikte bir sağlıklı kontrol bireyi aynı anda yüklendi. Aynı sağlık kontrol bireyi, diğer 19 sağlıklı kontrol bireyleri ile birlikte de SSCA poliakrilamid jeline yüklenerek karşılaştırma yapıldı.

Faktör VIII geninin tüm bölgelerine ait 20 hasta ve 20 sağlıklı kontrol bireyin gümüş boyama tekniği ile boyanmış SSCA poliakrilamid jel görüntülerinin aşağıdaki gibi olduğu belirlenmiştir.



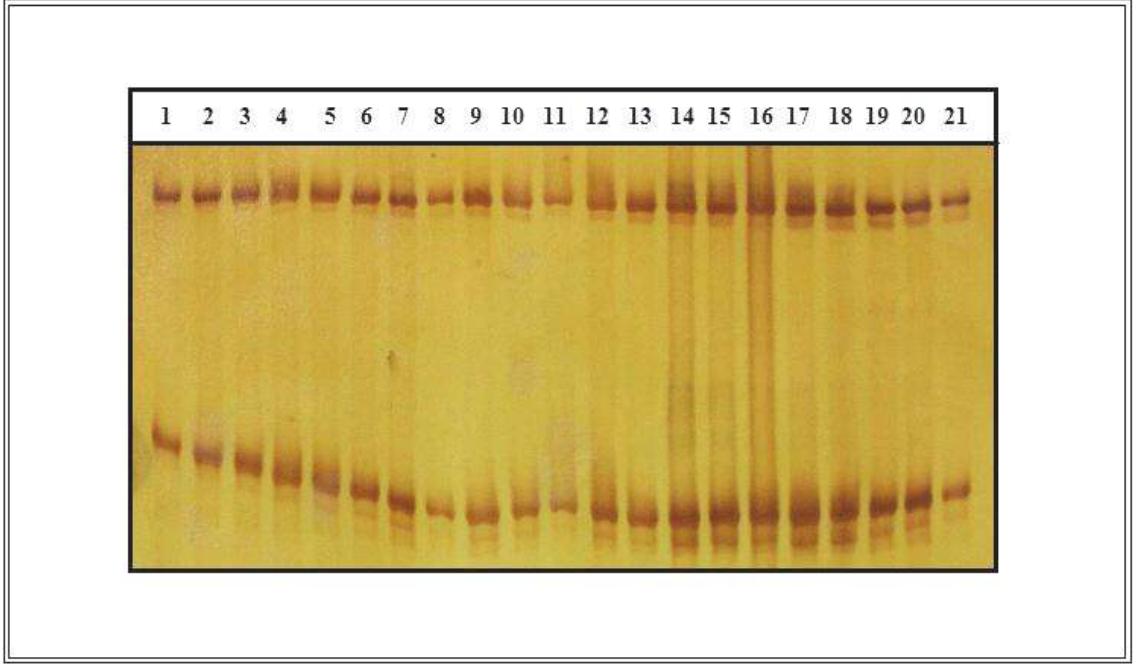
Şekil 4.3: Faktör VIII geni Promotor 1 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



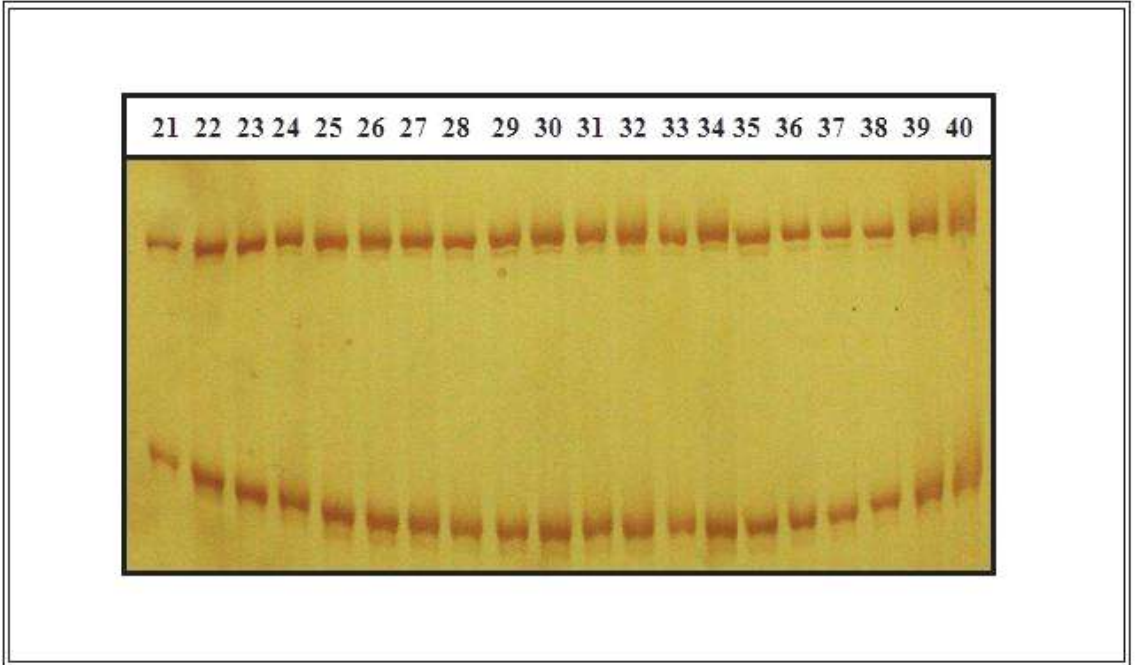
Şekil 4.4: Faktör VIII geni Promotor 1 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.



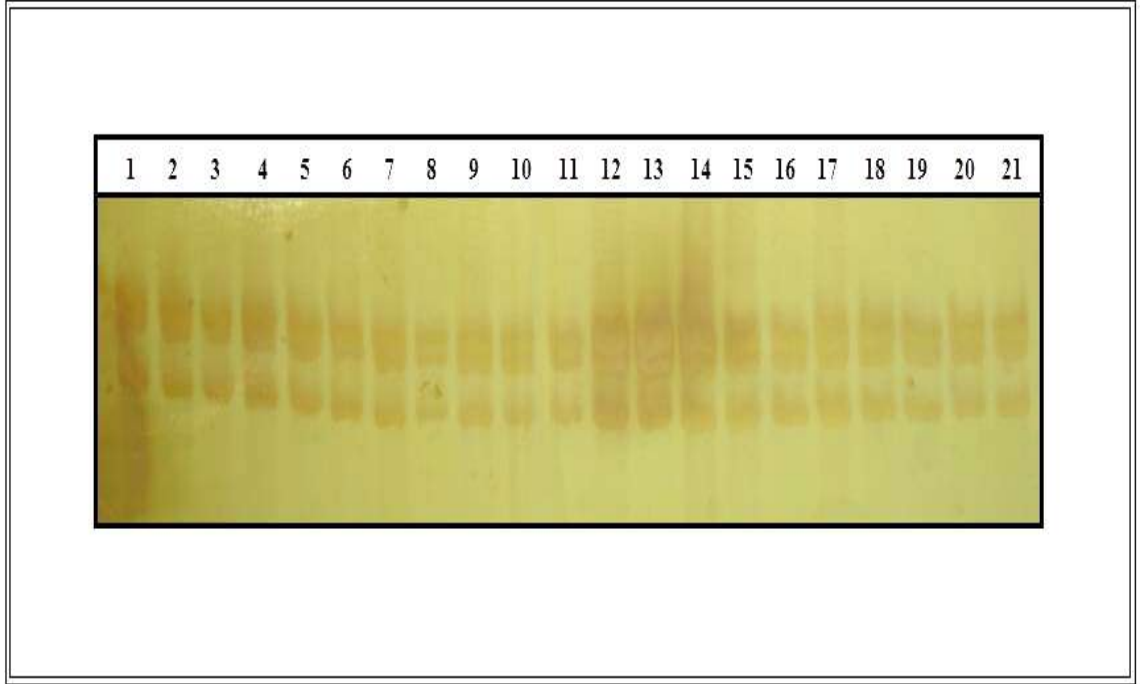
Şekil 4.5: Faktör VIII geni Promotor 2 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
1-20: Venöz tromboz hastaları.
21: Sağlıklı kontrol bireyi



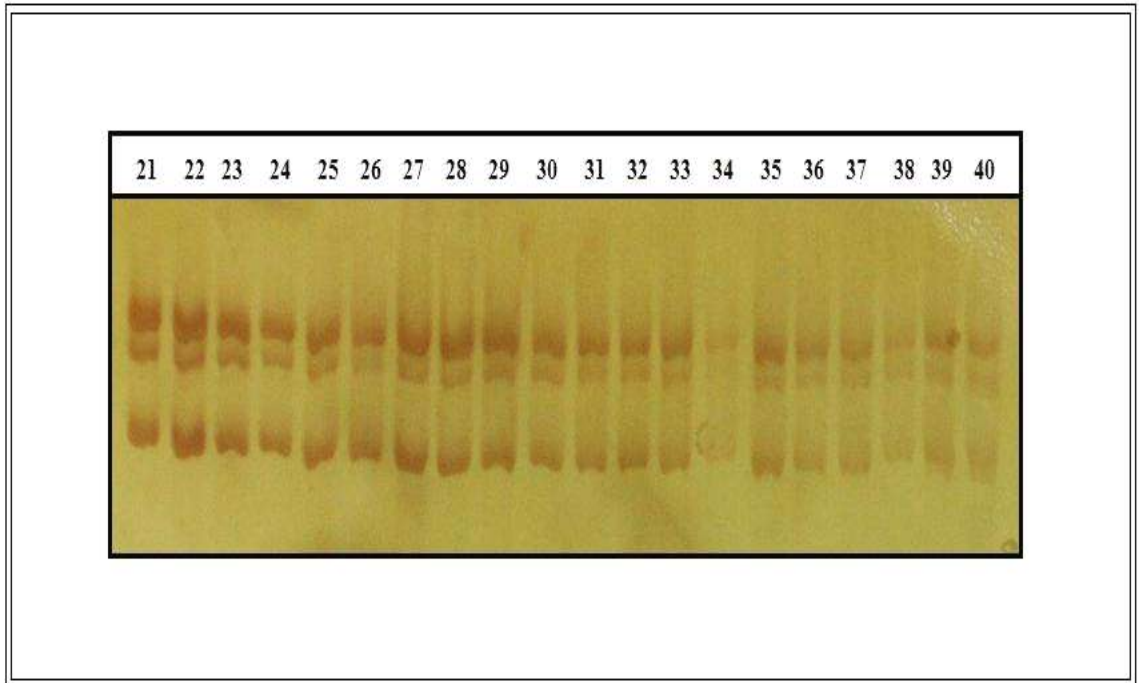
Şekil 4.6: Faktör VIII geni Promotor 2 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.



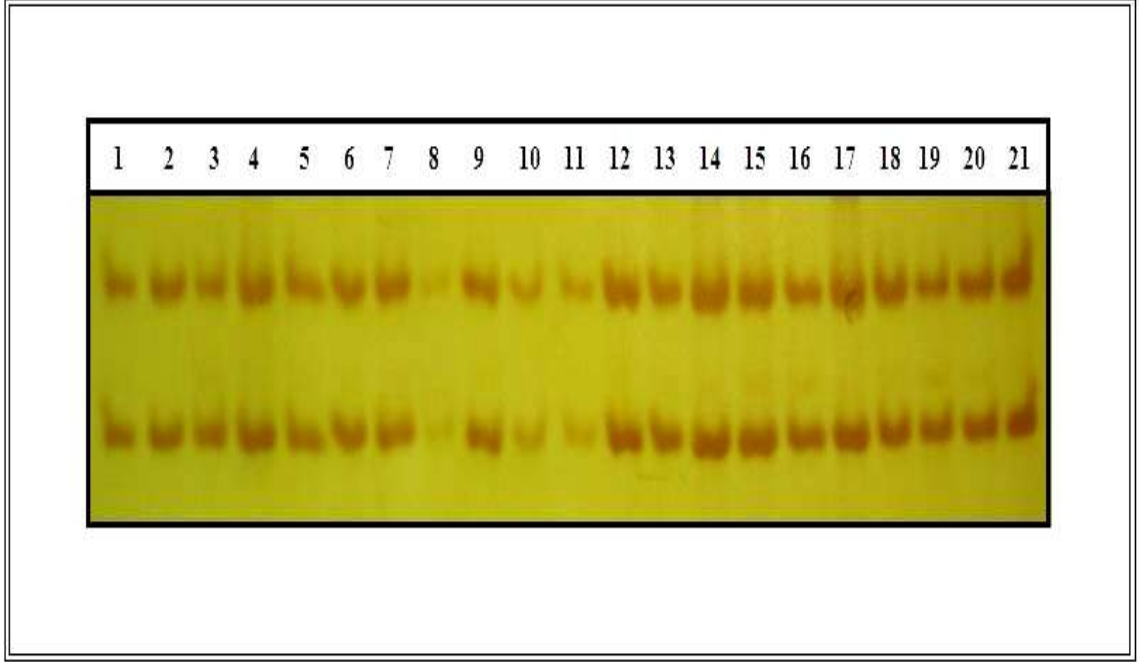
Şekil 4.7: Faktör VIII geni Ekson 1 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



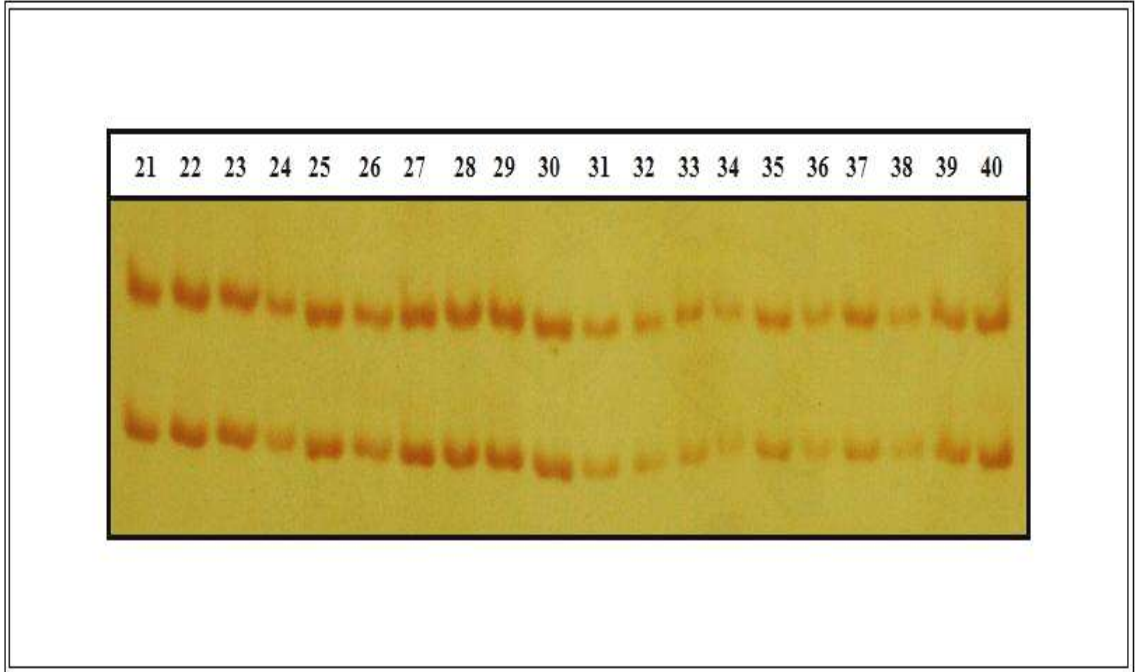
Şekil 4.8: Faktör VIII geni Ekson 1 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.



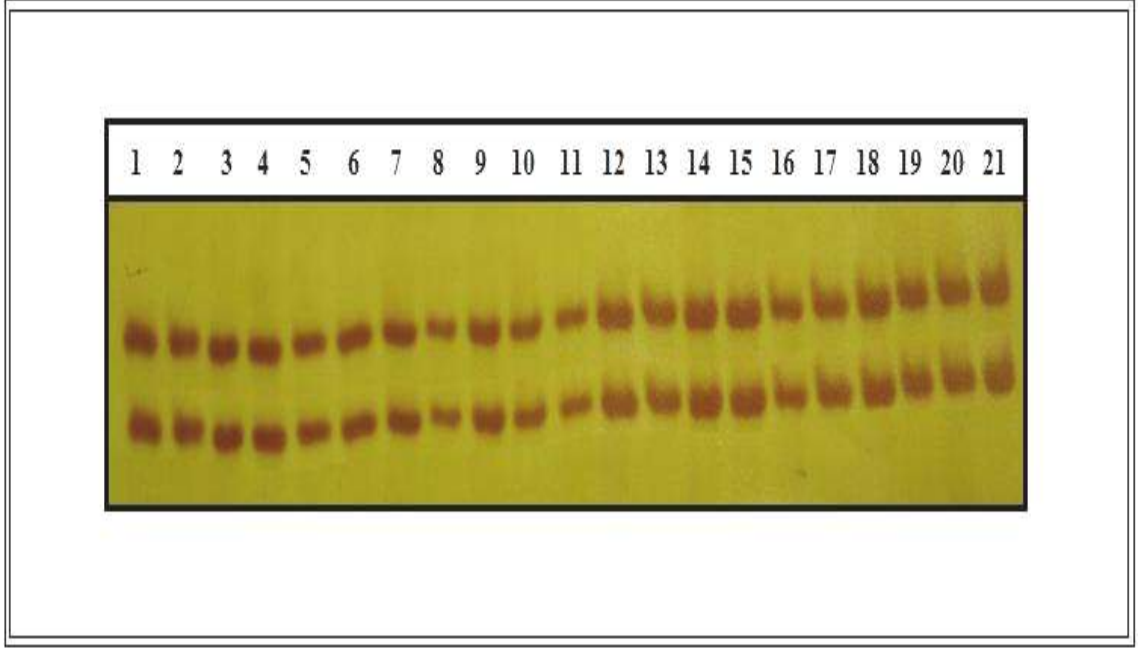
Şekil 4.9: Faktör VIII geni Ekson 2 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



Şekil 4.10: Faktör VIII geni Ekson 2 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.



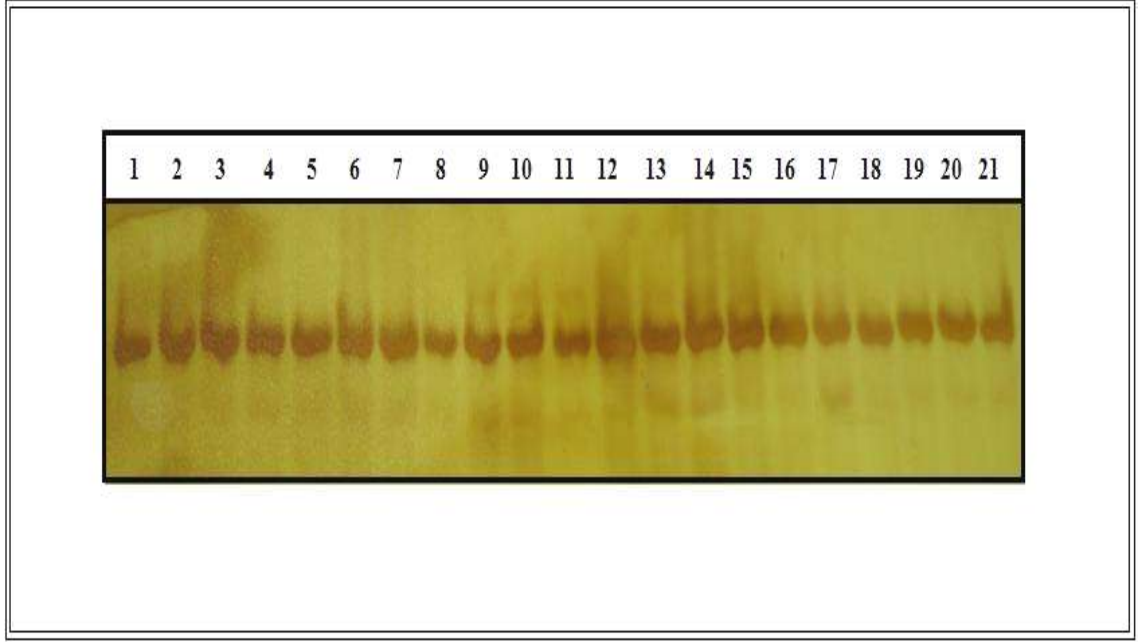
Şekil 4.11: Faktör VIII geni Ekson 3 bölgesi PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



Şekil 4. 12: Faktör VIII geni Ekson 3 bölgesi PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.

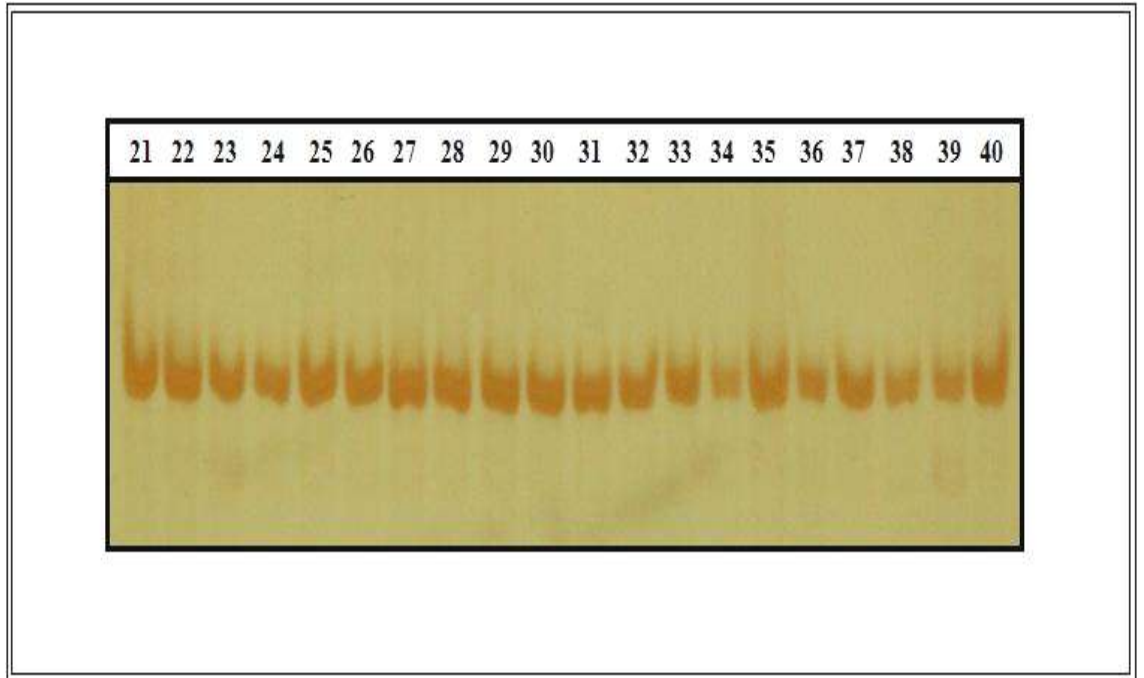


Şekil 4.13: Faktör VIII geni Ekson 4 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

1-20: Venöz tromboz hastaları.

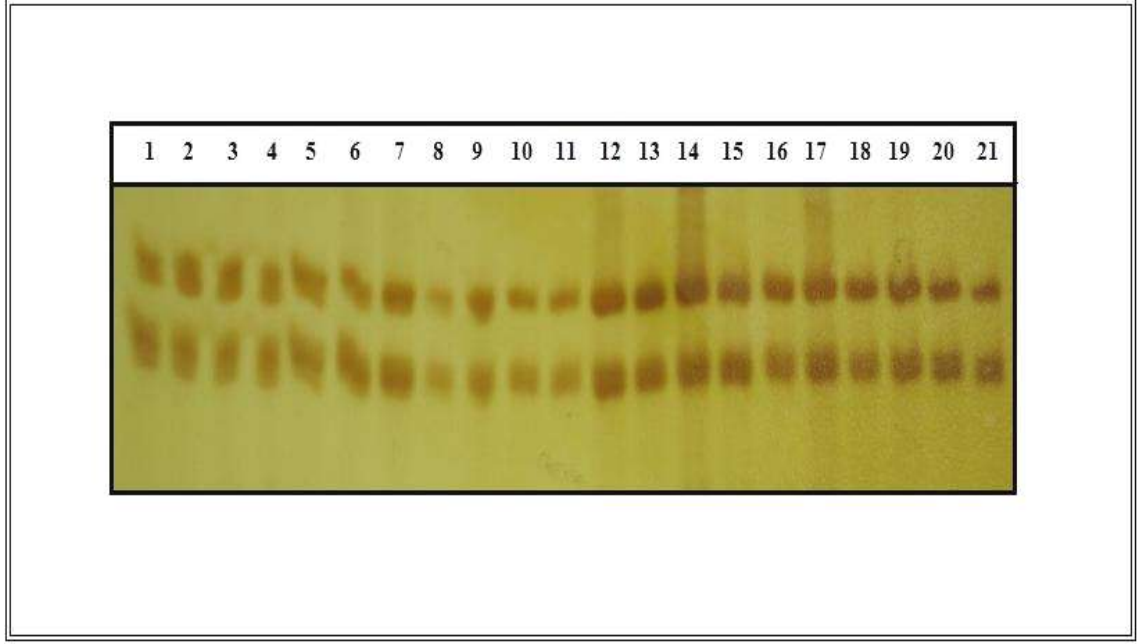
21: Sağlıklı kontrol bireyi.



Şekil 4.14: Faktör VIII geni Ekson 4 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.

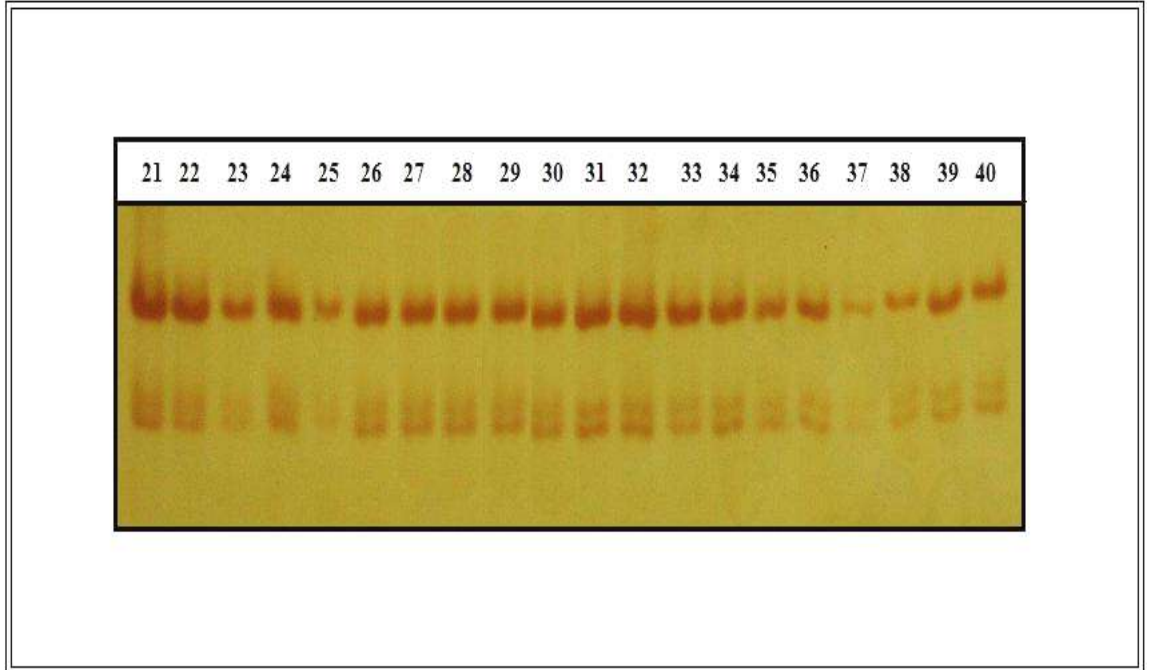


Şekil 4.15: Faktör VIII geni Ekson 5 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

1-20: Venöz tromboz hastaları.

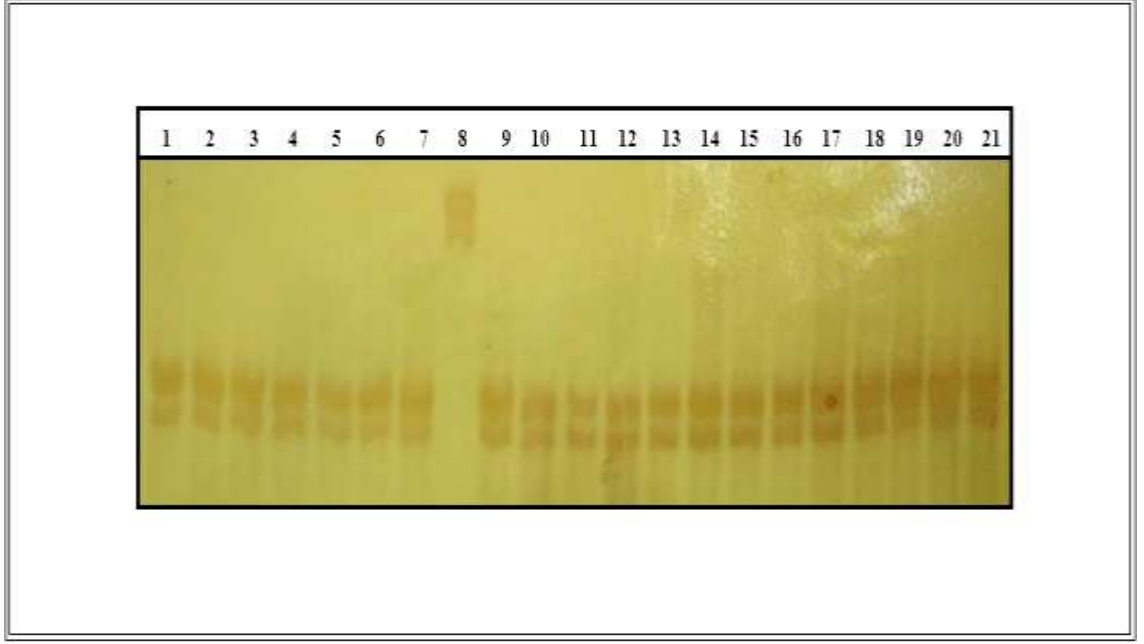
21: Sağlıklı kontrol bireyi.



Şekil 4.16: Faktör VIII geni Ekson 5 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

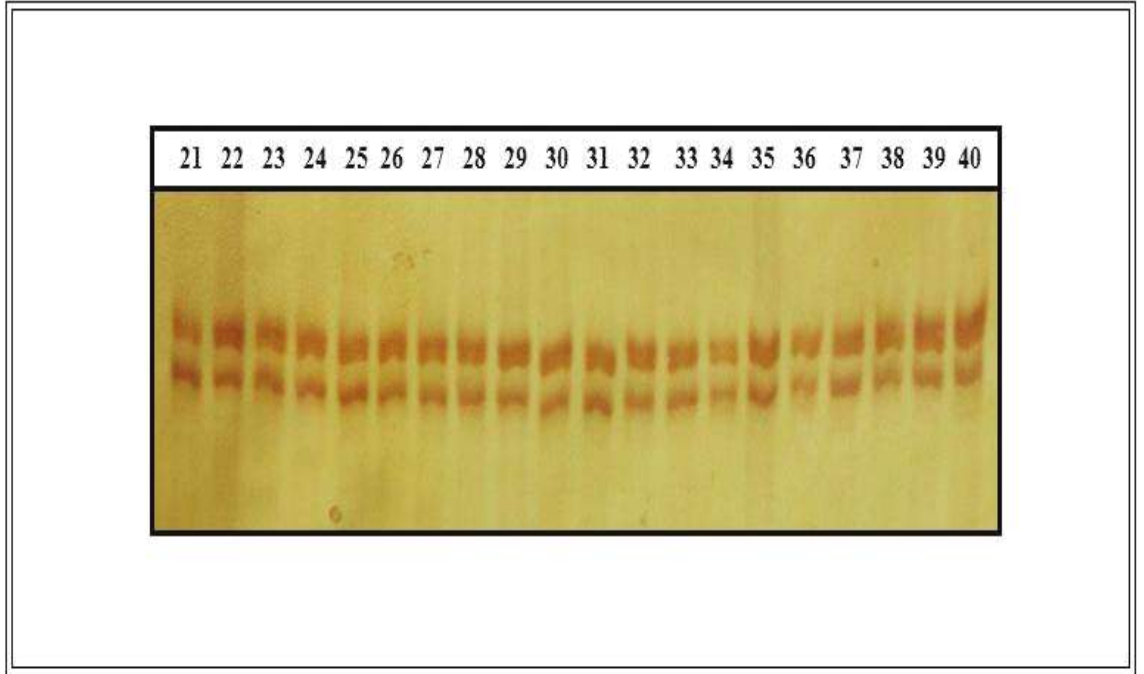
21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.



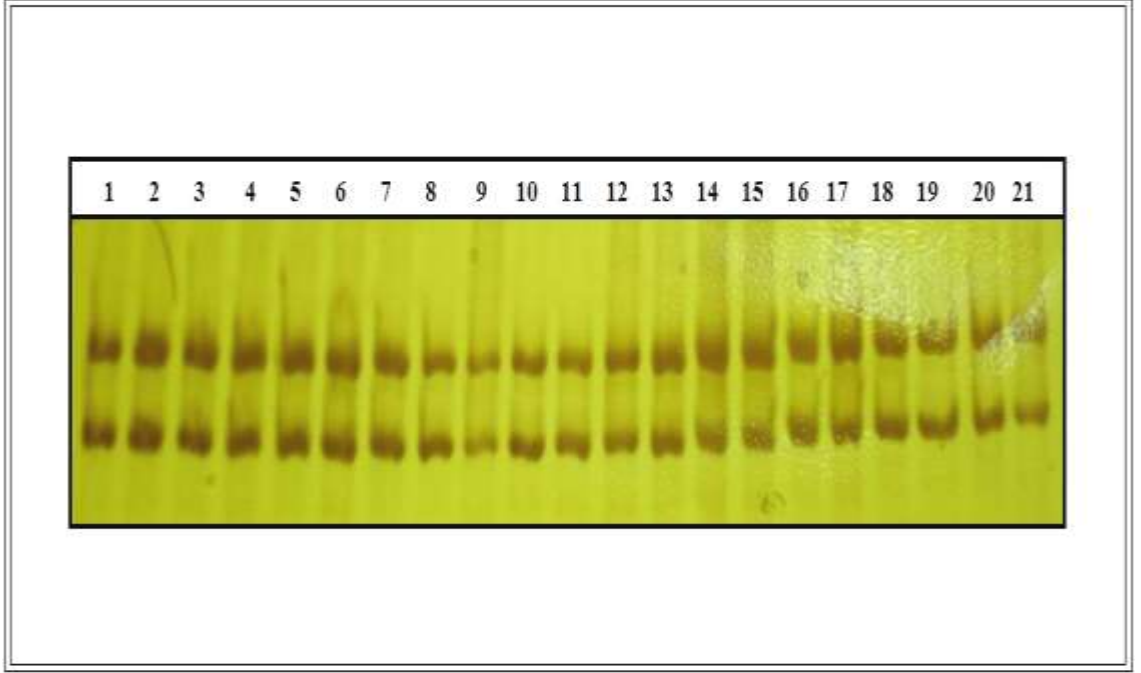
Şekil 4.17: Faktör VIII geni Ekson 6 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.
 8: Farklı patern gösteren venöz tromboz hastası.



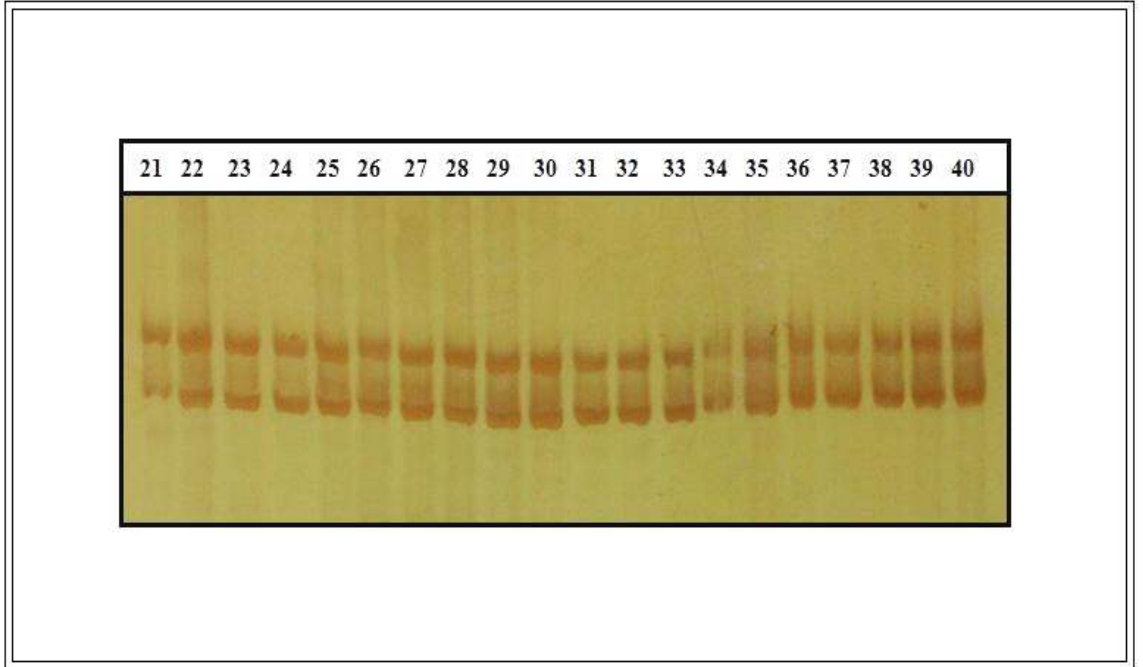
Şekil 4.18: Faktör VIII geni Ekson 6 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.



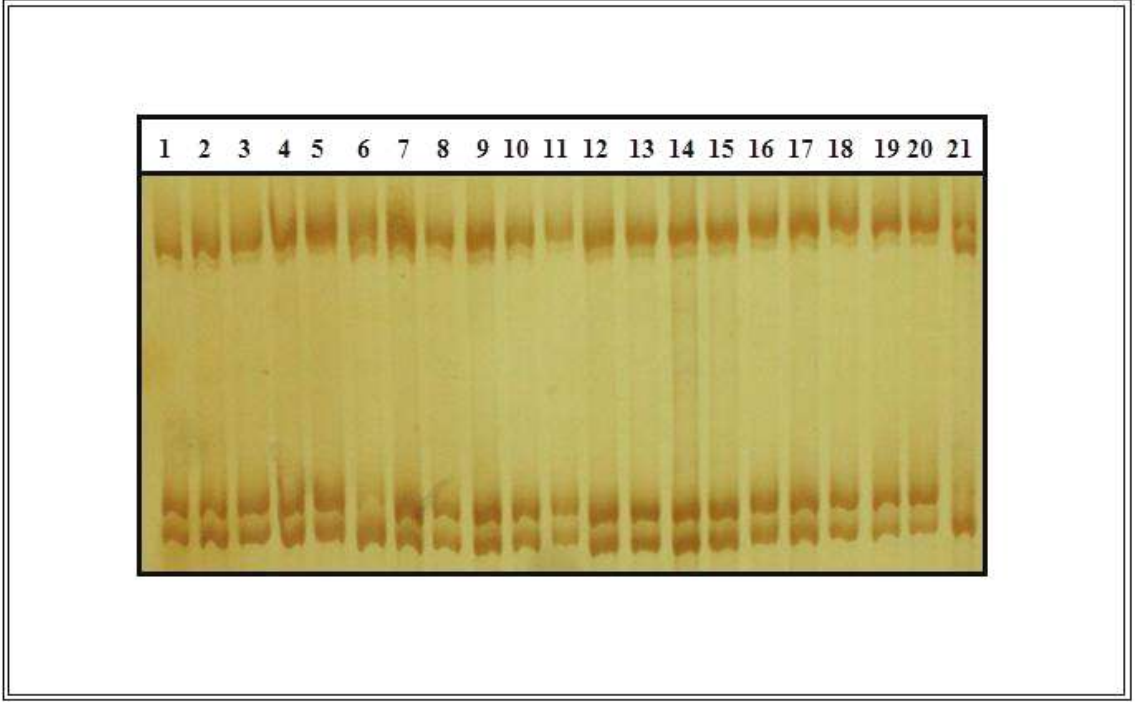
Şekil 4.19: Faktör VIII geni Ekson 7 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



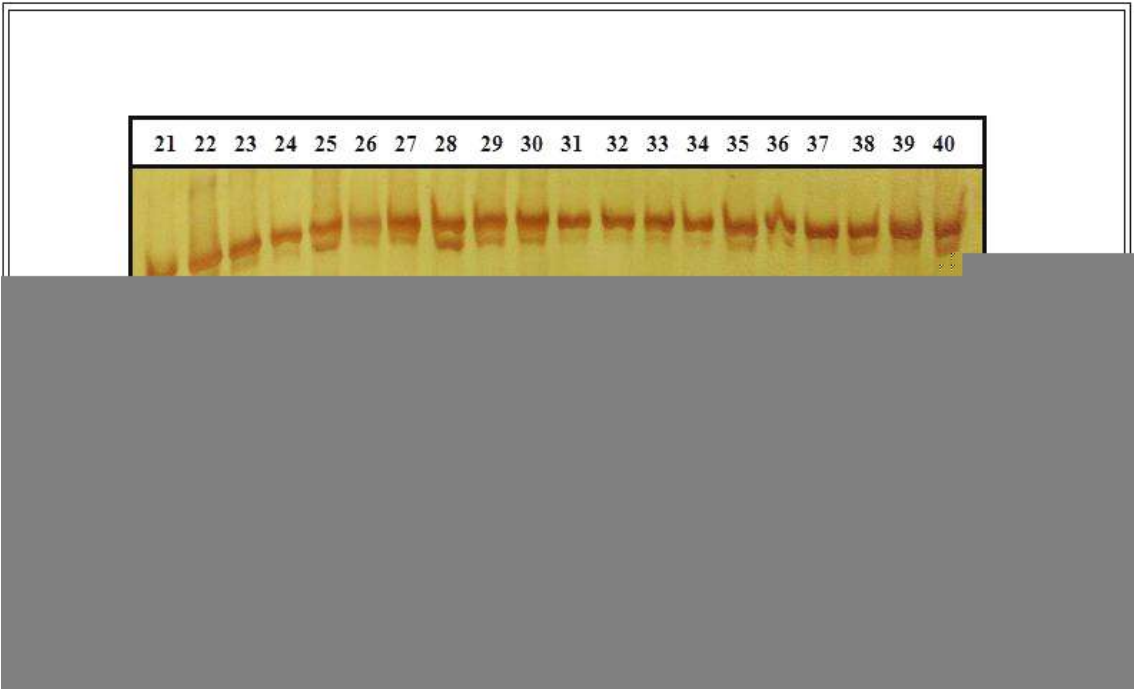
Şekil 4.20: Faktör VIII geni Ekson 7 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.



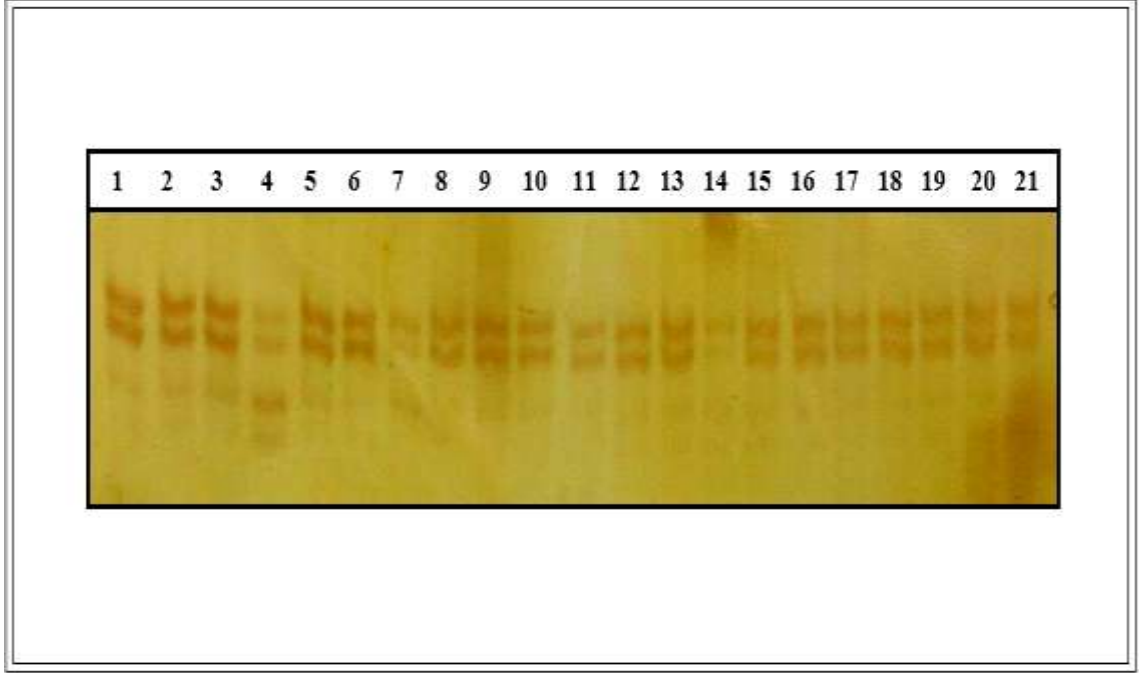
Şekil 4.21: Faktör VIII geni Ekson 8 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



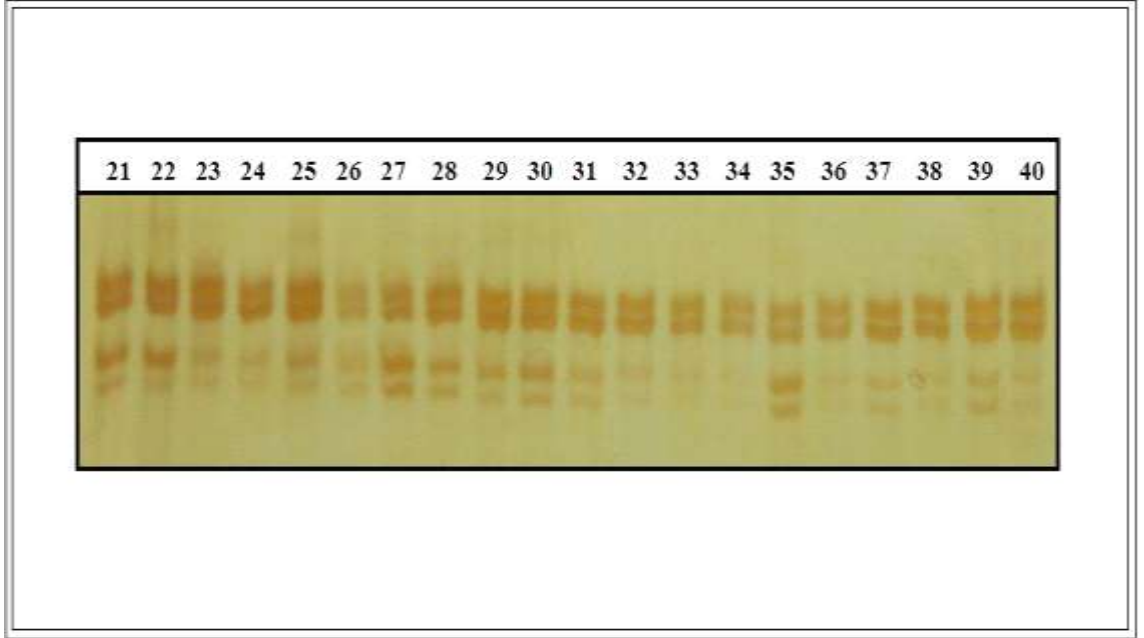
Şekil 4.22: Faktör VIII geni Ekson 8 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.



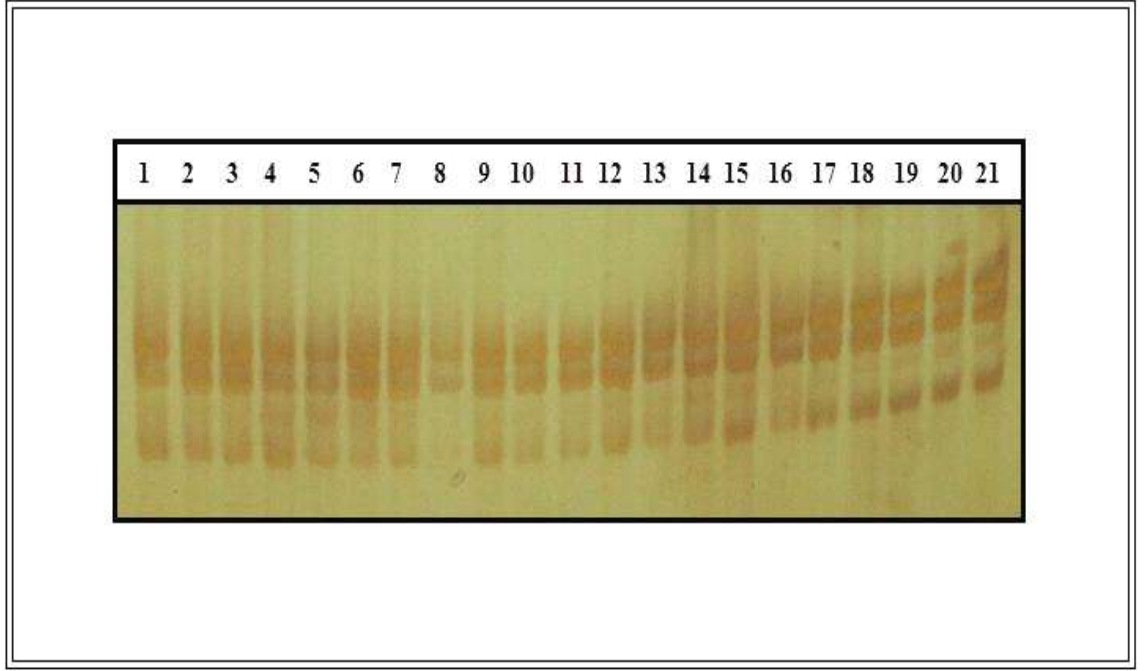
Şekil 4.23: Faktör VIII geni Ekson 9 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



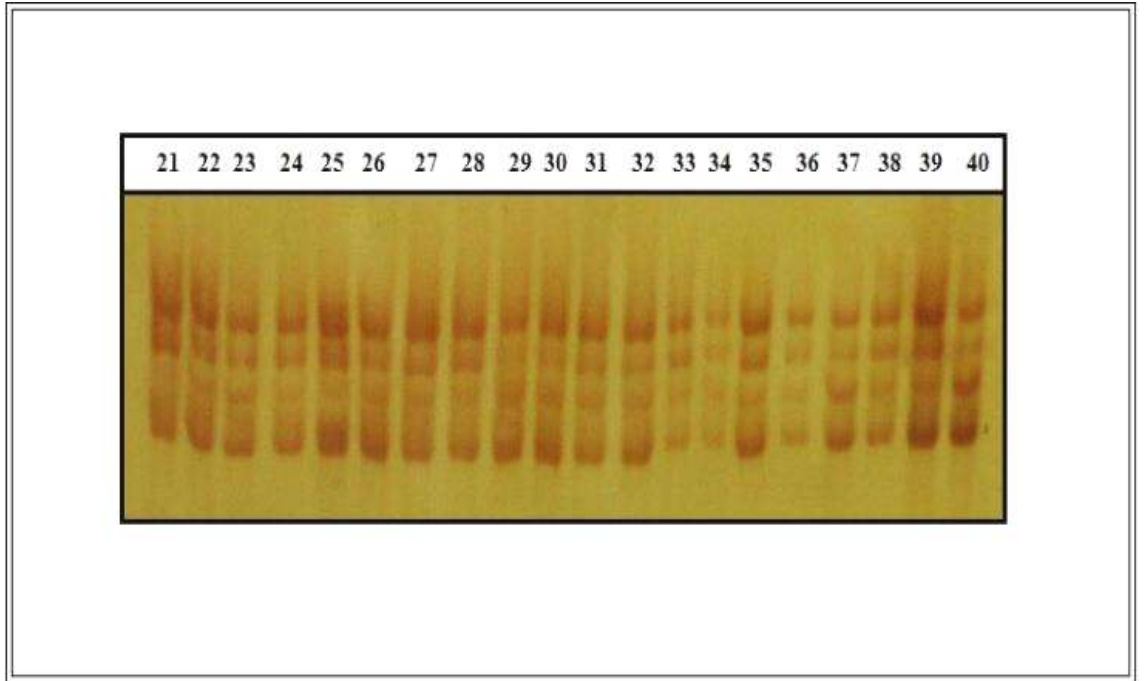
Şekil 4.24: Faktör VIII geni Ekson 9 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.



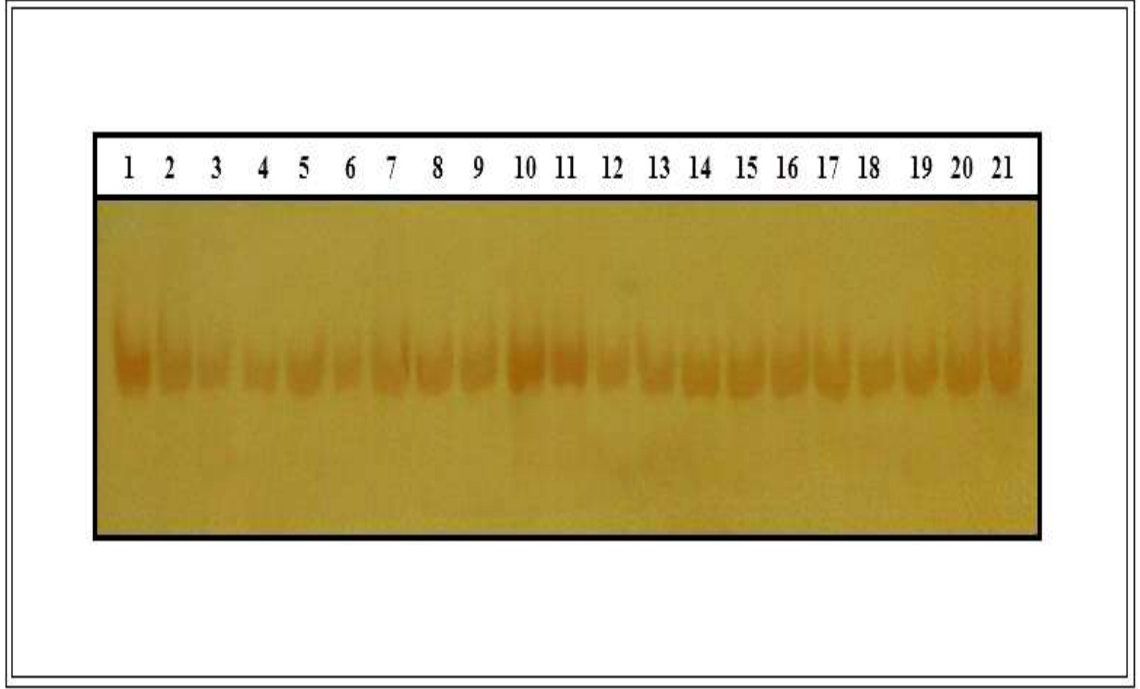
Şekil 4.25: Faktör VIII geni Ekson 10 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



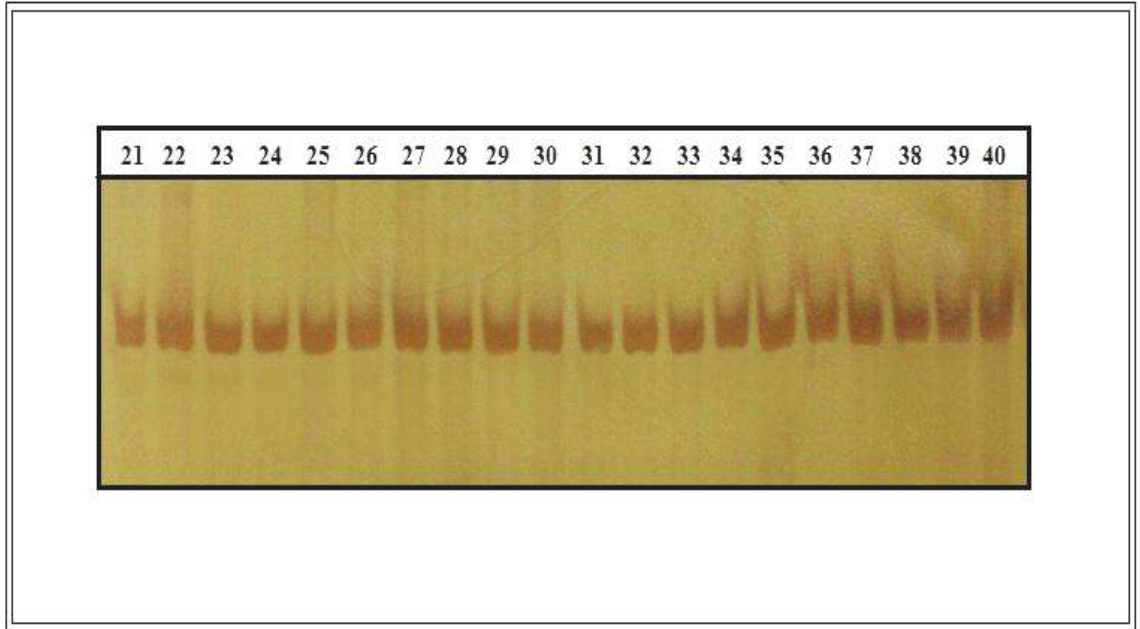
Şekil 4.26: Faktör VIII geni Ekson 10 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



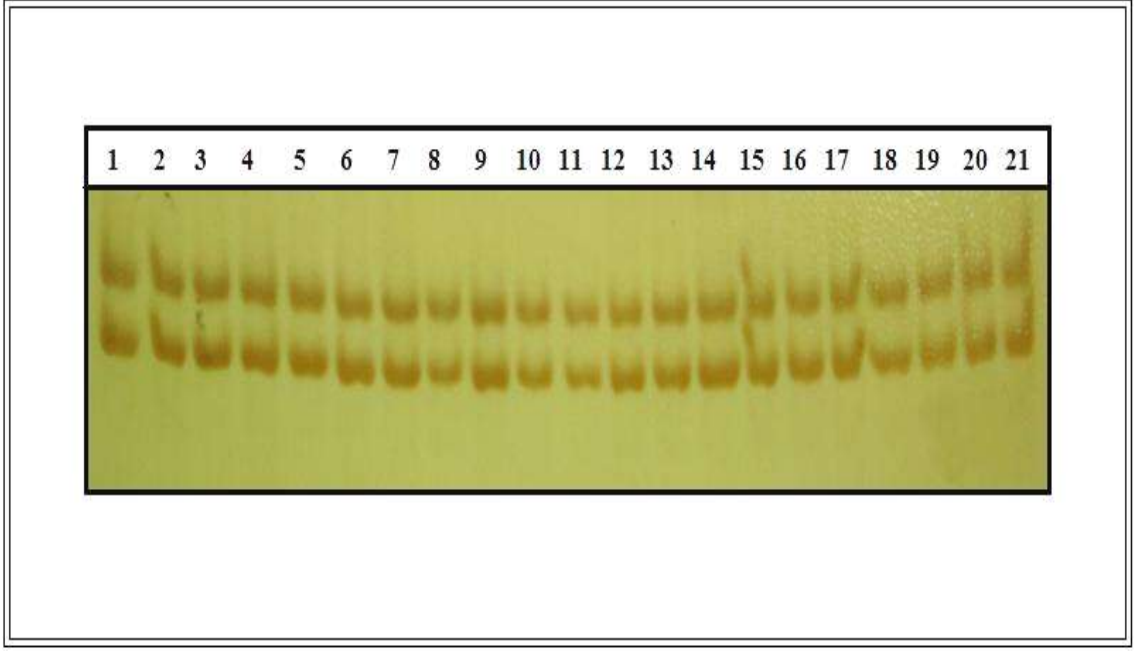
Şekil 4.27: Faktör VIII geni Ekson 11 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



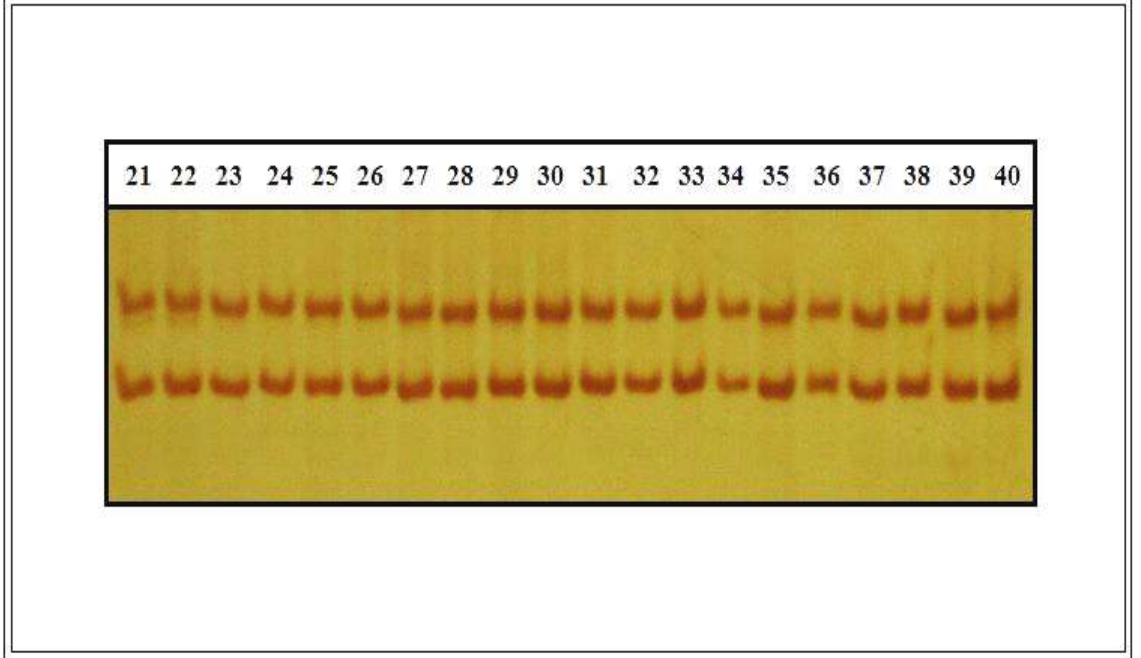
Şekil 4.28: Faktör VIII geni Ekson 11 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



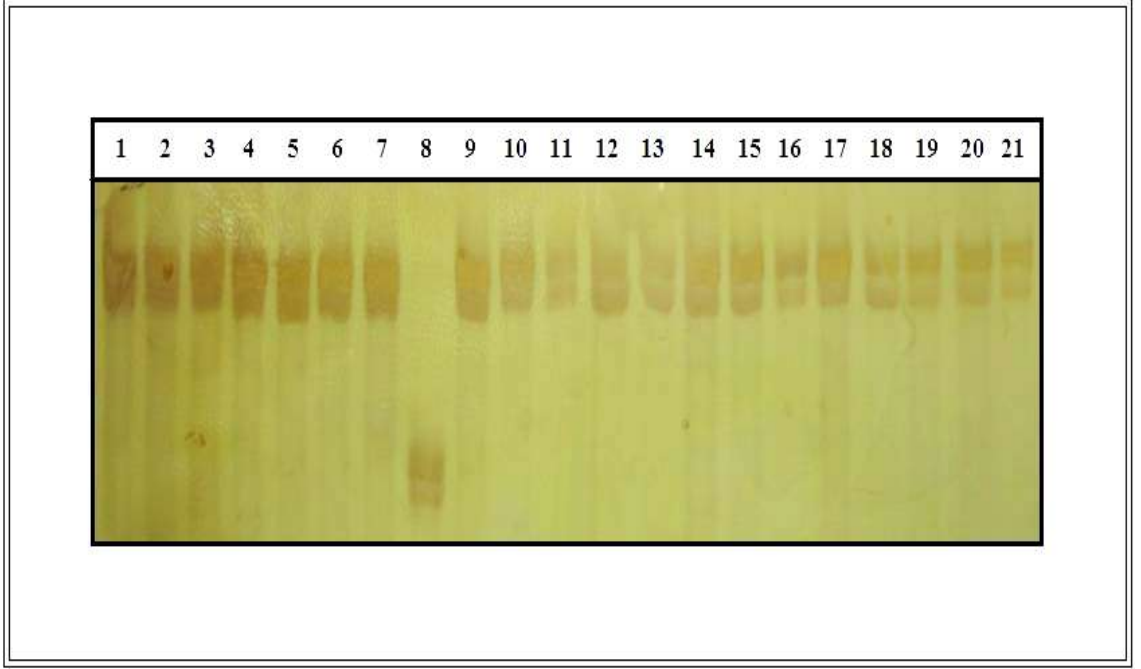
Şekil 4.29: Faktör VIII geni Ekson 12 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



Şekil 4.30: Faktör VIII geni Ekson 12 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



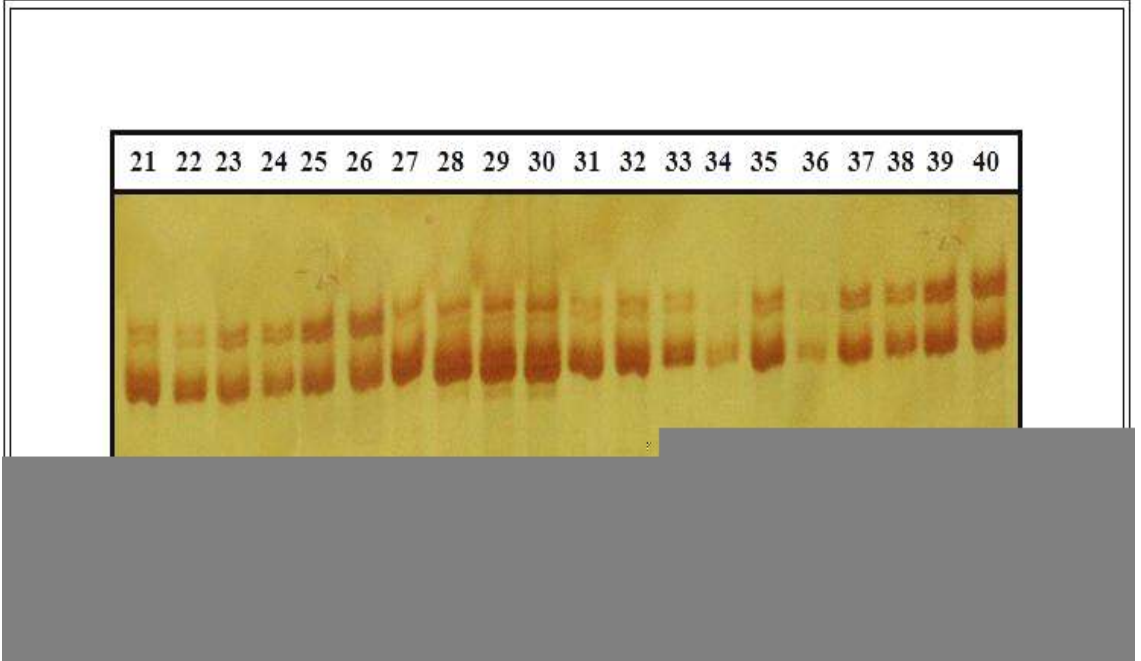
Şekil 4.31: Faktör VIII geni Ekson 13 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

1-20: Venöz tromboz hastaları.

21: Sağlıklı kontrol bireyi.

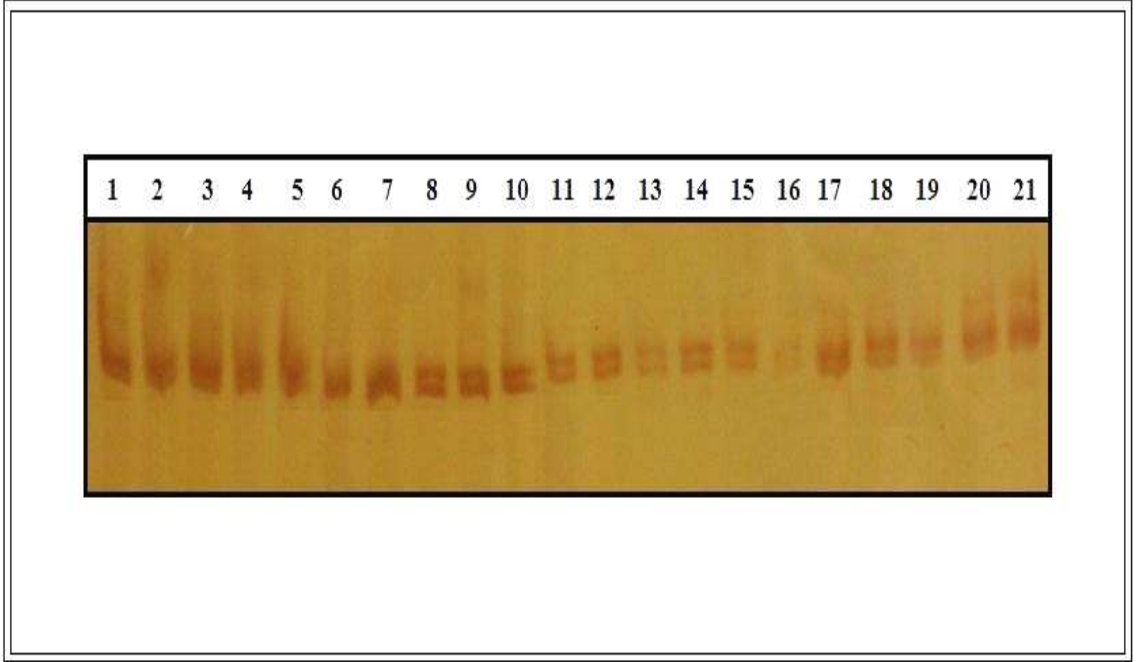
8: Farklı patern gösteren venöz tromboz hastası.



Şekil 4.32: Faktör VIII geni Ekson 13 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

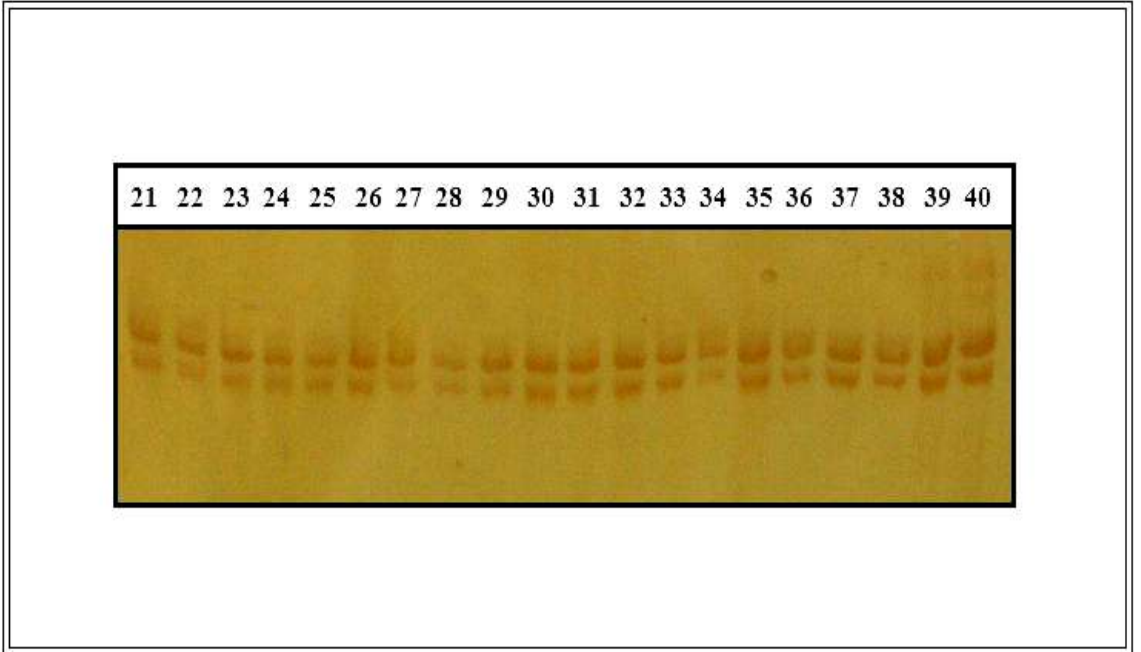
21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



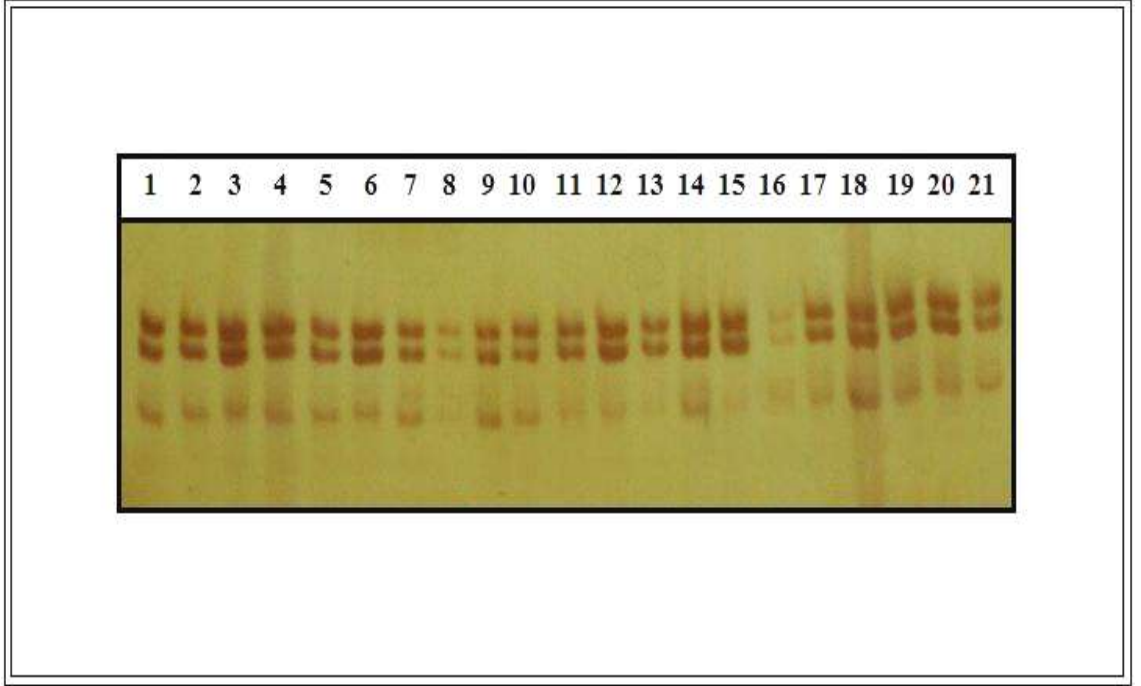
Şekil 4.33: Faktör VIII geni Ekson 14A bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



Şekil 4.34: Faktör VIII geni Ekson 14A bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri

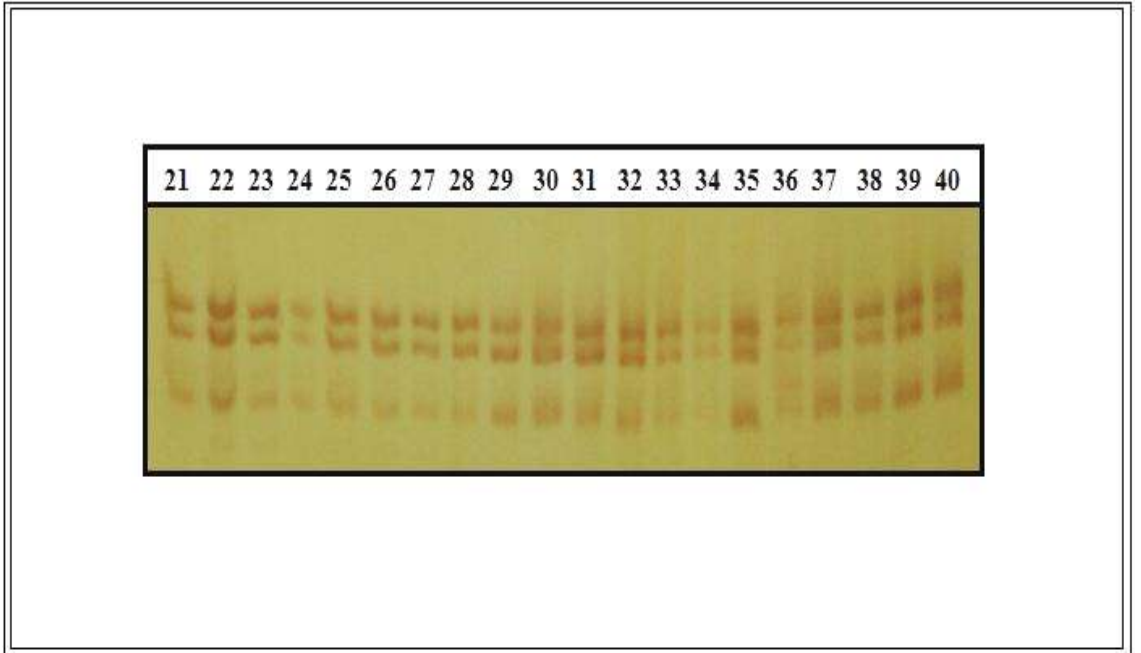


Şekil 4.35: Faktör VIII geni Ekson 14B bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

1-20: Venöz tromboz hastaları.

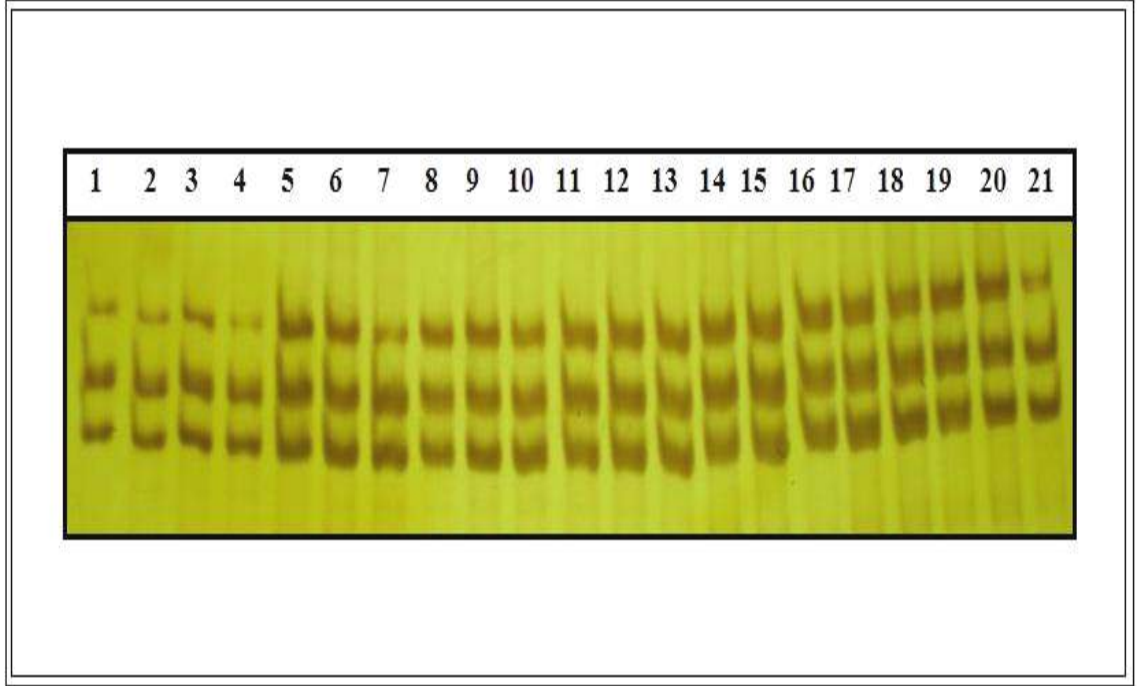
21: Sağlıklı kontrol bireyi



Şekil 4.36: Faktör VIII geni Ekson 14B bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

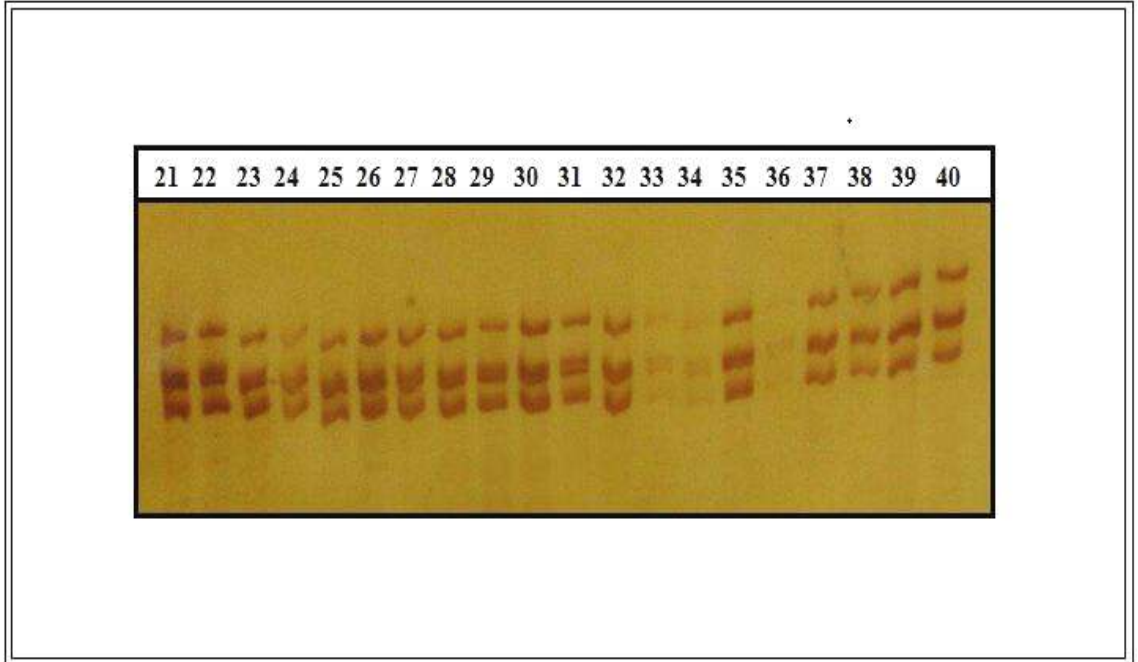
21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



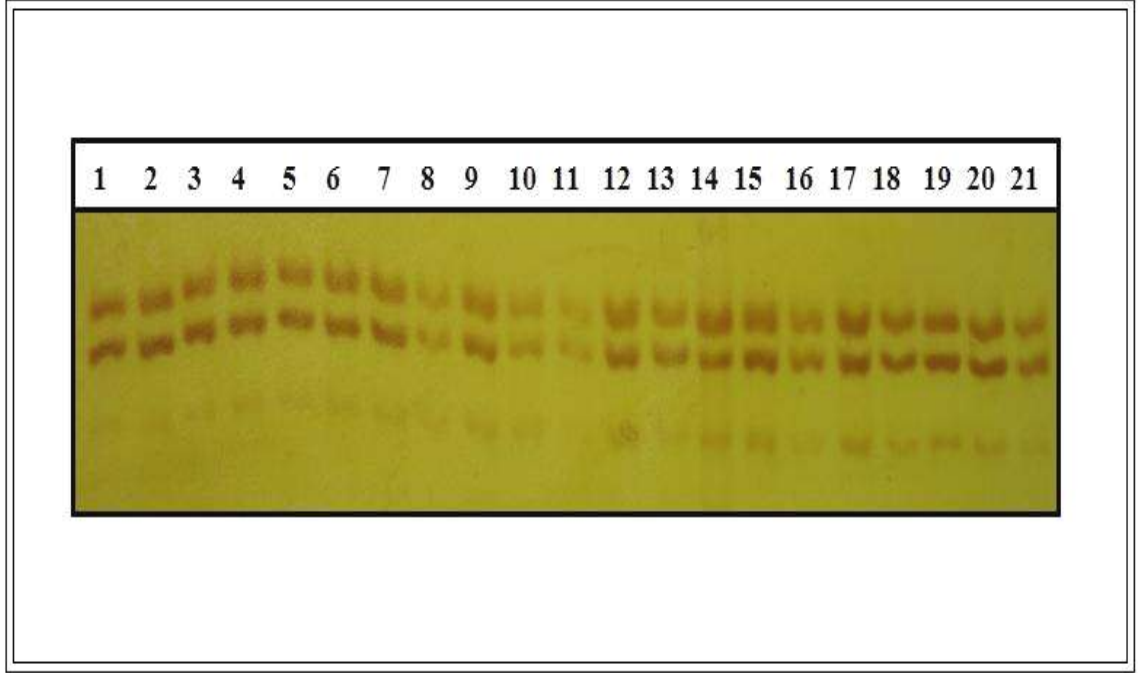
Şekil 4.37: Faktör VIII geni Ekson 14C bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



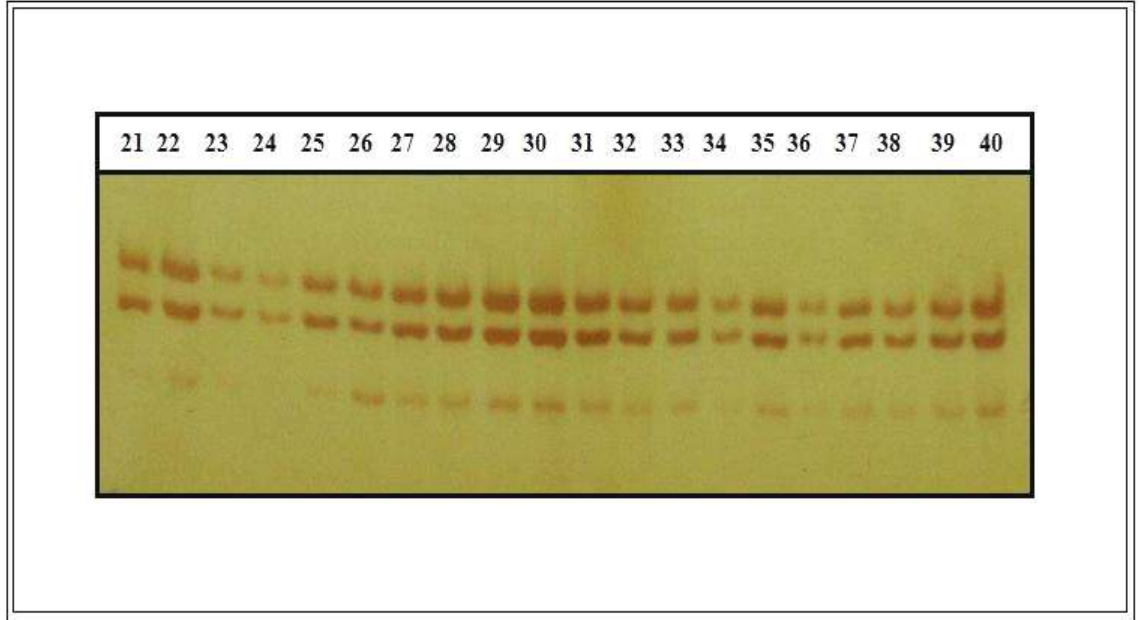
Şekil 4.38: Faktör VIII geni Ekson 14C bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



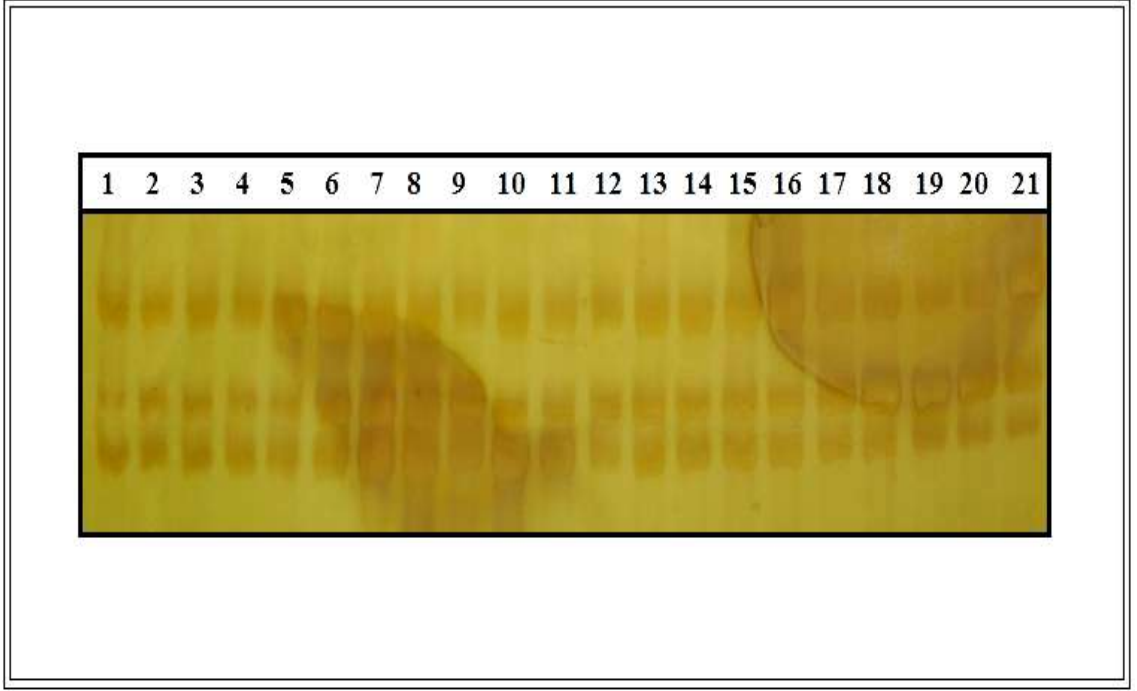
Şekil 4.39: Faktör VIII geni Ekson 14D bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



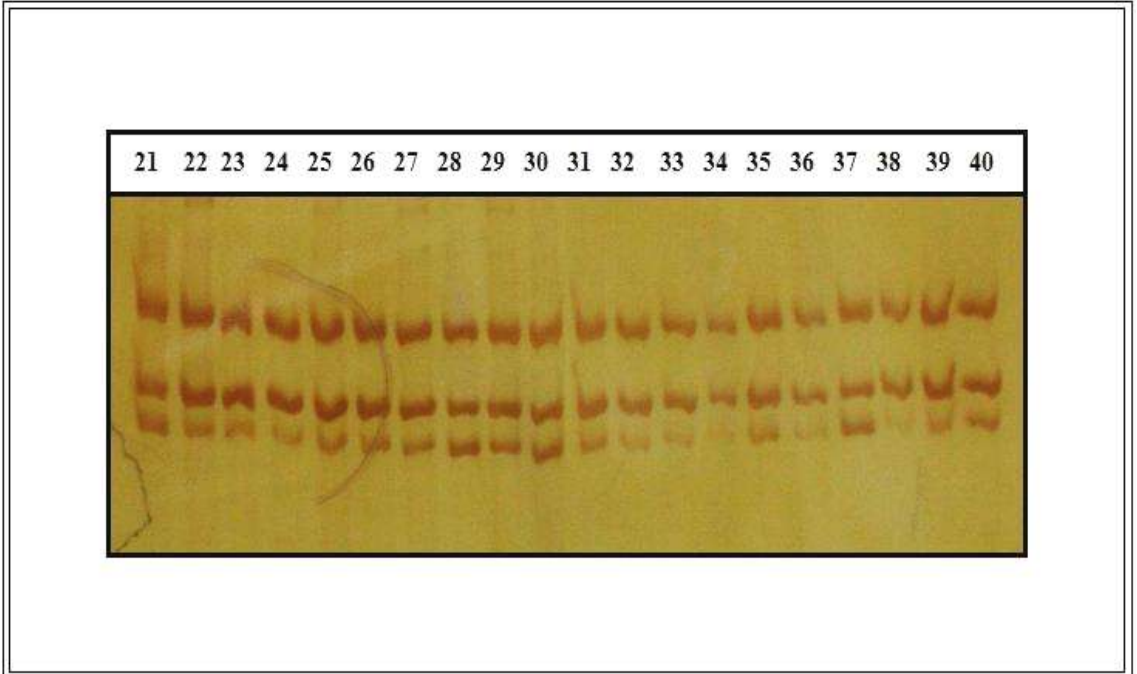
Şekil 4.40: Faktör VIII geni Ekson 14D bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



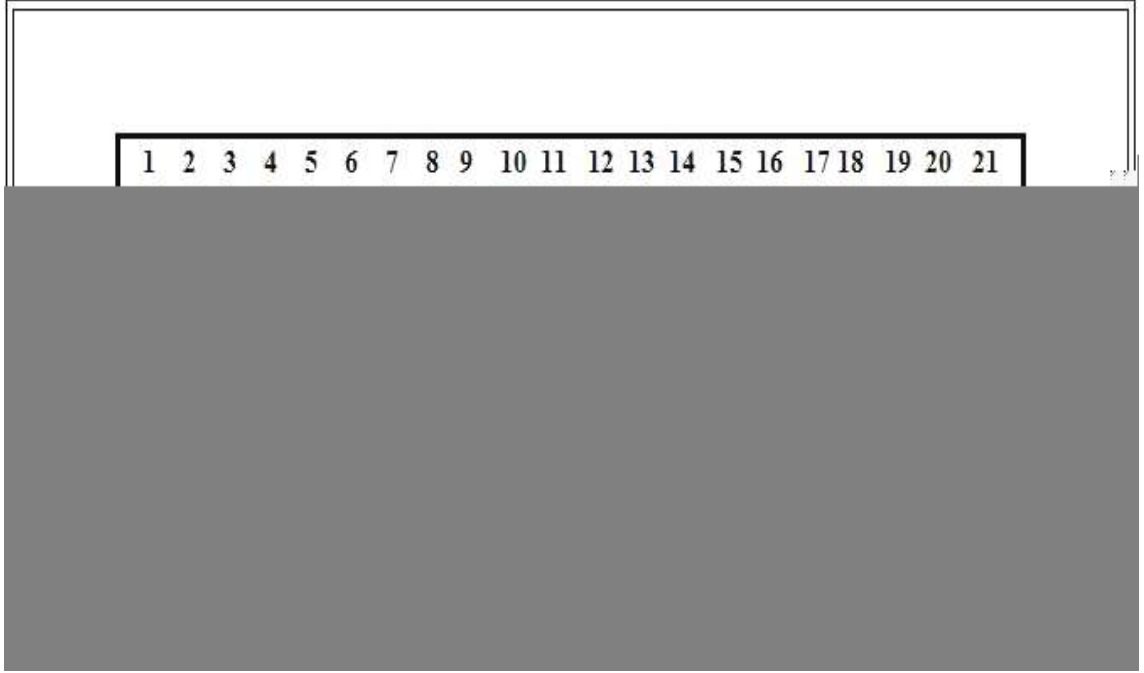
Şekil 4.41: Faktör VIII geni Ekson 14E bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.



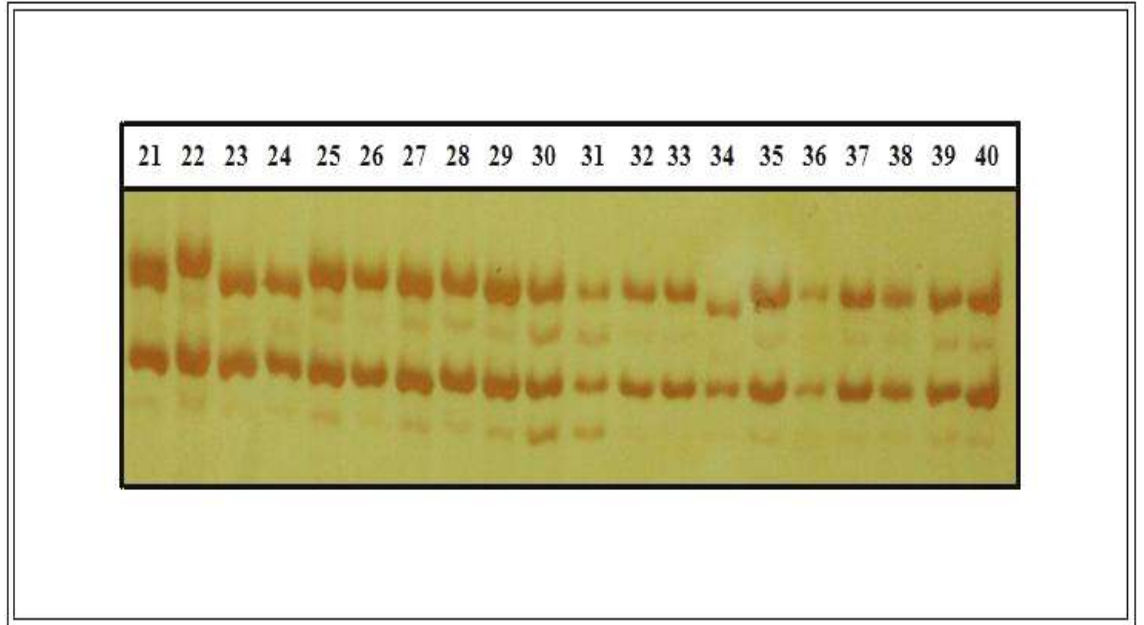
Şekil 4.42: Faktör VIII geni Ekson 14E bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.



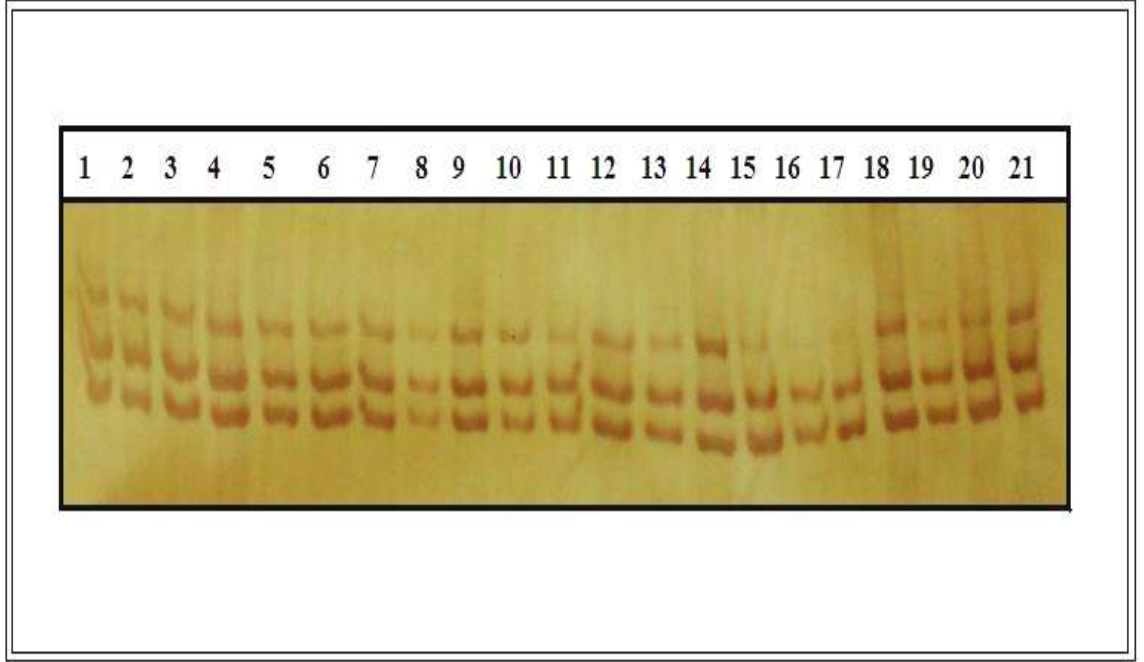
Şekil 4.43: Faktör VIII geni Ekson 14F bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi.
 9, 14, 15 ve 21: Numaralı bireyler aynı paterni göstermektedir.
 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20: Numaralı bireyler aynı paterni göstermektedir.



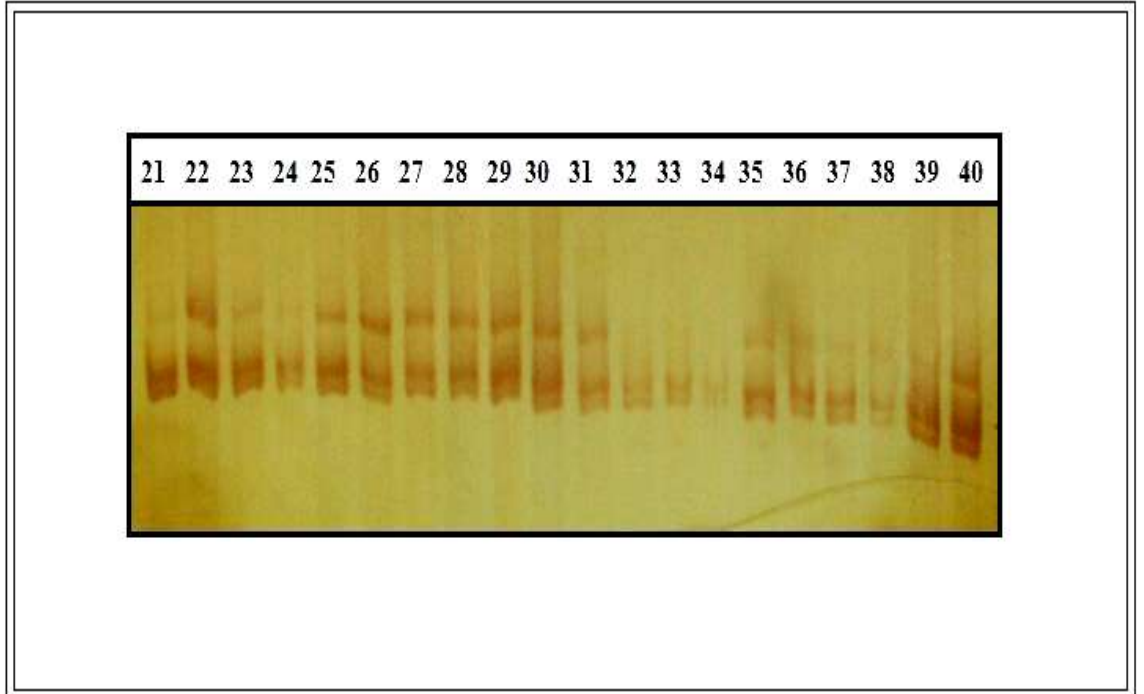
Şekil 4.44: Faktör VIII geni Ekson 14F bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.
 23, 24, 34: Numaralı bireyler aynı paterni göstermektedir.
 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40: Numaralı bireyler aynı paterni göstermektedir.
 21: Numaralı birey Şekil 4.43'te olduğu gibi yine aynı paterni göstermektedir.



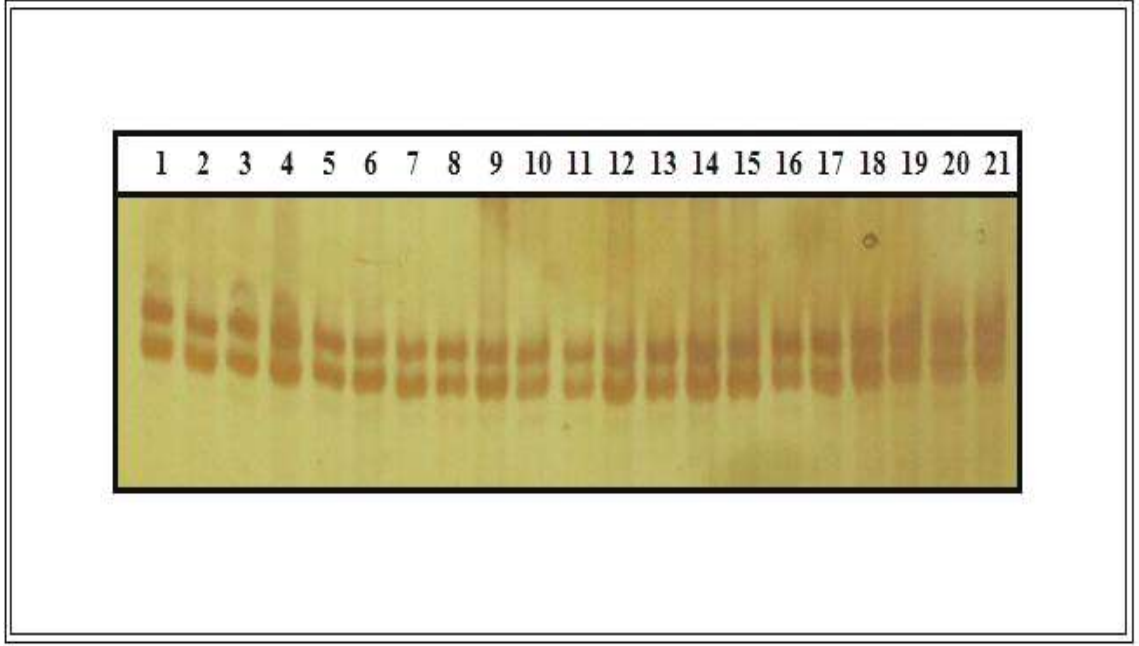
Şekil 4.45: Faktör VIII geni Ekson 14G bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



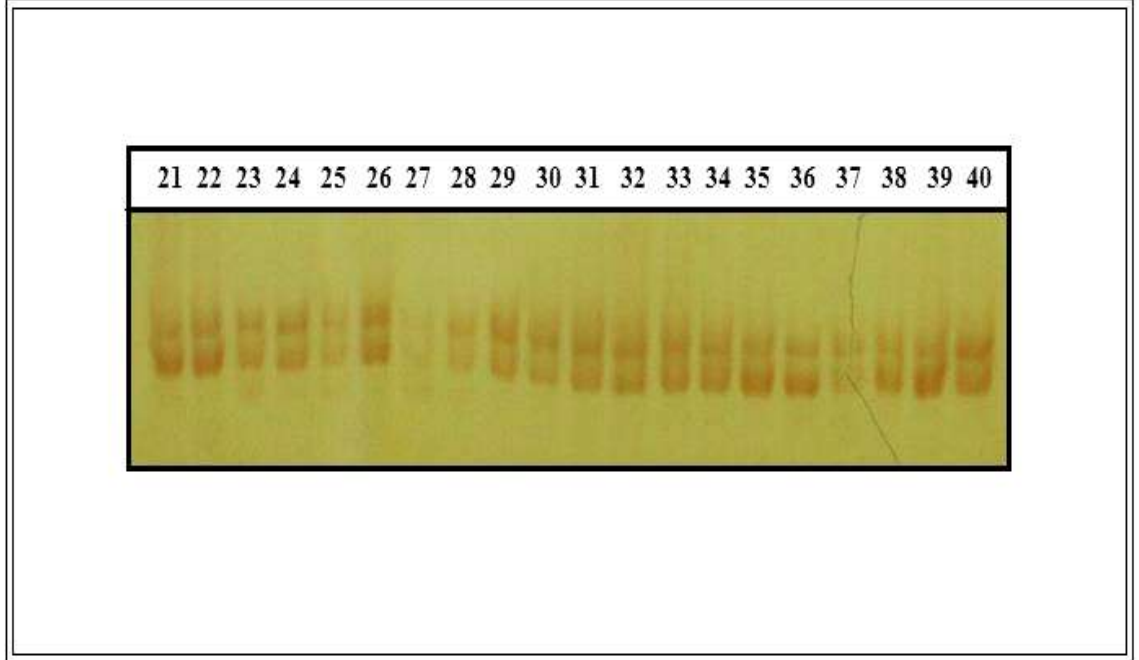
Şekil 4.46: Faktör VIII geni Ekson 14G bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



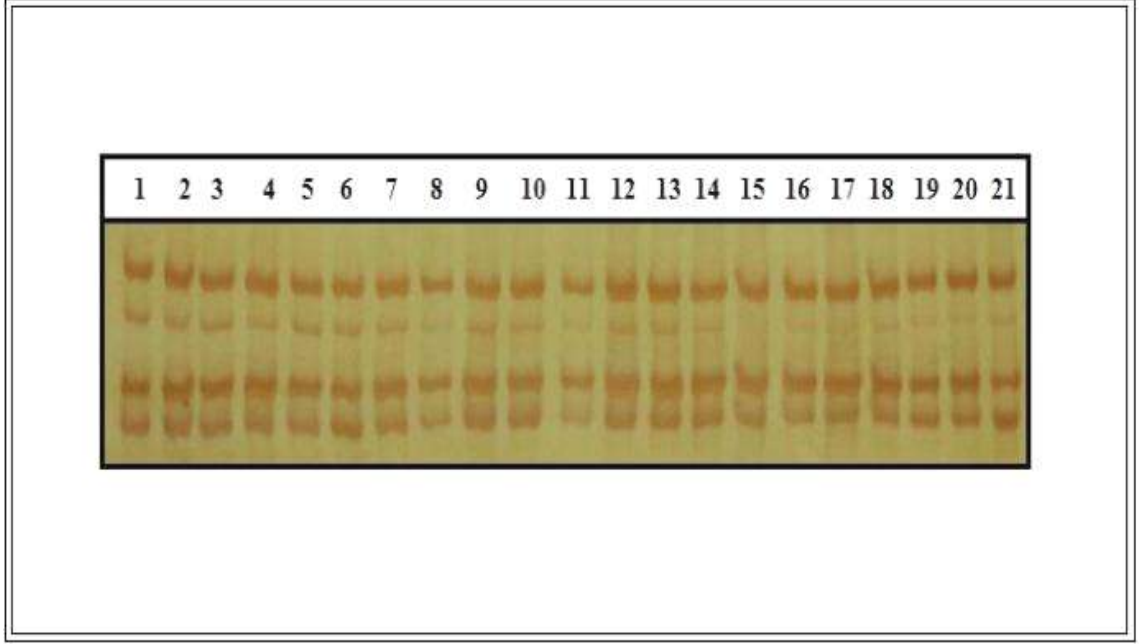
Şekil 4.47: Faktör VIII geni Ekson 14H bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



Şekil 4.48: Faktör VIII geni Ekson 14H bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri

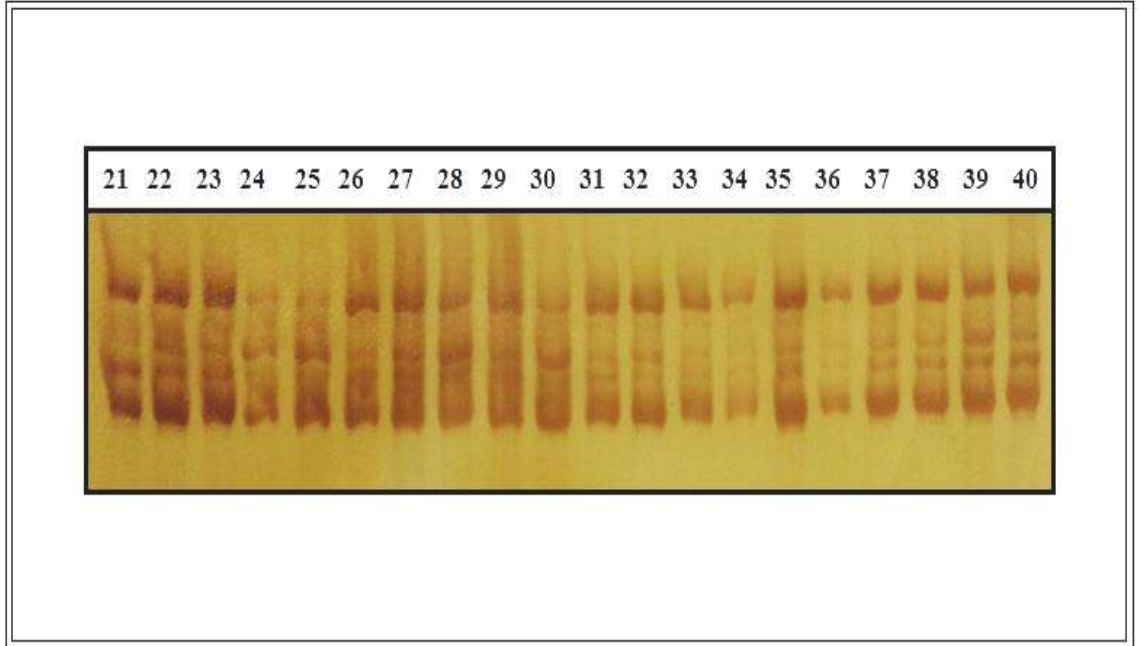


Şekil 4.49: Faktör VIII geni Ekson 14J bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

1-20: Venöz tromboz hastaları.

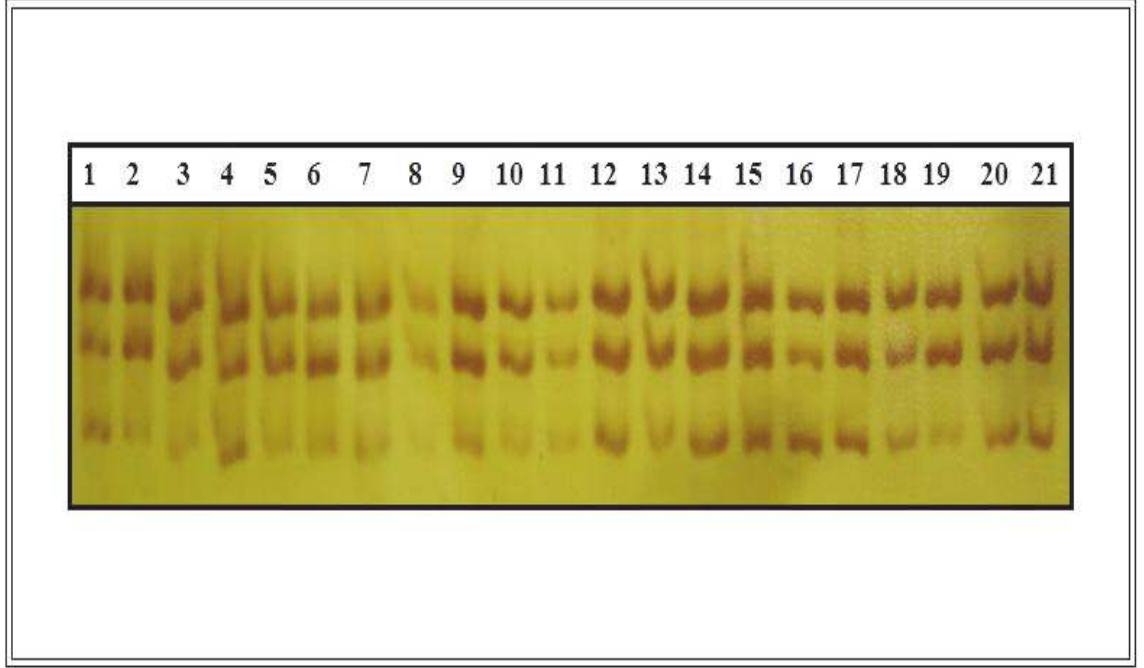
21: Sağlıklı kontrol bireyi.



Şekil 4.50: Faktör VIII geni Ekson 14J bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

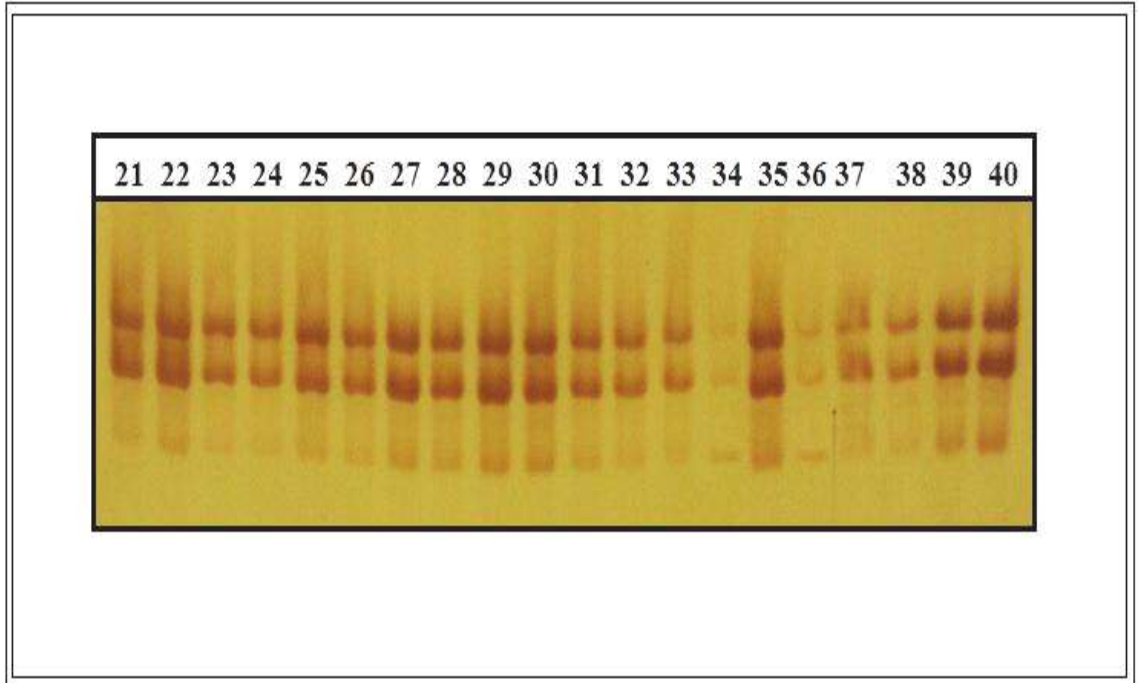
21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



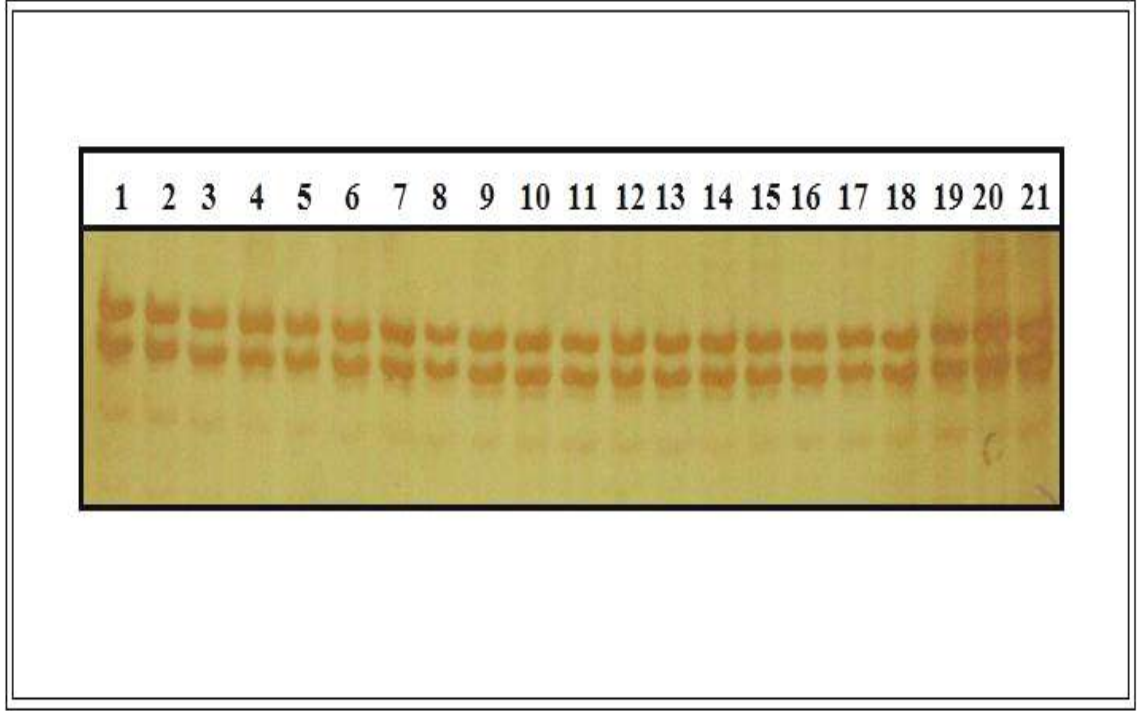
Şekil 4.51: Faktör VIII geni Ekson 14K bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



Şekil 4.52: Faktör VIII geni Ekson 14K bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri

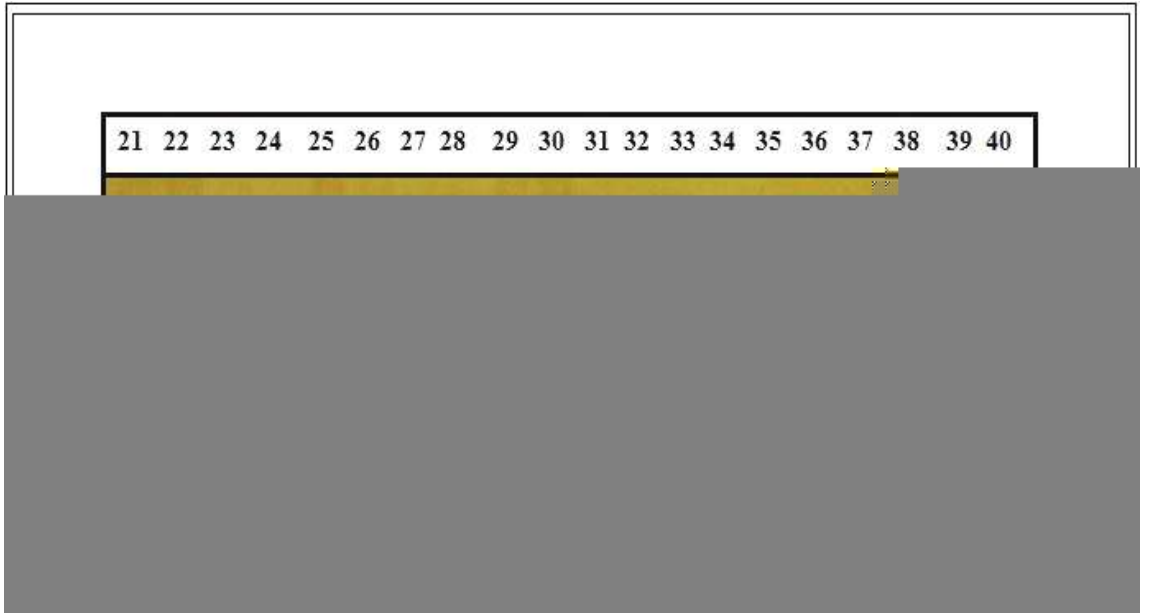


Şekil 4.53: Faktör VIII geni Ekson 15 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

1-20: Venöz tromboz hastaları.

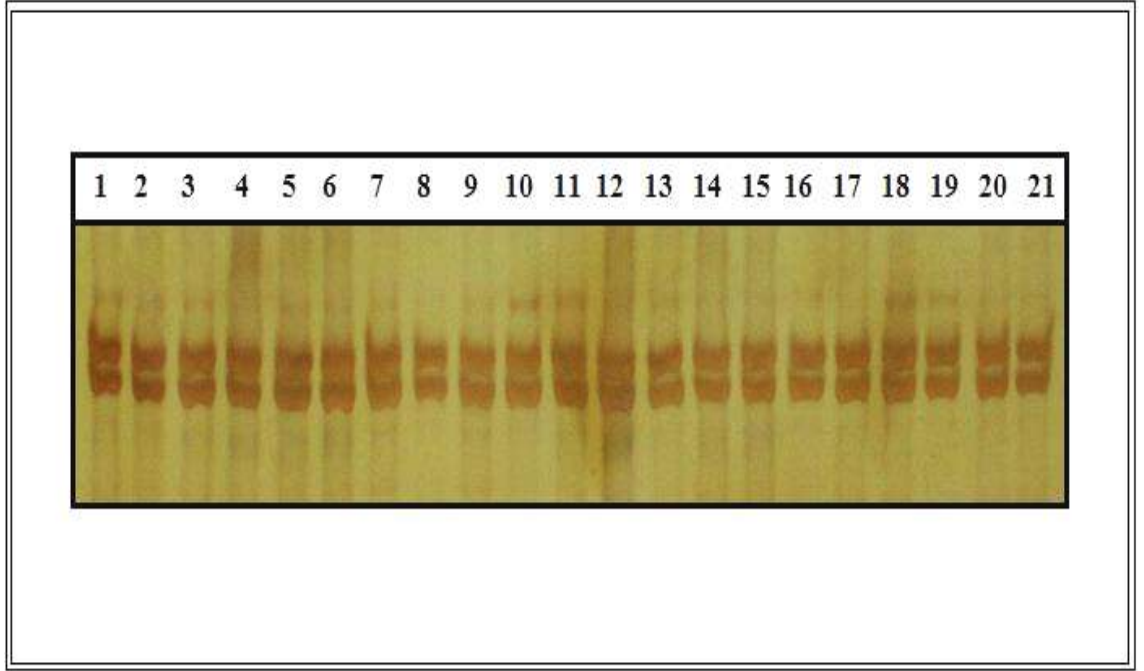
21: Sağlıklı kontrol bireyi



Şekil 4.54: Faktör VIII geni Ekson 15 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

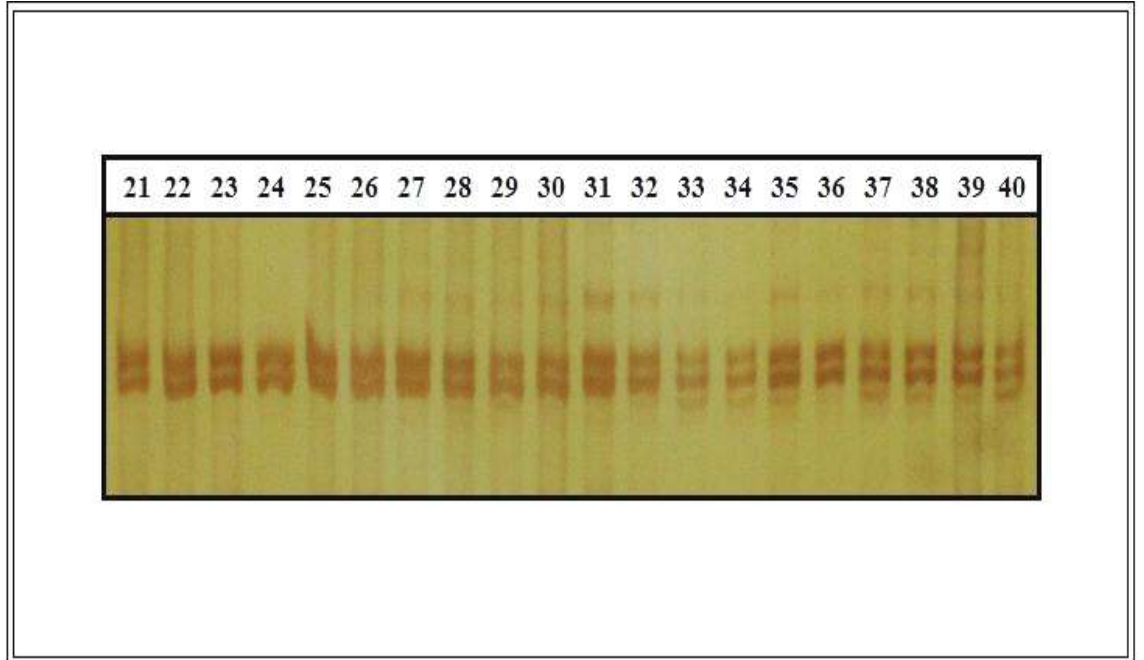
21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



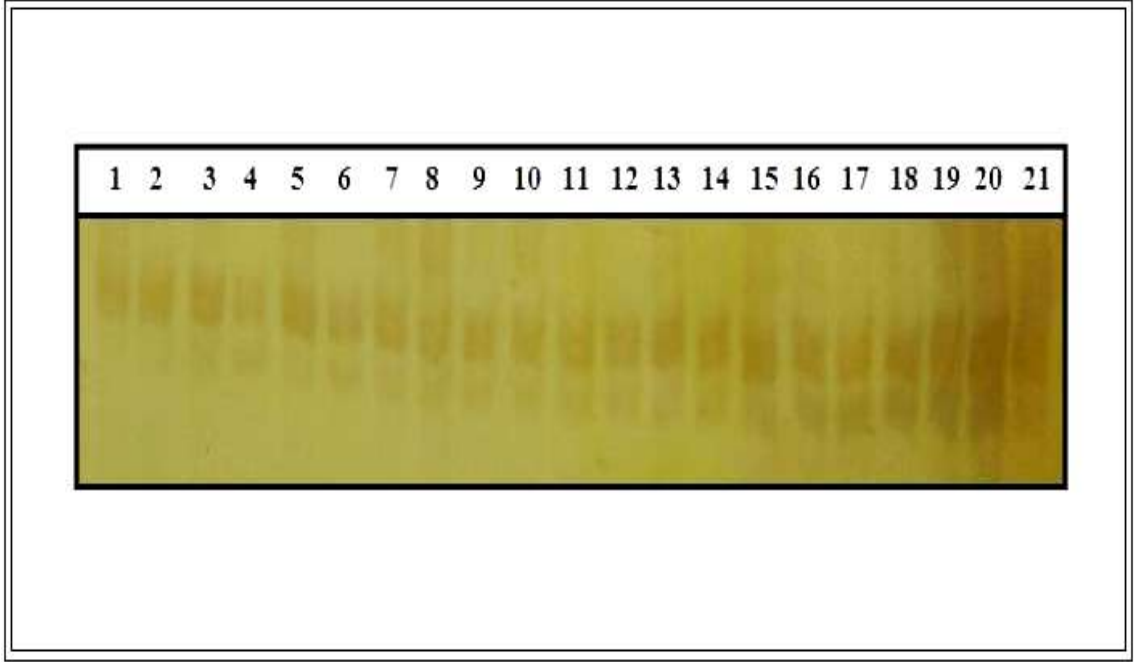
Şekil 4.55: Faktör VIII geni Ekson 16 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



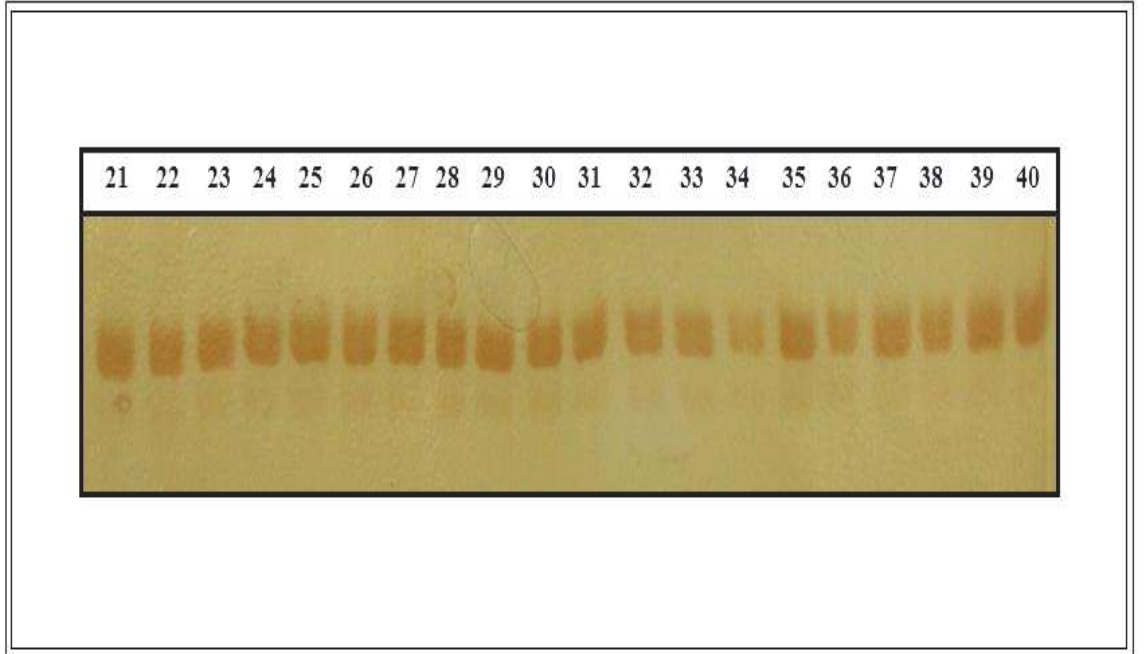
Şekil 4.56: Faktör VIII geni Ekson 16 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



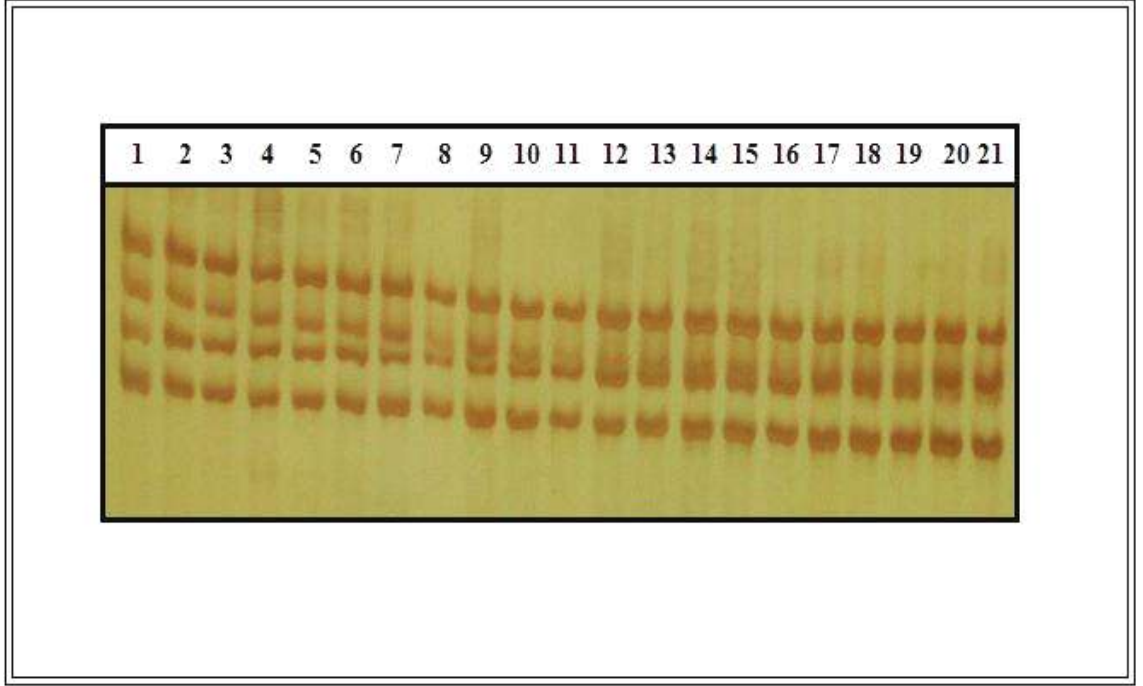
Şekil 4.57: Faktör VIII geni Ekson 17 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



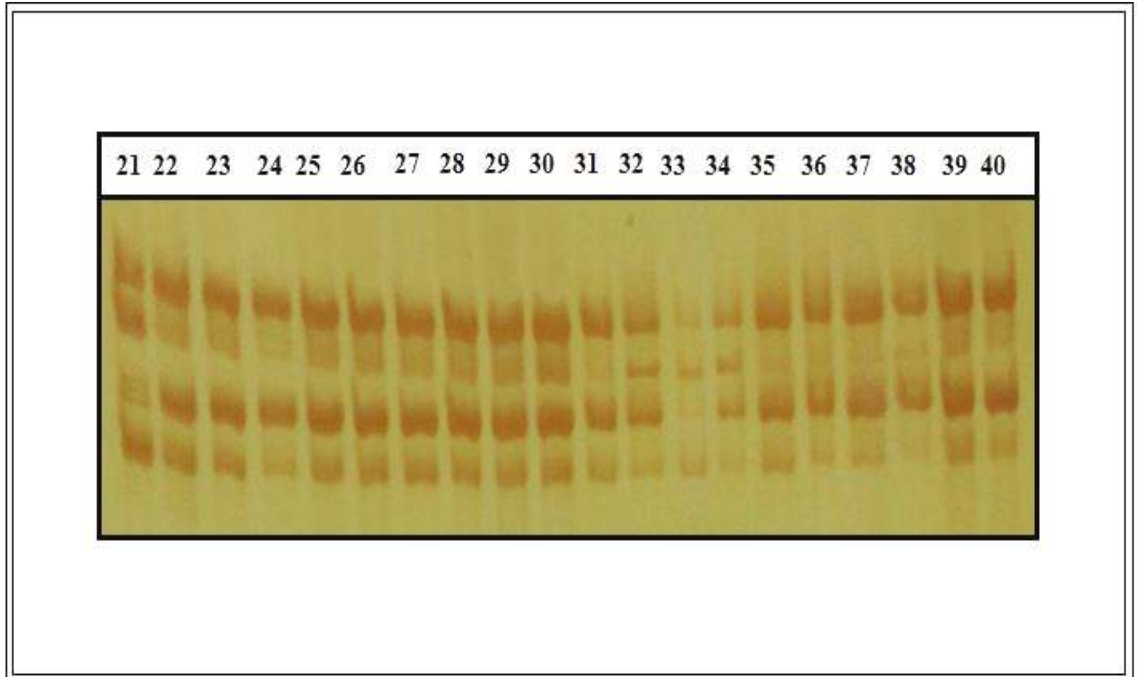
Şekil 4.58: Faktör VIII geni Ekson 17 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



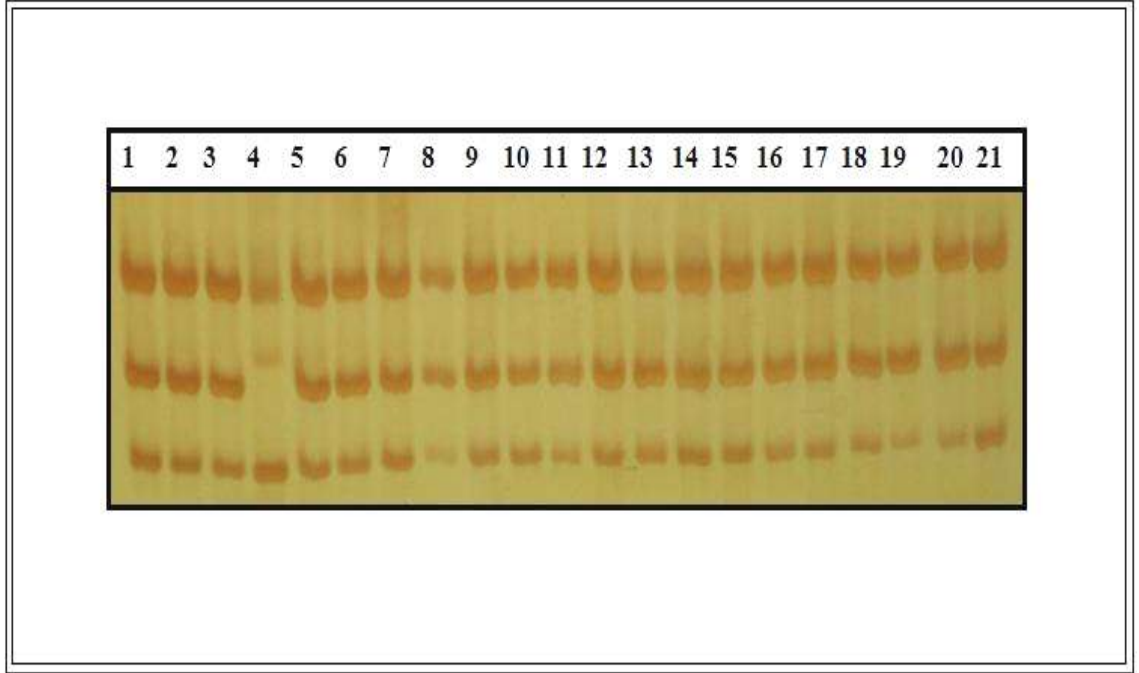
Şekil 4.59: Faktör VIII geni Ekson 18 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



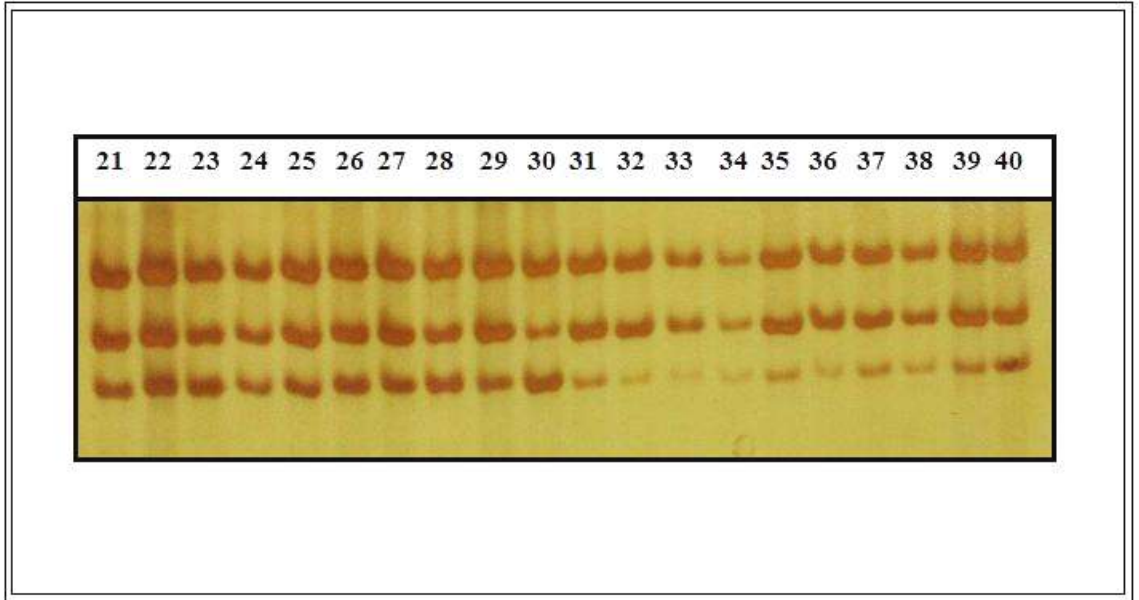
Şekil 4.60: Faktör VIII geni Ekson 18 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



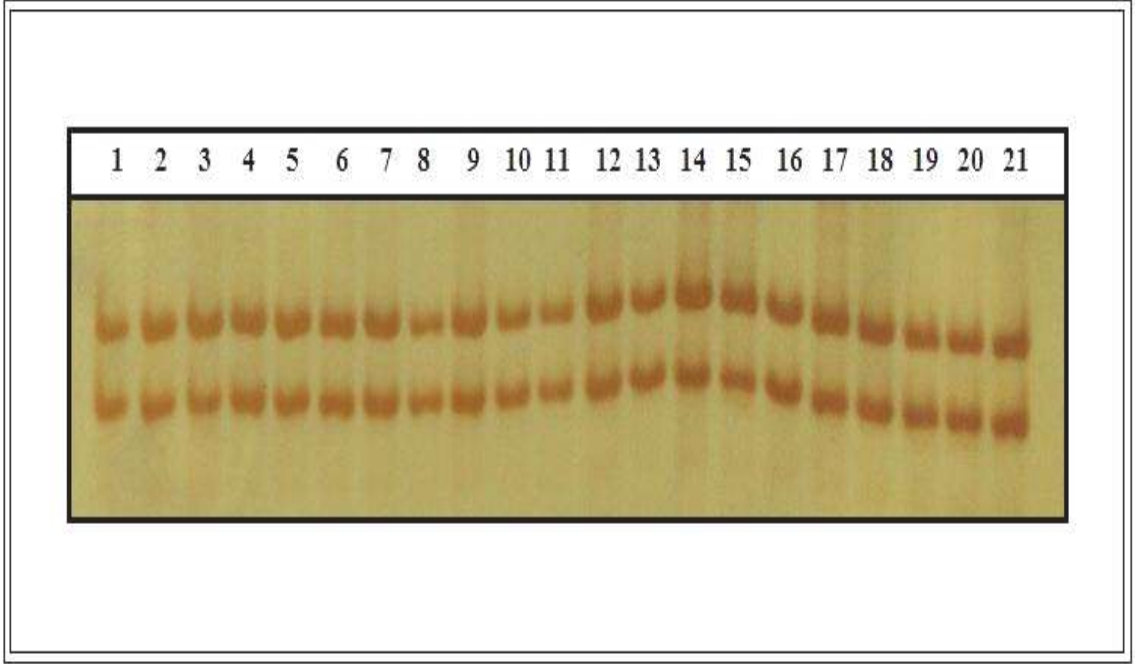
Şekil 4.61: Faktör VIII geni Ekson 19 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi
 4: Farklı patern gösteren venöz tromboz hastası.



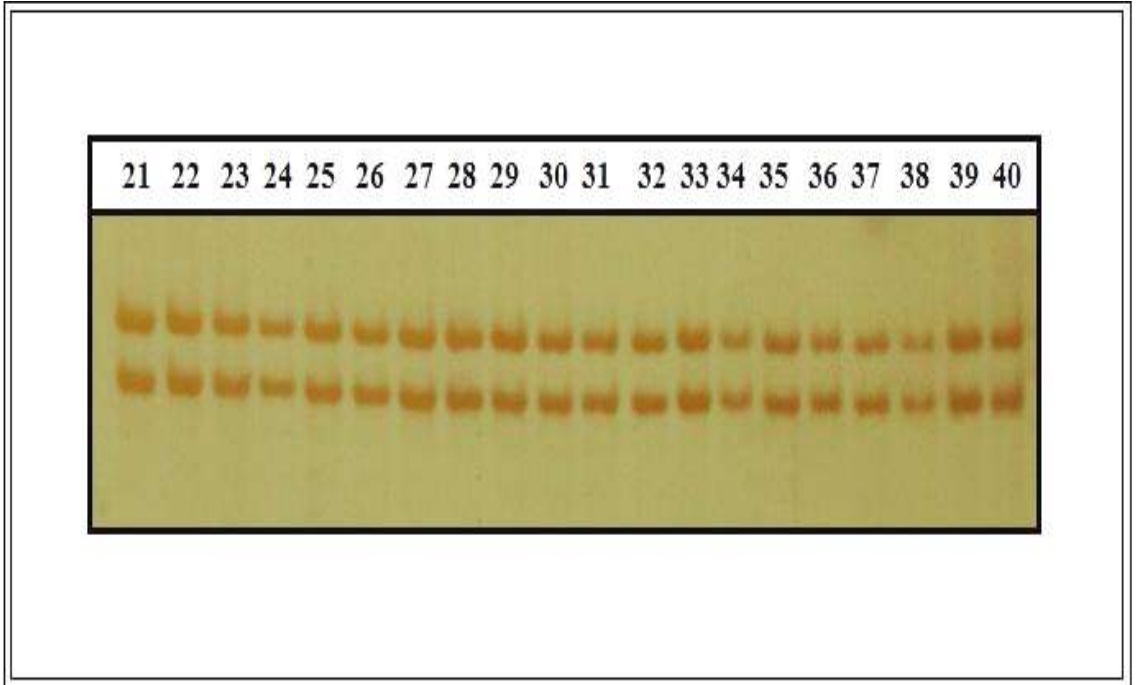
Şekil 4.62: Faktör VIII geni Ekson 19 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



Şekil 4.63: Faktör VIII geni Ekson 20 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



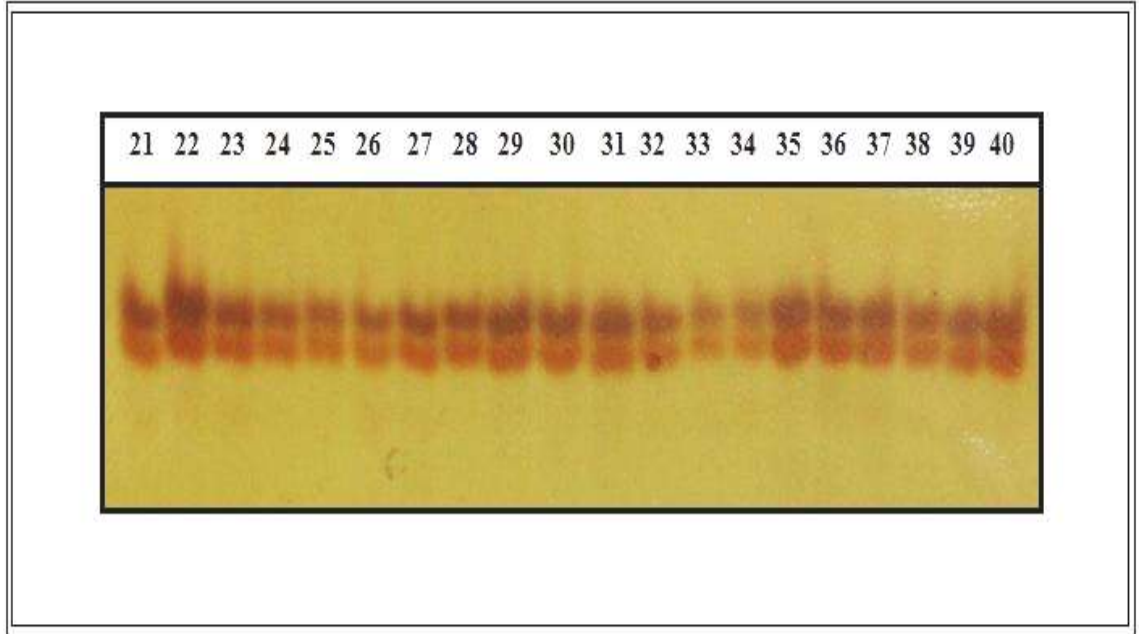
Şekil 4.64: Faktör VIII geni Ekson 20 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



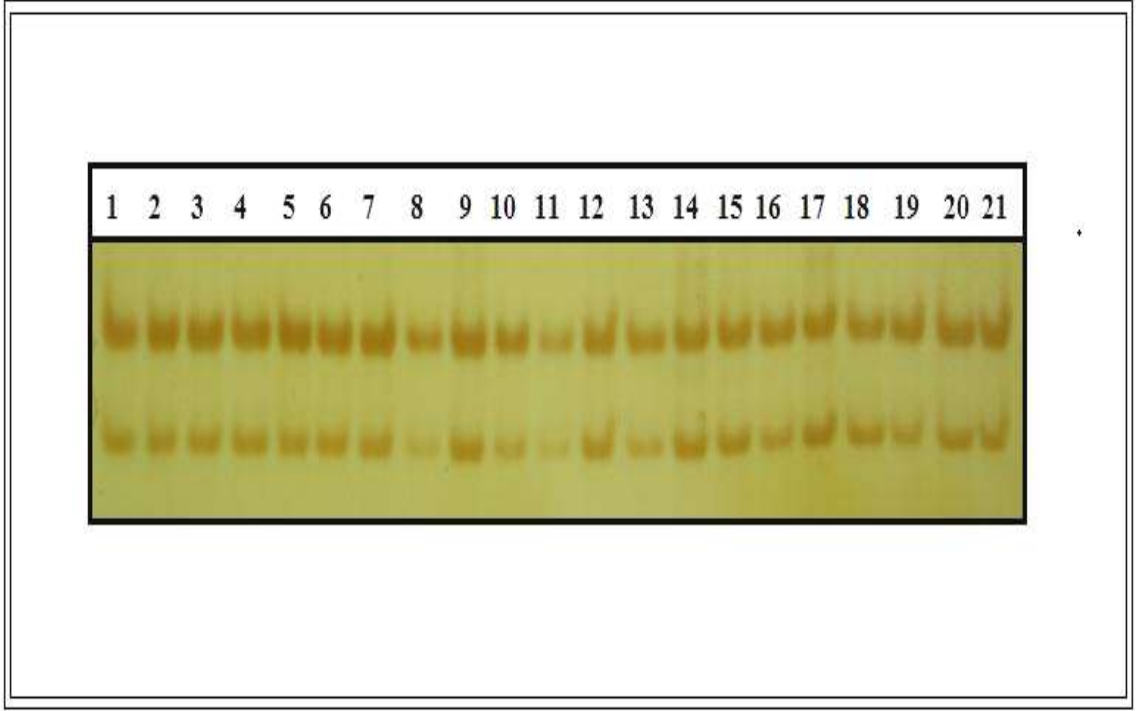
Şekil 4.65: Faktör VIII geni Ekson 21 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



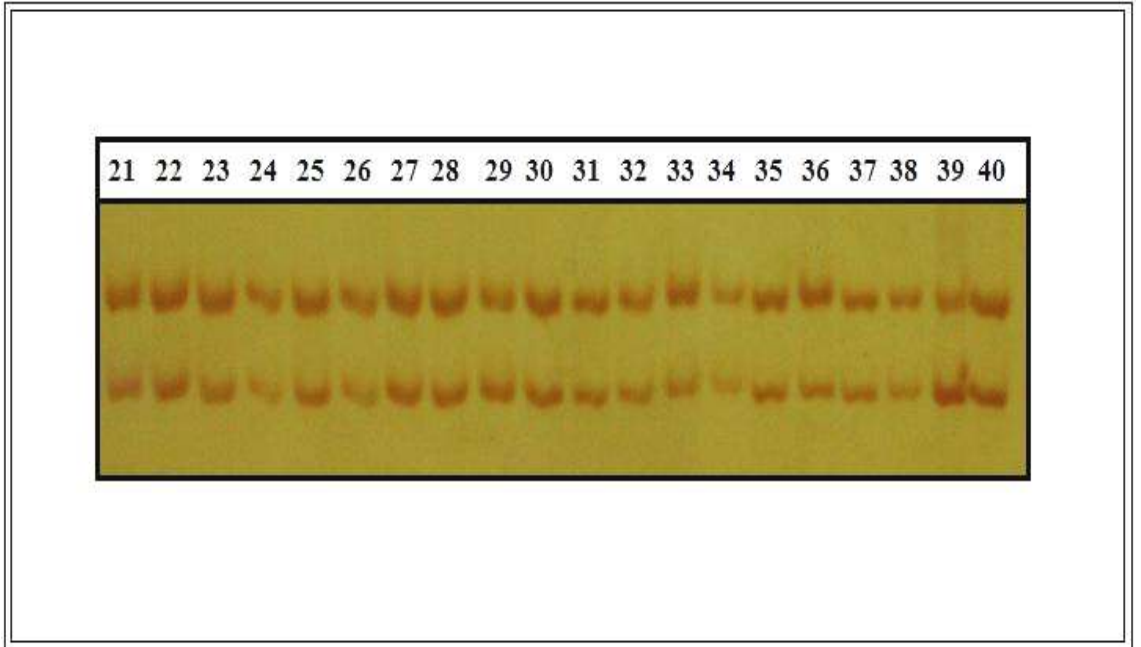
Şekil 4.66: Faktör VIII geni Ekson 21 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



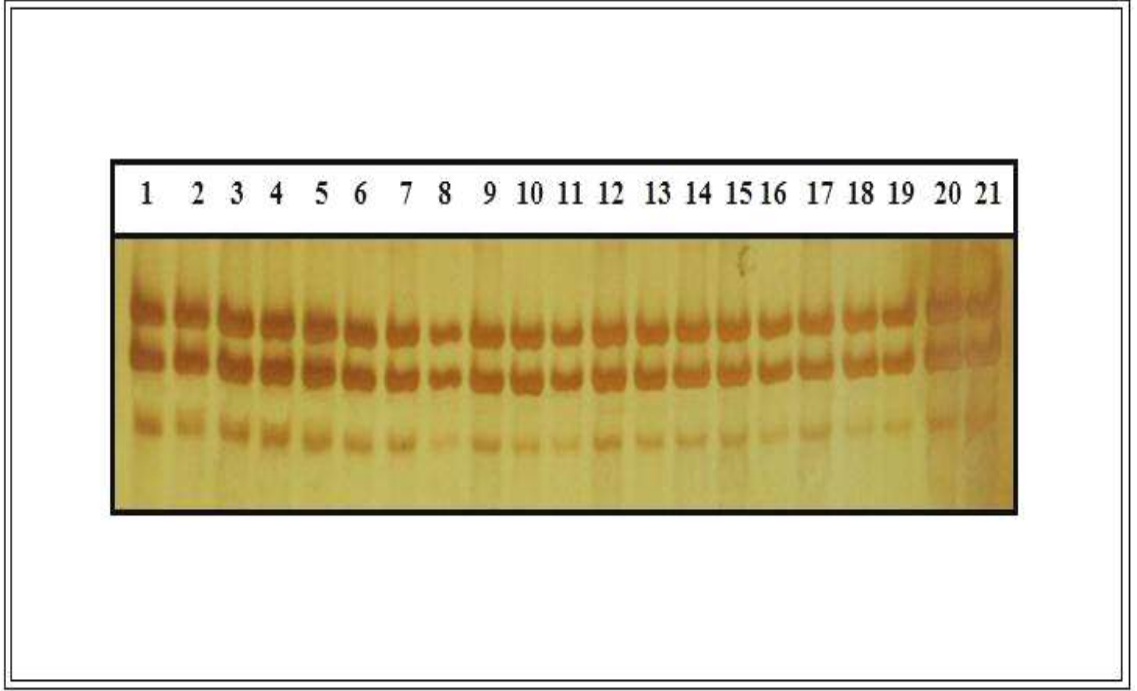
Şekil 4.67: Faktör VIII geni Ekson 22 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



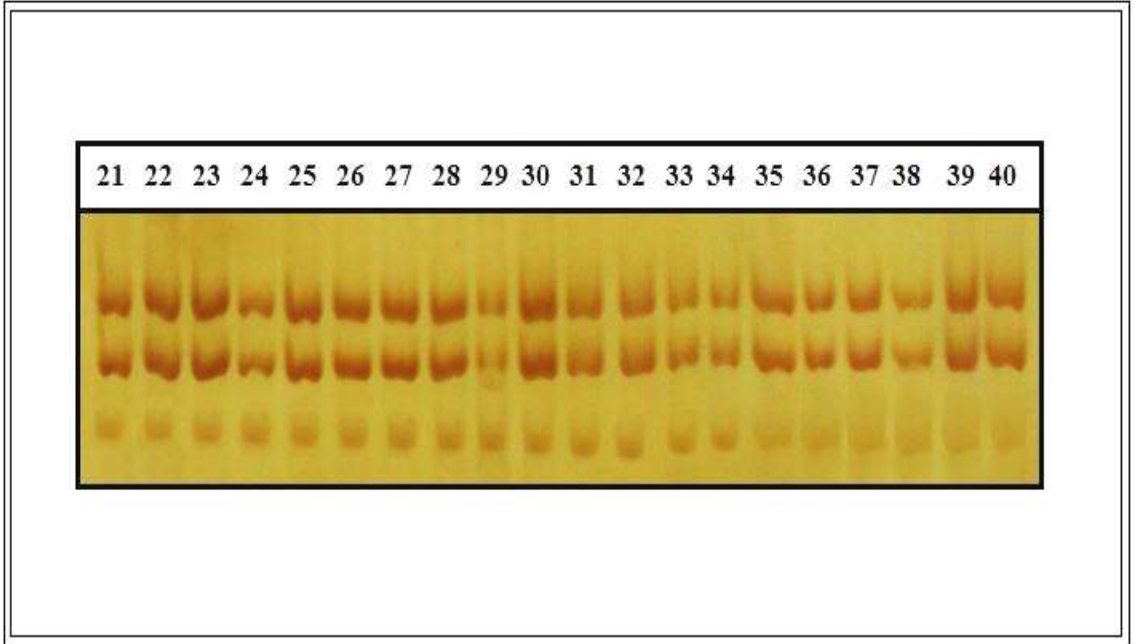
Şekil 4.68: Faktör VIII geni Ekson 22 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



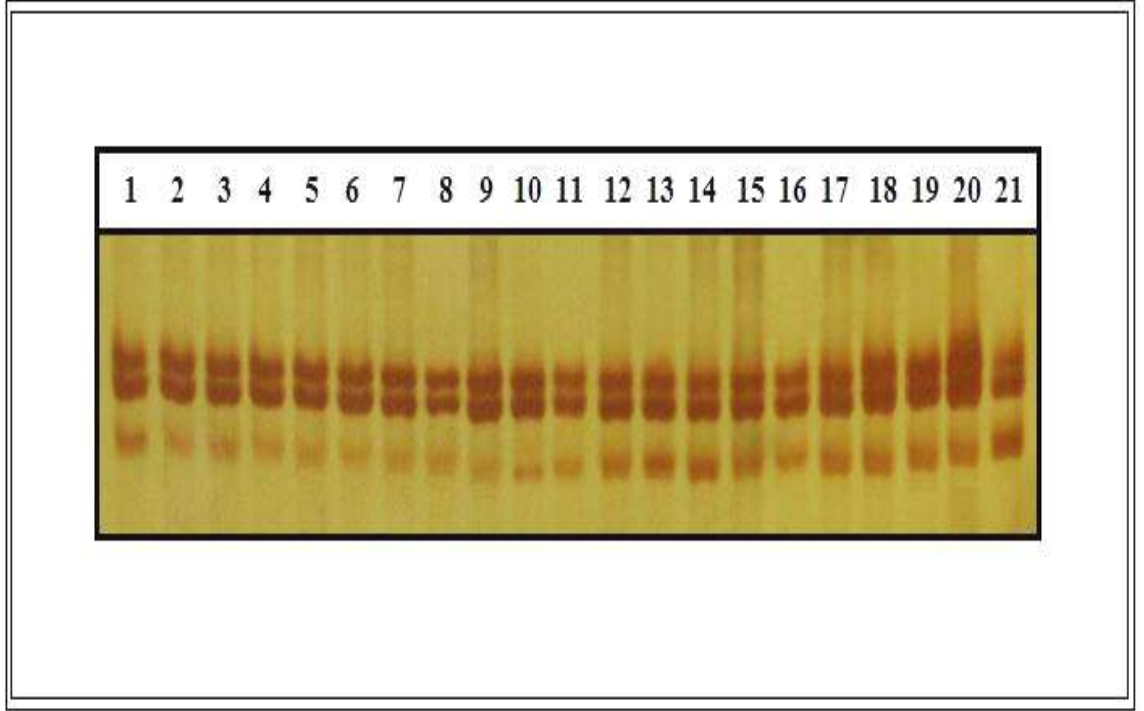
Şekil 4.69: Faktör VIII geni Ekson 23 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



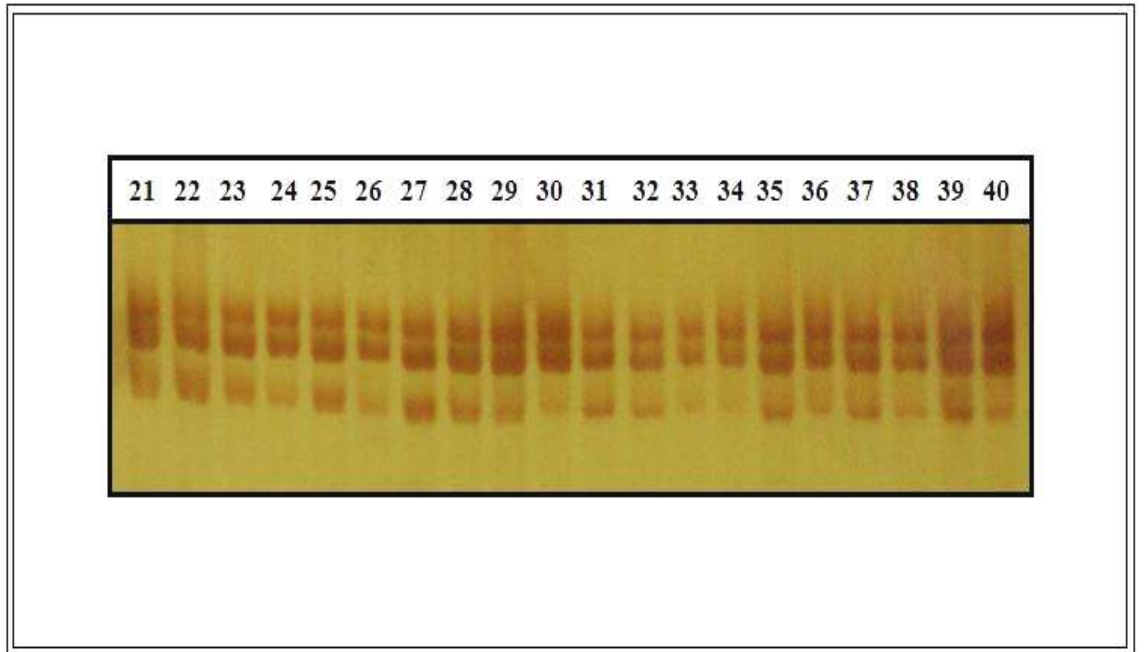
Şekil 4.70: Faktör VIII geni Ekson 23 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



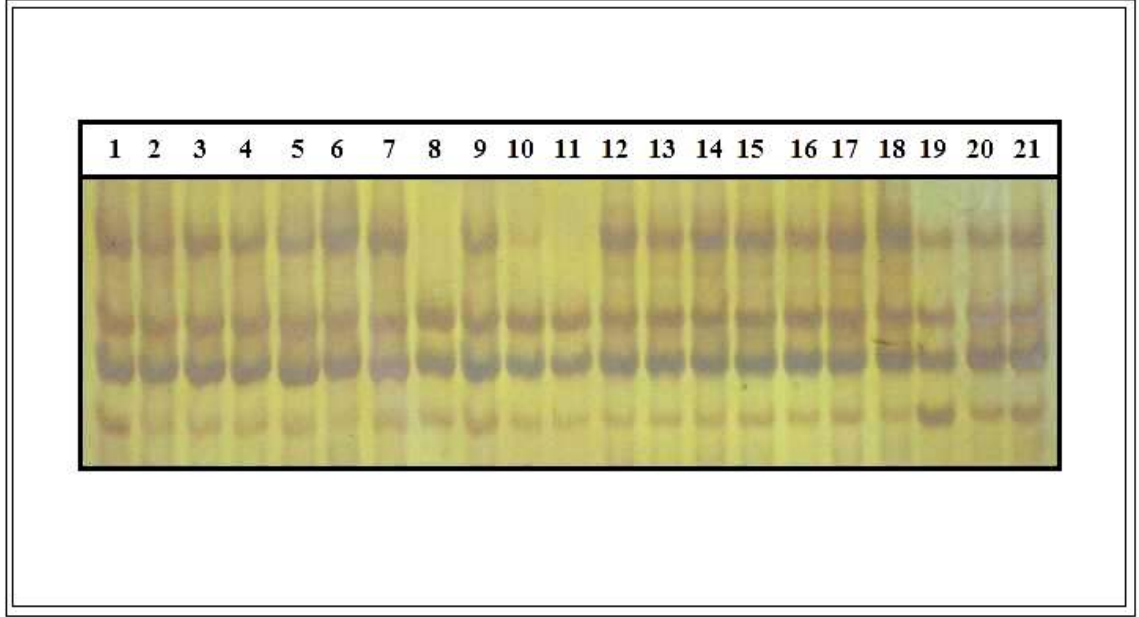
Şekil 4.71: Faktör VIII geni Ekson 24 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



Şekil 4.72: Faktör VIII geni Ekson 24 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri



Şekil 4.73: Faktör VIII geni Ekson 25 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

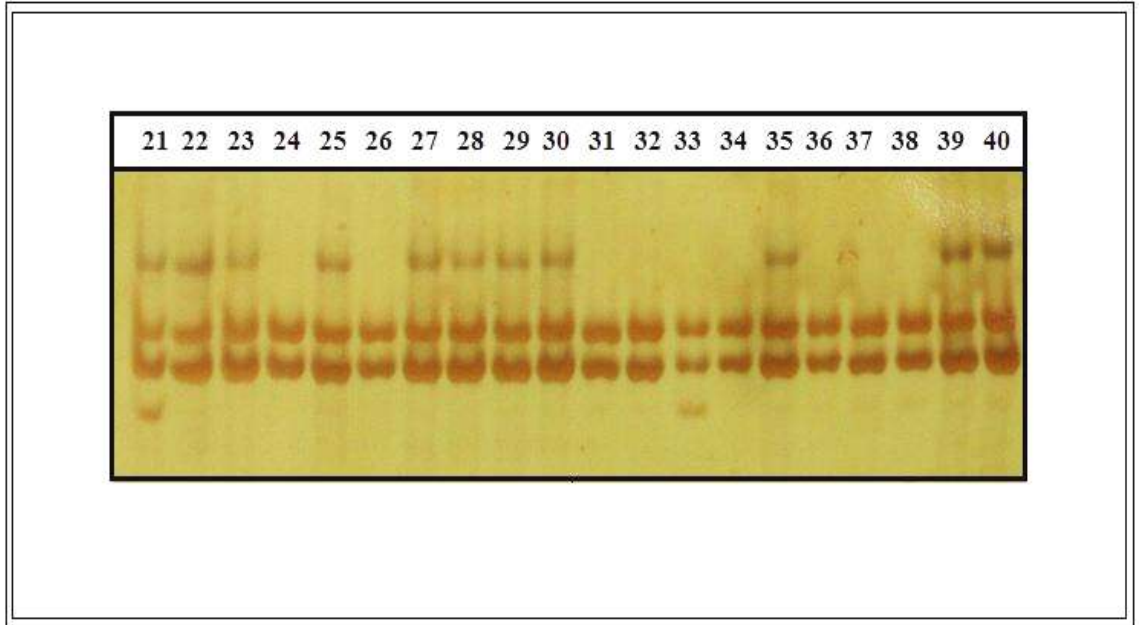
1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

1-20: Venöz tromboz hastaları.

21: Sağlıklı kontrol bireyi

8 10 ve 11: Numaralı bireyler aynı pateni göstermektedir.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ve 21: Numaralı bireyler aynı pateni göstermektedir.



Şekil 4.74: Faktör VIII geni Ekson 25 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

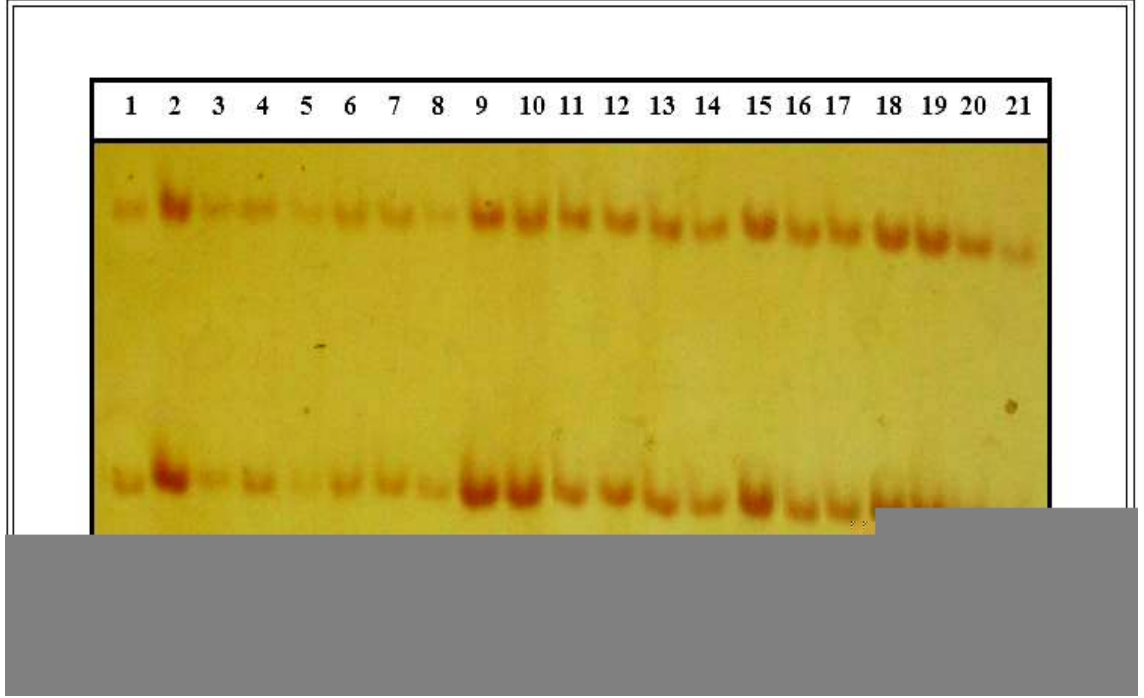
21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri.

22, 23, 25, 27, 28, 29, 30, 35, 39 ve 40: Numaralı bireyler aynı pateni göstermektedir.

24, 26, 31, 32, 34, 36, 37 ve 38: Numaralı bireyler aynı pateni göstermektedir.

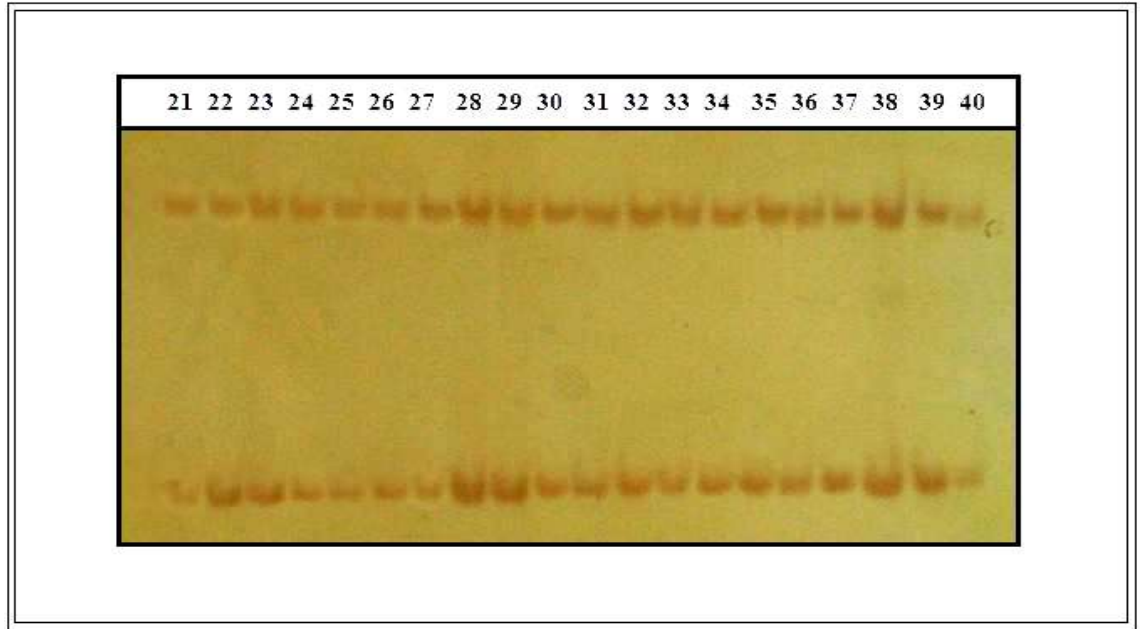
33: Numaralı birey Şekil 4.73'teki 8 ve 11 numaralı bireylerle aynı pateni göstermektedir.

21: Numaralı birey Şekil 4.73'te olduğu gibi yine aynı pateni göstermektedir.



Şekil 4.75: Faktör VIII geni Ekson 26 bölgesi venöz tromboz hastaları PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

1-21 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 1-20: Venöz tromboz hastaları.
 21: Sağlıklı kontrol bireyi



Şekil 4. 76: Faktör VIII geni Ekson 26 bölgesi sağlıklı kontrol bireyleri PCR ürünlerine ait SSCA jel görüntüsü.

21-40 numaraları PCR ürünlerinin yükleme yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
 21-40: Sağlıklı kontrol bireyleri

Yapılan SSCA jel incelemeleri sonucunda faktör VIII geninin 5 ekson bölgesinde birbirinden farklı patern gösteren bireyler gözlenmiştir. Farklı patern gözlemlenen bölgelerin Ekson 6, Ekson 13, Ekson14F, Ekson 19 ve Ekson 25 olduğu tespit edilmiştir.

Ekson 6 bölgesi için Şekil 4. 17 ve Şekil 4 18'deki jel görüntülerinde olduğu gibi iki farklı patern görülmektedir. Sağlıklı kontrol bireylerinin tümü ve venöz trombozlu hastaların 19'u aynı paterni göstermekte fakat venöz trombozlu hastalardan 8 numaralı birey farklı patern göstermektedir. Farklılık gösteren 8 numaralı birey ve diğer patern grubunu temsilen 7 numaralı bireyde bilinmeyen bir mutasyon ya da polimorfizm varlığının belirlenebilmesi için DNA dizi analizine gönderilmiştir.

Ekson 13 bölgesi için Şekil 4. 31 ve Şekilde 4. 32'deki jel görüntülerinde olduğu gibi 2 farklı patern görülmektedir. Sağlıklı kontrol bireylerinin tümü ve venöz trombozlu hastanın 19'u aynı paterni göstermekte fakat venöz trombozlu hastalardan 8 numaralı birey farklı patern göstermektedir. Farklılık gösteren 8 numaralı birey ve diğer patern grubunu temsilen 7 numaralı bireyde bilinmeyen bir mutasyon ya da polimorfizm varlığının belirlenebilmesi için DNA dizi analizine gönderilmiştir.

Ekson 14F bölgesi için Şekil 4. 43 ve Şekil 4. 44'teki jel görüntülerinde olduğu gibi 3 farklı patern görülmektedir. I. patern grubunda venöz trombozlu hastalardan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19 ve 20 ile sağlıklı kontrol grubundan 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39 ve 40 numaralı bireyler bulunmaktadır. II patern grubunda venöz trombolu hastalardan 9, 14 ve 15 ile sağlıklı kontrol grubundan 21 numaralı bireyler bulunmaktadır. III. Patern grubunda ise sağlıklı onترول grubundan 23, 24 ve 34 numaralı bireyler bulunmaktadır. I. patern grubunu temsilen 13, II. patern grubunu temsilen 14 ve III. patern grubunu temsilen 24 numaralı bireyde bilinmeyen bir mutasyon ya da polimorfizmin varlığının belirlenebilmesi için DNA dizi analizine gönderilmiştir.

Ekson 19 bölgesi için Şekil 4. 61 ve Şekil 4. 62'deki jel görüntülerinde olduğu gibi 2 farklı patern görülmektedir. Sağlıklı kontrol bireylerinin tümü ve venöz trombozlu hastanın 19'u aynı paterni göstermekte fakat venöz trombozlu hastalardan 4 numaralı

birey farklı patern göstermektedir. Farklılık gösteren 4 numaralı birey ve diğer patern grubunu temsilen 5 numaralı bireyde bilinmeyen bir mutasyon ya da polimorfizmin varlığının belirlenebilmesi için DNA dizi analizine gönderilmiştir.

Ekson 25 bölgesi için Şekil 4. 73 ve Şekil 4. 74'teki jel görüntülerinde olduğu gibi 4 farklı patern görülmektedir. I. patern grubunda venöz trombozlu hastalardan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ve sağlıklı kontrol grubundan 21 numaralı bireyler bulunmaktadır. II. patern grubunda sağlıklı kontrol burundan 22, 23, 25, 27, 28, 29, 30, 35, 39 ve 40 numaralı bireyler bulunmaktadır. III. patern grubunda sağlıklı kontrol grubundan 24, 26, 31, 32, 34, 36, 37 ve 38 numaralı bireyler bulunmaktadır. IV. Patern grubunda venöz tromboz hastalarından 8 ve 11 numaralı birey ile sağlıklı kontrol grubundan 33 numaralı birey bulunmaktadır. I. patern grubunu temsilen 9, II. patern grubunu temsilen 39, III. patern grubunu temsilen 38 ve IV. Patern grubunu temsilen 8 numaralı bireyde bilinmeyen bir mutasyon ya da polimorfizmin varlığının belirlenebilmesi için DNA dizi analizine gönderilmiştir.

4.2.6.2. DNA Dizi Analizi Bulguları

Faktör VIII geninin promotor bölgesi ve 26 ekson bölgesinde yapılan SSCA çalışmaları sonucunda; bu gen bölgelerinin tümünün SSCA patern modelleri belirlenmiştir. Bu patern modellerinden değişiklik görülen 5 ekson bölgesine ait 13 bireyin PCR örnekleri tespit edilmiştir. Bu PCR örneklerinde, bilinmeyen bir mutasyon ya da polimorfizmin varlığının belirlenebilmesi için PCR ürünlerinin ait olduğu birey DNA'ları tespit edildi. İncelenecek DNA'ların Malzeme ve Yöntem Bölümünde verilen ilgili eksonun PCR koşullarına ve PCR programına uygun olarak tekrar PCR'ları yapıldı. Daha sonra elde edilen PCR'lar agaroz jelde incelendi ve yoğun bantlar görüldükten sonra Malzeme ve Yöntem Bölümünde verilen PCR Saflaştırma Yöntemine göre saflaştırılarak İONTEK firmasına DNA dizi analizi için gönderildi.

Faktör VIII geninin farklı patern görülen 5 ekson bölgesine ait yapılan DNA dizi analizi sonuçları mutasyon veya polimorfizm bakımından incelendi. Bu amaçla ENSEMBL Genom Browser (*online*) internet sitesinde yer alan insan genomu faktör VIII genine ait nükleotid dizi bilgilerini içeren veri bankası ile DNA dizi analiz sonuçları NCBI (*National Center for Biotechnology Informaton*) (*online*) internet sitesindeki Blast 2

Sequences programı kullanılarak karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmaların sonuçlarına göre, ekson 6 bölgesi, ekson 13 bölgesi ve ekson 19 bölgesi SSCA çalışmasında farklılık tespit edilen örneklerde herhangi bir mutasyon ya da varyasyon tespit edilememiştir. Ekson 14F ve ekson 25 bölgelerinde yapılan karşılaştırmalarda belli patern gösteren bireylerde farklılıklar tespit edilmiştir.

Ekson 6 bölgesinde yapılan karşılaştırma incelemeleri sonuçlarına göre, SSCA çalışmasında farklı patern gösteren venöz trombozlu hastalardan 8 numaralı bireyin DNA dizi bilgisi Şekil 4.77'de verilen ekson 6 bölgesi dizi bilgisi ile %100 tutarlılık içinde olduğu görülmüştür. Şekil 4.78'de blast analizi sonucu görülmektedir. Diğer venöz trombozlu hastalar ve sağlıklı kontrol grubu bireylerin paternini temsilen DNA dizi analizine gönderilen 7 numaralı bireyin de, DNA dizisinin ekson 6 bölgesi dizi bilgisi ile %100 tutarlılık içinde olduğu görülmüştür.

```
5'...GGAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGATG
CTGCATCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAATGCACACAGTCAATGGTTATGTAAACAG
GTCTCTGCCAG...3'
```

Şekil 4.77: Faktör VIII geni Ekson 6 bölgesi dizisi.

```

Score = 225 bits (117), Expect = 3e-56
Identities = 117/117 (100%), Gaps = 0/117 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   GGAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAGAAGTCCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTG 60
          |||
Sbjct 210 GGAAAAGTTGGCACTCAGAAACAAGAAGTCCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCATCTG 269

Query 61   CTCGGGCCTGGCCTAAAATGCACACAGTCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAG 117
          |||
Sbjct 270 CTCGGGCCTGGCCTAAAATGCACACAGTCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAG 326

CPU time:   0.04 user secs.      0.05 sys. secs      0.09 total secs.

```

Şekil 4.78: Ekson 6 bölgesi 8 numaralı bireye ait blast sonucu.

Ekson 13 bölgesinde yapılan incelemelerin sonuçlarına göre, SSCA çalışmasında farklı patern gösteren venöz trombozlu hastalardan 8 numaralı bireyin DNA dizi bilgisi Şekil 4.79'da verilen ekson 13 bölgesi dizi bilgisi ile %100 tutarlılık içinde olduğu görülmüştür. Şekil 4.80'de blast analizi sonucu görülmektedir. Diğer venöz trombozlu hastalar ve sağlıklı kontrol grubu bireylerin paternini temsilen DNA dizi analizine gönderilen 7 numaralı bireyin de; DNA dizisinin, ekson 13 bölgesi dizi bilgisi ile %100 tutarlılık içinde olduğu görülmüştür.

```

5'...GCATCAATGGCTATGTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGTTTGTTCATGAGGTGGC
ATACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGAT
ATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCTATTCCCATTCTCAGGAG
AAACTGTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAG...3'

```

Şekil 4.79: Faktör VIII geni Ekson13 bölgesi dizisi.

```

Score = 404 bits (210), Expect = 8e-110
Identities = 210/210 (100%), Gaps = 0/210 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 GCATCAATGGCTATGTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGTTTGTTCATGAGGTGGCAT 60
|||||
Sbjct 121 GCATCAATGGCTATGTTTTGATAGTTTGCAGTTGTCAGTTTGTTCATGAGGTGGCAT 180

Query 61 ACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGAT 120
|||||
Sbjct 181 ACTGGTACATTCTAAGCATTGGAGCACAGACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGAT 240

Query 121 ATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCTATTCCCATTCTCAGGAG 180
|||||
Sbjct 241 ATACCTTCAAACACAAAATGGTCTATGAAGACACACTCACCTATTCCCATTCTCAGGAG 300

Query 181 AAAGTGTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAG 210
|||||
Sbjct 301 AAAGTGTCTTCATGTCGATGGAAAACCCAG 330

CPU time: 0.04 user secs. 0.03 sys. secs 0.07 total secs.

```

Şekil 4.80: Ekson 13 bölgesi 8 numaralı bireye ait blast sonucu.

Ekson 19 bölgesinde yapılan incelemelerin sonuçlarına göre, SSCA çalışmasında farklı patern gösteren venöz trombozlu hastalardan 4 numaralı bireyin DNA dizi bilgisi Şekil 4.81'da verilen ekson 19 bölgesi dizi bilgisi ile %100 tutarlılık içinde olduğu görülmüştür. Şekil 4.81'de blast analizi sonucu görülmektedir. Diğer venöz trombozlu hastalar ve sağlıklı kontrol grubu bireylerin paternini temsilen DNA dizi analizine gönderilen 5 numaralı bireyin de; DNA dizisinin, ekson 19 bölgesi dizi bilgisi ile %100 tutarlılık içinde olduğu görülmüştür.

```
5'...GTGTTTTTGAGACAGTGGAAATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGC
GGGTGGAATGCCTTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTT
TTCTGGTGTACAGCAATA...3'
```

Şekil 4.81: Faktör VIII geni Ekson19 bölgesi dizisi.

```
Score = 225 bits (117), Expect = 3e-56
Identities = 117/117 (100%), Gaps = 0/117 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   GTGTTTTTGAGACAGTGGAAATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGCGGGTGAATGCC 60
          |||
Sbjct 55   GTGTTTTTGAGACAGTGGAAATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGCGGGTGAATGCC 114

Query 61   TTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTCTGGTGTACAGCAATA 117
          |||
Sbjct 115  TTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTCTGGTGTACAGCAATA 171

CPU time:   0.04 user secs.      0.03 sys. secs      0.07 total secs.
```

Şekil 4.82: Ekson 19 bölgesi 4 numaralı bireye ait blast sonucu.

Ekson 14F bölgesinde yapılan karşılaştırma incelemeleri sonuçlarına göre, SSCA çalışmasında belirlenen 3 farklı patern grubundan ikisinde belirli baz değişimlerine rastlanmamıştır.

```
5'...TACATACAGTGACTGGCACTAAGAATTCATGAAGAACCTTTTCTTACTGAGCAC
TAGGCAAAATGTAGAAGGTTTCATATGACGGGGCATATGCTCCAGTACTTCAAGATTTT
AGGTCATTAAATGATTCAACAAATAGAACAAGAAACACACAGCTCATTTCTCAAAA
AAAGGGGAGGAAGAAAACCTTGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAAGCAAATTGTAGA
GAAATATGCATGCACCACAAGGATATCTCCTAATACAAGCCAGCAGAATTTTGTCAC
GCAACGTAGTAAGAGAGCTTTGAAACAATTGAGACTCCCACTAGAAGAAACAGAACT
TGAAAAAAGGATAATTGTGGATGACACCTCAACCCAGTGGTC...3'
```

Şekil 4.83: Faktör VIII geni Ekson 14F bölgesi dizisi.

I. patern grubuna ait olan venöz tromboz hastası 13 numaralı bireyin DNA dizi bilgisi Şekil 4.83'de verilen ekson 14F bölgesi dizi bilgisi ile %100 tutarlılık içinde olduğu görülmüştür. Şekil 4.84'te blast analizi sonucu görülmektedir.


```

Score = 569 bits (296), Expect = 2e-158
Identities = 310/310 (100%), Gaps = 0/310 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1646 AAATGTAGAAGGTTTCATATGACGGGGCATATGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATT 1705
          |||
Sbjct 27 AAATGTAGAAGGTTTCATATGACGGGGCATATGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATT 86

Query 1706 AAATGATTCAACAAATAGAACAAGAAACACACAGCTCATTCTCAAAAAAAGGGGAGGA 1765
          |||
Sbjct 87 AAATGATTCAACAAATAGAACAAGAAACACACAGCTCATTCTCAAAAAAAGGGGAGGA 146

Query 1766 AGAAAACTTGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAAGCAAATTGTAGAGAAATATGCATGCAC 1825
          |||
Sbjct 147 AGAAAACTTGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAAGCAAATTGTAGAGAAATATGCATGCAC 206

Query 1826 CACAAGGATATCTCCTAATAACAAGCCAGCAGAATTTTGTACGCAACGTAGTAAGAGAGC 1885
          |||
Sbjct 207 CACAAGGATATCTCCTAATAACAAGCCAGCAGAATTTTGTACGCAACGTAGTAAGAGAGC 266

Query 1886 TTTGAAACAATTCAGACTCCCACTAGAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAAATTGTGGA 1945
          |||
Sbjct 267 TTTGAAACAATTCAGACTCCCACTAGAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAAATTGTGGA 326

Query 1946 TGACACCTCA 1955
          |||
Sbjct 327 TGACACCTCA 336

CPU time: 0.05 user secs. 0.03 sys. secs 0.08 total secs.

```

Şekil 4.84: Ekson 14F bölgesi 13 numaralı bireye ait blast sonucu.

II. patern grubuna ait olan venöz tromboz hastası 14 numaralı bireyin DNA dizi bilgisi Şekil 4.83'te verilen ekson 14F bölgesi dizi bilgisi ile karşılaştırıldığında, 1751. konumda adenin bazı yerine sitozin bazı değişimi görülmektedir. Şekil 4.85'te blast analizi sonucu ve Şekil 4.86'da değişimin görüldüğü kısmın dizi analizi sonuçları verilmektedir.

```

Score = 579 bits (301), Expect = 3e-161
Identities = 314/315 (99%), Gaps = 0/315 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1646 AAATGTAGAAGGTTTCATATGACGGGGCATATGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATT 1705
          |||
Sbjct 30 AAATGTAGAAGGTTTCATATGACGGGGCATATGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATT 89

Query 1706 AAATGATTCAACAAATAGAACAAGAAACACACAGCTCATTCTCAAAAAAAGGGGAGGA 1765
          |||
Sbjct 90 AAATGATTCAACAAATAGAACAAGAAACACACAGCTCATTCTCAAAAAAAGGGGAGGA 149

Query 1766 AGAAAACCTGGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAAGCAAATTGTAGAGAAATATGCATGCAC 1825
          |||
Sbjct 150 AGAAAACCTGGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAAGCAAATTGTAGAGAAATATGCATGCAC 209

Query 1826 CACAAGGATATCTCCTAATACAAGCCAGCAGAATTTTGTACGCAACGTAGTAAGAGAGC 1885
          |||
Sbjct 210 CACAAGGATATCTCCTAATACAAGCCAGCAGAATTTTGTACGCAACGTAGTAAGAGAGC 269

Query 1886 TTTGAAACAATTTCAGACTCCCCTAGAAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAATTGTGGA 1945
          |||
Sbjct 270 TTTGAAACAATTTCAGACTCCCCTAGAAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAATTGTGGA 329

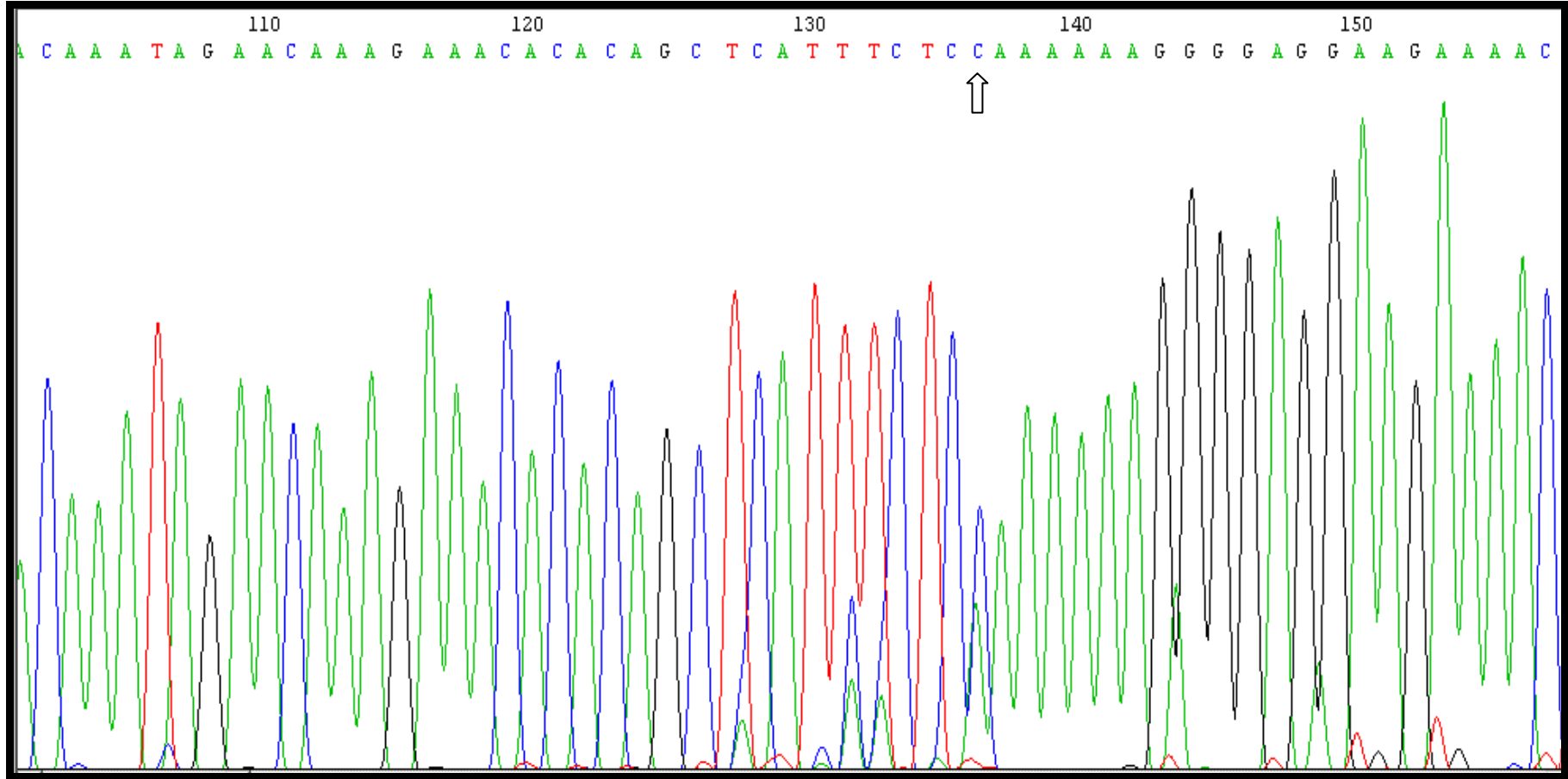
Query 1946 TGACACCTCAACCCA 1960
          |||
Sbjct 330 TGACACCTCAACCCA 344

CPU time: 0.04 user secs. 0.03 sys. secs 0.07 total secs.

```

Şekil 4.85: Ekson 14F bölgesi 14 numaralı bireye ait blast sonucu.

14. numaralı bireyin bu bölgesinde yakalanan farklılık, Sanger Enstitüsü “Sanger Institute” genom araştırmaları internet sitesinden elde edilen faktör VIII geni cDNA dizisi ile ExPASy (**Expert Protein Analysis System**) proteomik araştırmaları internet sitesinde “Translate tool” programı yardımı ile kıyaslandığında, değişimin 1288. kodonda meydana geldiği tespit edildi. 1288. kodondaki TCA dizisinin TCC olarak değiştiği görölmektedir. Meydana gelen bu değişim kodlanan amino asit bakımından bir değişim meydana getirmemektedir. TCA ve TCC dizilerinin her ikisinin de Serin amino asidini kodladıkları tespit edilmiştir.



Şekil 4.86: Ekson 14F bölgesi 14 numaralı bireye ait DNA dizi analizi görüntüsü

III. patern grubuna ait olan sağlıklı kontrol 24 numaralı bireyin DNA dizi bilgisi Şekil 4.83'te verilen ekson 14F bölgesi dizi bilgisi ile karşılaştırıldığında 1667. konumda sitozin bazı yerine guanin bazı değişimi görülmektedir. Şekil 4.87'de blast analizi sonucu ve Şekil 4.88'de değişimin görüldüğü kısmın dizi analizi sonuçları verilmektedir.

```

Score = 585 bits (304), Expect = 5e-163
Identities = 320/321 (99%), Gaps = 0/321 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1646 AAATGTAGAAGGTTTCATATGACGGGGCATATGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATT 1705
          |||
Sbjct 30 AAATGTAGAAGGTTTCATATGAGGGGGCATATGCTCCAGTACTTCAAGATTTTAGGTCATT 89

Query 1706 AAATGATTCAACAAATAGAACAAGAAACACACAGCTCATTCTCAAAAAAAGGGGAGGA 1765
          |||
Sbjct 90 AAATGATTCAACAAATAGAACAAGAAACACACAGCTCATTCTCAAAAAAAGGGGAGGA 149

Query 1766 AGAAAACCTGGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAAGCAAATTGTAGAGAAATATGCATGCAC 1825
          |||
Sbjct 150 AGAAAACCTGGAAGGCTTGGGAAATCAAACCAAGCAAATTGTAGAGAAATATGCATGCAC 209

Query 1826 CACAAGGATATCTCCTAATAACAAGCCAGCAGAATTTGTACGCAACGTAGTAAGAGAGC 1885
          |||
Sbjct 210 CACAAGGATATCTCCTAATAACAAGCCAGCAGAATTTGTACGCAACGTAGTAAGAGAGC 269

Query 1886 TTTGAAACAATTCAGACTCCCCTAGAAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAAATTGTGGA 1945
          |||
Sbjct 270 TTTGAAACAATTCAGACTCCCCTAGAAAGAAACAGAACTTGAAAAAAGGATAAATTGTGGA 329

Query 1946 TGACACCTCAACCCAGTGGTC 1966
          |||
Sbjct 330 TGACACCTCAACCCAGTGGTC 350

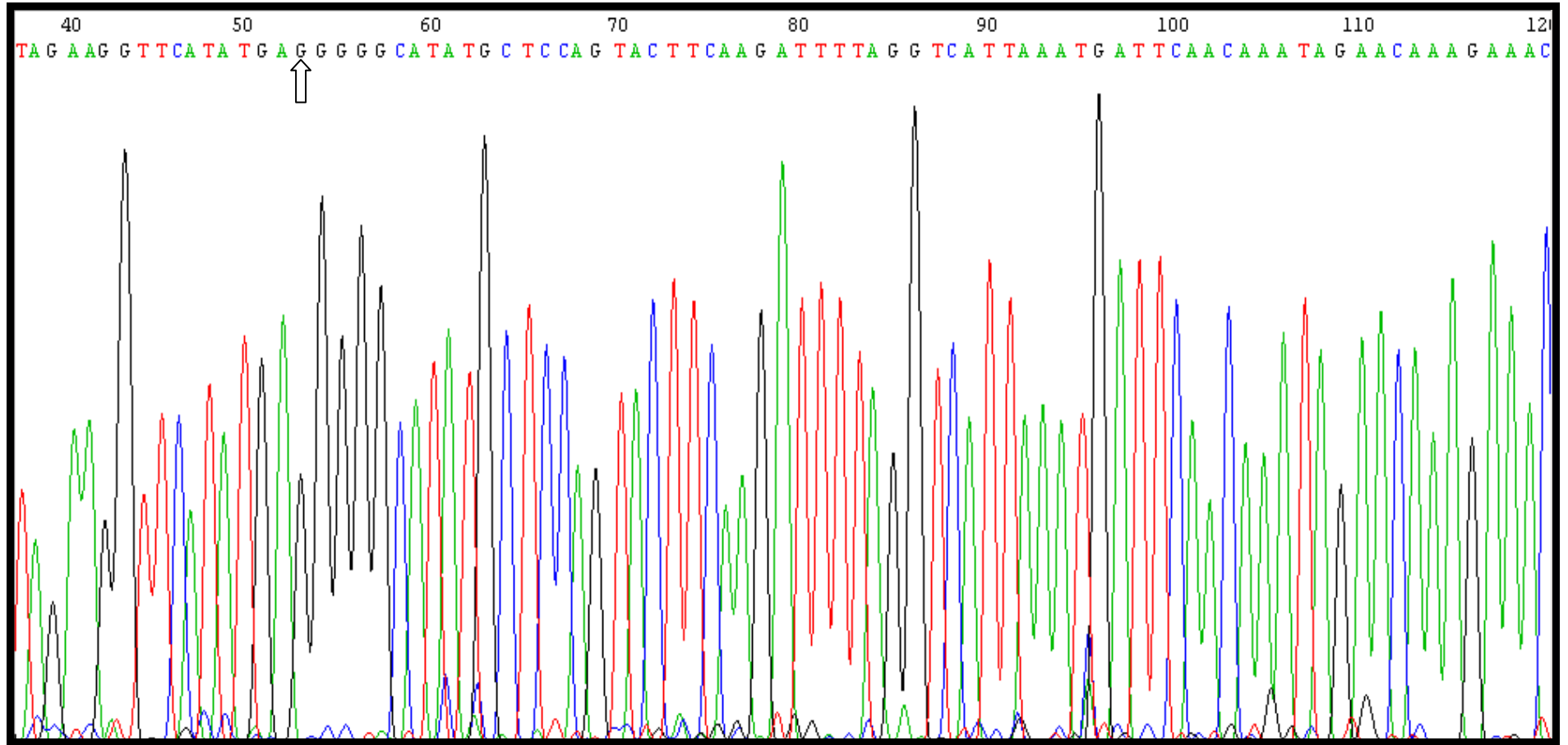
CPU time: 0.03 user secs. 0.02 sys. secs 0.05 total secs.

```

Şekil 4.87: Ekson 14F bölgesi 24 numaralı bireye ait blast sonucu.

24. numaralı bireyin bu bölgesinde yakalanan farklılık, Sanger Enstitüsü “Sanger Institute” genom araştırmaları internet sitesinden elde edilen faktör VIII geni cDNA dizisi ile ExpASy (**Expert Protein Analysis System**) proteomik araştırmaları internet sitesinde “Translate tool” programı yardımı ile kıyaslaması gerçekleştirildiğinde,

değişimin 1260. kodonda meydana geldiği tespit edildi. 1260. kodondaki GAC dizisinin GAG olarak değiştiği görülmektedir. Meydana gelen bu değişim kodlanan amino asit bakımından bir değişim meydana getirmektedir. GAC dizisi Aspartat amino asitini kodlarken, GAG dizisi ise Glutamat amino asidini kodlamaktadır. Bu değişimin olduğu III. patern grubunda 24. bireyle aynı paterni veren 23 ve 34 numaralı bireylerin tümü sağlıklı kontrol grubu içerisinde bulunmaktadır.



Şekil 4.88: Ekson 14F bölgesi 24 numaralı bireye ait DNA dizi analizi görüntüsü.

Ekson 25 bölgesinde yapılan karşılaştırma incelemeleri sonuçlarına göre, SSCA çalışmasında belirlenen 4 farklı patern grubundan üçünde belirli baz değişimlerine rastlanmıştır.

```
5'...GTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTC
ACAGGAGTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAG
TTCCTCATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCA
AAGTAAAG...3'
```

Şekil 4.89: Faktör VIII geni Ekson 25 bölgesi dizisi.

II. patern grubuna ait olan sağlık kontrol 39 numaralı bireyin DNA dizi bilgisi Şekil 4.89'da verilen ekson 25 bölgesi dizi bilgisi ile %100 tutarlılık içinde olduğu görülmüştür. Şekil 4.90'da blast analizi sonucu görülmektedir.

```
Score = 341 bits (177), Expect = 8e-91
Identities = 177/177 (100%), Gaps = 0/177 (0%)
Strand=Plus/Plus

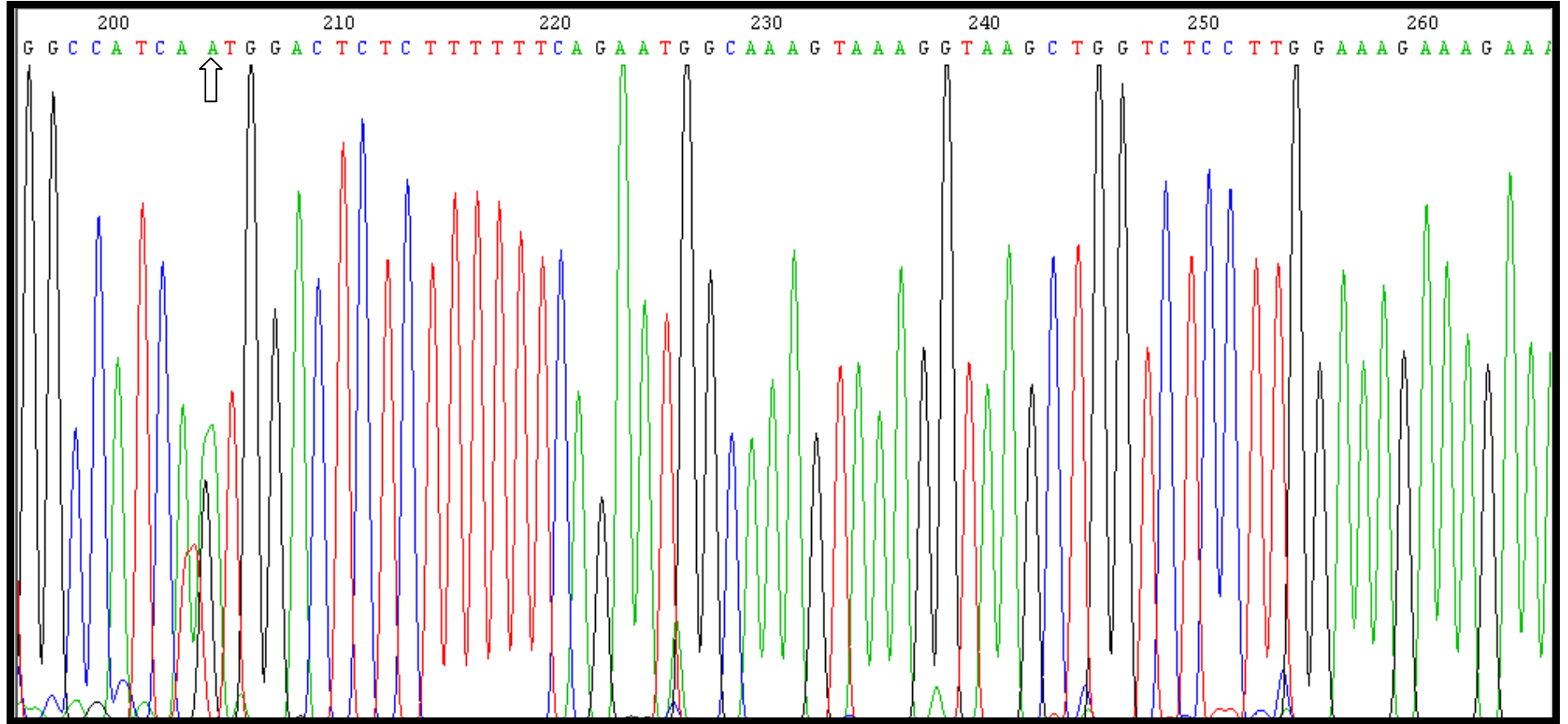
Query 1   GTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGA 60
          |||
Sbjct 55   GTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGA 114

Query 61   GTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTCATC 120
          |||
Sbjct 115  GTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTCATC 174

Query 121  TCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAG 177
          |||
Sbjct 175  TCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAG 231

CPU time:   0.03 user secs.      0.02 sys. secs      0.05 total secs.
```

Şekil 4.90: Ekson 25 bölgesi 39 numaralı bireye ait blast sonucu.



Şekil 4.92: Ekson 25 bölgesi 9 numaralı bireye ait DNA dizi analizi görüntüsü.

III. patern grubuna ait olan sağlıklı kontrol 38 numaralı bireyin DNA dizi bilgisi Şekil 4.89’da verilen ekson 25 bölgesi dizi bilgisi ile %100 tutarlılık içinde olduğu görülmüştür. Şekil 4.93’te blast analizi sonucu görülmektedir.

```

Score = 341 bits (177), Expect = 8e-91
Identities = 177/177 (100%), Gaps = 0/177 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   GTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGA 60
          |||
Sbjct 60   GTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGA 119

Query 61   GTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTCATC 120
          |||
Sbjct 120  GTAACTACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTCATC 179

Query 121  TCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAG 177
          |||
Sbjct 180  TCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAG 236

CPU time:   0.03 user secs.      0.01 sys. secs      0.04 total secs.

```

Şekil 4.93: Ekson 25 bölgesi 38 numaralı bireye ait blast sonucu.

VI. patern grubuna ait olan venöz tromboz hastası 8 numaralı bireyin DNA dizi bilgisi Şekil 4.89’da verilen ekson 25 bölgesi dizi bilgisi ile %100 tutarlılık içinde olduğu görülmüştür. Şekil 4.94’te blast analizi sonucu görülmektedir.

```

Score = 341 bits (177), Expect = 8e-91
Identities = 177/177 (100%), Gaps = 0/177 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   GTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGA 60
          |||
Sbjct 61   GTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACAGGA 120

Query 61  GTAAC TACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTCATC 120
          |||
Sbjct 121  GTAAC TACTCAGGGAGTAAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTCATC 180

Query 121 TCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAG 177
          |||
Sbjct 181  TCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTCAGAATGGCAAAGTAAAG 237

CPU time:   0.03 user secs.      0.02 sys. secs      0.05 total secs.

```

Şekil 4.94: Ekson 25 bölgesi 8 numaralı bireye ait blast sonucu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tromboz kanın damarlar içerisinde patolojik bir şekilde pıhtılaşması durumudur. Dünyadaki hastalık ve ölüm olaylarının en önemli nedenlerinden biri olan trombozun önlem ve tedavisi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda tromboza yol açtığı bilinen kalıtsal pıhtılaşma bozuklukları ile ilgili moleküler tanı çalışmaları giderek önem kazanmaktadır. Bu doğrultuda kanın pıhtılaşmasında görev alan proteinlerin genlerinde meydana gelen mutasyonlar incelenmektedir.

Tromboz gelişimi, multifaktöriyel olup çok sayıda kalıtsal ve çevresel faktörün değişik mekanizmalarla rol aldığı karmaşık bir süreç ile meydana gelmektedir (Rosendaal, 1999). Tromboz ile ilgili çalışmalar bugüne kadar antitrombin III, protein C ve S, faktör V, protrombin, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen bölgeleri ve bu gen bölgelerindeki spesifik mutasyonlara odaklanmıştır. Bununla birlikte faktör yükseklikleri ile ilgili olarak daha çok fizyolojik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Baykal ve diğ., 1999).

Dahlback (1995) tarafından 1995 yılında yayınlanan ilk makaleden beri aktive edilmiş Protein C'ye (APC) karşı gelişen patolojik direnç ile tromboza yatkınlık arasındaki paralellik günümüze kadar yapılan birçok araştırmada da doğrulanmıştır. Bu çalışmalarda tromboembolik hastalıkların birinci evresindeki hastaların yaklaşık %20'sinde yüksek APC direnci belirlenmiştir. Özellikle hastalığın ağır seyir ettiği durumlarda ya da ailesel olduğunun görüldüğü durumlarda bu sayının arttığı gözlenmiştir.

Rapor edilen olguların çoğunda Faktör V Q⁵⁰⁶ mutasyonu APC direncinin kalıtsal bir nedeni olarak gösterilmiştir (Dahlback, 1995). Bertina (1994) ve araştırma grubu tarafından 1961. pozisyondaki glutamin aminoasidinin arginine dönüşümüne neden olan G>A baz değişimi tespit edilmiştir. Bu mutasyonla birlikte APC kesim yerinde kayıp

meydana gelmekte ve bu da pıhtılaşma faktörü V'in eksik inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Tromboza yatkınlık gösteren hastaların çoğu Faktör V Q⁵⁰⁶ mutasyonu dolayısıyla patolojik APC direncine sahiptirler. Diğer yandan APC dirençli hastaların % 5-10'u ise böyle bir mutasyon taşımamaktadır (Hooper ve diğ., 1998).

APC direnci yanısıra yüksek faktör VIII konsantrasyonu ile tromboza yatkınlık arasında bir bağlantı olduğu ortaya konulmuştur (Koster ve diğ., 1995; Kamphuisen ve diğ., 2000). Faktör VIII'in inaktivasyonu faktör V'in protein C sistemi aracılığı ile gerçekleşen inaktivasyonuna benzer bir biçimde gerçekleşir. Ailesel olarak sık gözlenen trombozların bir nedeni, faktör V'in APC kesim bölgesinde meydana gelmiş bir mutasyonun katalizlediği hiperkoagülabilitedir. Faktör VIII ve faktör V arasındaki benzerlikler, faktör VIII geninde meydana gelebilecek bir mutasyonun aktive protein C'nin etkileşim bölgelerinde APC direncine ve dolayısıyla da tromboemboli yatkınlığına neden olabileceğini akla getirmektedir. Buna bir açıklama olarak hasar görmüş, bunun sonucunda da parçalanması azalmış aktif faktör VIII gösterilebilir. Bu hipotez Koster (1995) ve Kamphuisen (2000) tarafından kanıtlanan, tek başına akut faz durumu ile açıklanamayan, yüksek faktör VIII konsantrasyonları ve tromboz riskine dayanmaktadır.

Pıhtılaşmada görev alan faktör V ve faktör VIII arasında benzerlikler bulunmaktadır. Domein yapılarındaki benzerliklerinin yanı sıra ikisi de koagülasyonda Faktör X'un, dolayısıyla da protrombinin aktivasyonunda kofaktör olarak iş görmektedirler. Her ikisi de aktive protein C aracılığıyla inaktive olmaktadır. Aktive protein C, aktive Faktör VIII'i Arginin³³⁶ ve Arginin⁵⁶² amino asitlerinden proteolitik kesim yoluyla inaktive eder (Fay ve diğ., 1993).

Ayrıca faktör VIII'in farklı domeinlerinde, pıhtılaşma sisteminde görev yapan diğer bazı faktörler için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. A2 domeininde 558-565 bakiyelerde faktör IX için bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bir de faktör VIII'e 337-372. bakiyelerden ve A3 domeninde 1881-1818. bakiyelerden bağlanmaktadır. C2 domeinine fosfolipitler (trombositler) bağlanmakta buna ek olarak C2 domaini faktör X ve von Willebrand faktör için önemli bağlanma bölgeleri de içermektedir. Faktör X için diğer önemli bir interaksiyon bölgesi A1 domeininde 337-372. rezidülerdir (Saenko ve

diğ., 1999). B domeini faktör VIII'in büyük bir bölümünü oluşturmaktadır ve faktör V B domeini ile biraz benzerlik göstermektedir. B domeininin fonksiyonu tam olarak anlaşılammıştır (Pittman ve diğ., 1994).

Faktör VIII gen bölgesi üzerinde şimdiye kadar çeşitli mutasyonlar ya da baz değişimleri belirlenmiştir. Aynı zamanda pıhtılaşma faktörü VIII'deki mutasyonların varlığı sadece tromboz patogenezinde değil aynı zamanda hemofilide kanamaya yatkınlıkla sonuçlanan yetersiz bir fonksiyonun oluşumuyla da ilişkilendirilmiştir. Ağır hemofili A'nın bir formu Arginin³³⁶ aminoasitindeki "nonsense-mutasyon (anlamsız mutasyon; dur kodonunun kodlanmasına sebep olan ve protein sentezini yarıda bırakan mutasyon)" sonucu oluşmaktadır. Bu durum bu bölgede de mutasyonların olabileceğini kanıtlamaktadır (Tuddenham ve diğ., 1994)

Günümüze kadar yapılan sınırlı sayıdaki araştırmada faktör VIII gen bölgesi üzerinde belirlenen varyasyon ya da polimorfizmlerin tromboz olayı ile bağlantısı kurulammıştır. Bu bağlamda; bu tez çalışması ilgili gen bölgesi üzerinde varolan DNA dizi değişimlerini belirlemek ve gen-protein düzeyi- protein aktivasyonu ve tromboz patogenezi arasında ilişki kurmayı hedeflemektedir. Gen bölgeleri üzerindeki varolan mutasyonları belirlemek için uygulanan mutasyon analiz yöntemleri iki gruba ayrılır. Birincisi DNA dizisi üzerindeki bilinen bir ya da çok sayıdaki mutasyonların adlandırılmasına olanak sağlayan mutasyon tarama yöntemleridir. Diğeri ise ilgili gen bölgesi üzerindeki bilinmeyen mutasyon/varyasyon ya da polimorfizmlerin adlandırılmasına olanak tanıyan analiz yöntemleridir. Bilinmeyen bir DNA değişimi belirlenmek isteniyorsa uygulanacak analiz yöntemi ve materyaller de değişiklik gösterecektir. Bunlar arasında dünyada ve Türkiye'de en yaygın olarak kullanılan yöntemler SSCA, DGGE ve DNA dizi analiz yöntemleridir. Bununla birlikte bu tekniklerin arasında SSCA analiz yöntemi uygulanabilirliği nispeten kolay ve maliyet açısından da en uygun ilk adım yöntemidir. Ek olarak SSCA yöntemi % 80-90 duyarlılığa sahiptir (Sheffield ve diğ., 1993). Bu amaçla bu tez çalışması kapsamında DNA değişimlerini belirlemek için ilk eleme yöntemi olarak SSCA (Single Conformational Analysis: Tek Zincir Konformasyon Analizi) ve daha sonra bu teknik ile elde edilen farklı DNA paternlerinin tespiti içinde DNA dizi analizi yöntemleri kullanılmıştır. (Nollau ve Wagener, 1997).

Bu tez çalışmasında cinsiyet olarak eşleştirilmiş, faktör VIII seviyesi normal değerlerden yüksek olan 20 venöz tromboz hastası ve faktör VIII seviyesi normal değerler arasında olan 20 sağlık kontrol birey çalışma grubuna dahil edildi. Tez çalışmasına alınan tüm bireylerin, faktör VIII geninin promotor bölgesi ve 26 ekson bölgesinin analizi SSCA yöntemini kullanarak gerçekleştirildi. Bu yöntem ile incelenen fragmentlerin büyüklüğü 150-500 bp arasındadır. Çalışmanın başlangıç aşamasında her bir ekson için uygun PCR ve jel koşulları belirlendi. Bu amaçla optimum analiz koşullarına ulaşmak için çok sayıda ön çalışmalar gerçekleştirildi.

Faktör VIII geni promotor bölgesinde yapılan PCR ve SSCA analizleri sonucunda venöz tromboz hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubundaki örneklerde, farklı DNA paternine rastlanmadı. Elde ettiğimiz bu veri, faktör VIII seviyesi yüksekliğinin, promotor bölgedeki herhangi bir mutasyon ya da polimorfizmle bağlantılı olamayacağı yönünde ön fikir vermektedir.

Faktör VIII geninde, arginin 336 ve arginin 562'deki APC kesim yerlerinin bulunduğu ekson 8/9 ve ekson 11 bölgelerinin venöz tromboz hastaları ve sağlıklı kontrol grubu bireyleri açısından, PCR sonrası yapılan SSCA poliakrilamid jel görüntülerinde iki grup arasında herhangi bir patern farklılığına rastlanmadı. Bu veriye göre de, ekson 8/9 ve Ekson 11 bölgelerindeki APC kesim yerlerinde herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm olmadığını söyleyebiliriz.

Bu iki APC kesim bölgesi için benzer sonucun alındığı bir çalışmayı, J. Roelse ve diğ., (1996) 125 tromboembolik hastada gerçekleştirmişlerdir. Faktör VIII geninde arginin 336 ve arginin 562'deki APC kesim yerlerini incelemişlerdir. Bu iki bölgenin her birinde spesifik bir restriksiyon enzimine yönelik dizi belirlendi. Arginin 336 için *TaqI* ve *RsaI* enzimleri ile aynı şekilde arginin 562 içinde *MboI* enzimi ile inceleme yapılmış ve 125 hastada herhangi bir mutasyon olmadığı görülmüştür. Bu çalışmanın sonucu ile bizim tez çalışma sonuçlarımız bu noktada benzerlik göstermektedir.

APC bağlanma bölgesi olan ekson 19'da venöz tromboz hastaları ve sağlıklı kontrol grubu bireyleri açısından PCR sonrası yapılan SSCA poliakrilamid jel görüntülerinde venöz tromboz hastalarından sadece 4 numaralı bireyde farklı patern gözlenmiştir.

Diğer hasta örneklerinden ve kontrol grubundaki bireylere ait örneklerden farklı patern veren 4. bireyin ve karşılaştırmasını yapabilmek için kontrol grubundaki örnekler ile aynı paterni veren hasta grubundaki 5 numaralı örneğin SSCA sonucunu daha iyi yorumlamak amacı ile dizi analizi yapıldı. Dizi analizi sonuçları incelendiğinde her iki bireyin de ekson dizilerinde herhangi bir mutasyon ya da değişimin olmadığı tespit edildi. Bu doğrultuda 4 numaralı bireyin DNA paternindeki değişikliğin faktör VIII proteinin plazma seviyelerini arttırarak tromboza neden olduğu konusunda olumlu bir bilgi elde edilememiştir.

Hooper ve diğ. (1998) Afro-Amerikalarda, faktör V'te arginin 506 ve faktör VIII'de arginin 336 ve arginin 562 APC kesim yerlerinde; ayrıca faktör V ve faktör VIII'deki APC bağlanma yerlerinde mutasyon analizi üzerine dizi analizi ile gerçekleştirdiği çalışmaya ait sonuçları yayımladı. Sonuç olarak, tromboz geçmişine sahip 32 Afro-Amerikan'da ve tromboz geçmişine sahip olmayan 18 Afro-Amerikan'da Faktör V ve Faktör VIII'e ilişkin APC-bağlanma ve kesim yerlerinde mutasyon olmadığı bulundu.

Faktör VIII geni APC kesim yeri eksonlarında APC direnciyle ilişkili mutasyon analizi üzerine bir diğer çalışmada Amano ve diğ. (1998) tarafından yayınlandı. Bu grup, COS 1 maymun hücrelerinde üç faktör VIII mutasyon varyantı oluşturdu. Bir mutasyon faktör VIII'in arginin 336 (R336I) bölgesinde, bir diğeri faktör VIII'in arginin 562 (R562K) bölgesinde yer alırken, faktör VIII'in arginin 336 ve arginin 562 (R336I/R562K) bölgesinde de çifte mutasyon oluşturuldu. Bunu izleyen APC direnç testinde arginin 336 bölgesindeki R336I mutantlarının APC ilişkili ayırma karşı duyarlı olduğu; aynı şekilde arginin 562'dekinin de duyarlı olduğu sonucuna varıldı. Faktör VIII'in aktivasyon/inaktivasyon süresince kesime uğradığı ancak bu kesim işlemlerinin oluşumunda özel bir sıranın takip edilmediği ortaya konuldu. Fonksiyon testi, her iki tek mutantın normale göre daha yavaş, fakat eksiksiz bir şekilde inaktive olduklarını gösterdi. Sadece çift mutantlar APC ilişkili kesime karşı tam bir direnç gösterdiler ve düşük APC SR ortaya koydular. Bu sonuçlar APC SR'nin Faktör VIII genindeki tek mutasyonları belirlemek için uygun olmadığı hipotezini doğrulamaktadır. Aynı zamanda APC ilişkili kesimin Faktör VIII'i her iki kesim yerinden de sadece kısmen inaktive ettiğini doğrulamaktadır.

Bu konuya ilişkin bir araştırma da Kamphuisen ve diğ., (2000) tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmada bir Faktör VIII antijeninin 150 IU/dl'den yüksek dozda uygulandığında tromboz riskini 5-6 kat arttırabileceği ve bu yüksek konsantrasyonların hastaların %25'inde, kontrol grubunun ise %11'inde ilk tromboembolik atakla sonuçlanabileceği bildirilmiştir. Von-Willebrand Faktörü ve kan grupları gibi determinantlarla ilişkili bir korelasyonun varlığı saptanmıştır. Mevcut çalışmada trombofilili ve yüksek faktör VIII antijenli 12 büyük aile incelenmiştir. 58 akraba bireyin faktör konsantrasyonlarının 150 IU/dl'den yüksek (%32) ve 50 akrabanın kan grubunun da 0 olduğu tespit edilmiştir. Kız kardeşler ($p=0,003$), erkek kardeşler ($p=0,003$), kız ve erkek kardeşler ($p<0,001$) ve anneler ile oğulları ($p=0,02$) arasındaki yüksek faktör VIII konsantrasyonlarında anlamlı korelasyon belirlenmiştir. Buna karşın babalar ile kızları ve babalar ile oğulları arasında anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır. Test sonuçlarının yorumu, yüksek faktör VIII antijen konsantrasyonlarının tromboz için bir risk faktörü olduğunu ve kan gruplarının kalıtımından farklı olarak, farklı ailesel sıklıkta ortaya çıktığını yansıtmaktadır.

Bertina (2001) tarafından yayınlanan çalışmada ise pıhtılaşma kademelerindeki kan proteinlerde trombofilili analizi kapsamında incelenen 34 SNPs (tek nükleotid polimorfizmi) dikkat çekmektedir. Toplamda pıhtılaşma kaskadının 23 proteini incelenmiş, fakat Faktör VIII'le ilişkili olarak herhangi bir polimorfizme rastlanmamıştır.

Değişim yakalamış olduğumuz 14F. ekson bölgesindeki 14 numaralı venöz tromboz hastasının 1288. kodonundaki A>C değişimi kodlanan amino asit bakımından bir fark ortaya koymadığı ve yine aynı şekilde 25. ekson bölgesinde 9 numaralı venöz tromboz hastasının 2288. kodonundaki G>A değişimininde kodlanan amino asit bakımından protein yapısında ve dolayısı ile faktör VIII aktivitesinde bir değişim yapmayacağını düşündürmektedir.

Ekson 14F ekson bölgesinde 24 numaralı birey ve onunla aynı paterni veren 23 ve 34 numaralı sağlıklı kontrol grubuna ait bireylerde 1260. kodonundaki C>G değişimi sonucu bu kodondaki kodlanan amino asit aspartik asitten glutamik asite değişim göstermektedir. Bu bireylerde sağlık kontrol grubu içerisinde ve faktör VIII düzeyleri

normal değerler arasında olduğundan, bu değişimin faktör VIII proteininin aktivitesindeki bir artış ile ilişkili olamayacağı düşünülmektedir.

Ohlhoff (2001) tarafından incelenen tromboza yatkınlık gösteren 65 hastadaki APC-direncinin olası sebeplerine bağlı olarak, bu incelemelerde de APC kesim ve APC bağlanma bölgelerinde herhangi bir mutasyona veya polimorfizme rastlanmadığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, trombofili hastalarında belirtilen faktör VIII artışından, henüz aydınlatılamamış farklı bir mekanizmanın sorumlu olabileceği fikri ileri sürülmüştür.

Tromboz, belirtileri yönünden hastanın yakın olarak izlenmesine ihtiyaç duyulan, yaşamı ciddi bir şekilde tehdit eden veya kalıcı organ disfonksiyon riskine yol açan bir hastalık olup bu hastalığın temelinde yatan faktörlerin belirlenmesi profilatik tedavi yaklaşımı açısından da şiddetle gerekmektedir.

Bu çalışmada, faktör VIII geni promotor bölgesi ve 26 ekson bölgesinde yapılan moleküler analizler sonucunda, faktör VIII seviyesi yüksekliği ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm olmadığı tespit edilmiştir. Ancak bu çalışma kapsamında sadece ekson bölgeleri inceleme altına alınmıştır. Intronik bölgeler ile son yıllarda “alternatif splicing” açısından giderek önem kazanan ekson-intron birleşme bölgeleri çalışmaya alınmamıştır. Bununla birlikte bugüne kadar faktör VIII gen bölgesi üzerinde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda, faktör VIII gen bölgesine ait DNA değişimleri belirlenmişse de, bu değişimlerin protein düzeyinde herhangi bir etkiye sebep olmadıkları düşünülmektedir. Fakat faktör VIII geni üzerindeki intron ya da ekson-intron birleşme bölgelerindeki olası DNA değişimlerinin ve majör tromboli risk faktörlerinin birlikte bulunması halinde hastalık şiddetinde meydana gelebilecek olası şiddet artışı hakkında da henüz yeterli bilgi birikimi bulunmamaktadır. Bu bağlamda, ileride bu araştırma çalışmasının tamamlayıcısı olarak yapılacak diğer bir çalışmada faktör VIII gen bölgesindeki tüm DNA bölümlerinin incelenmesi ve genotip-fenotip ilişkilerinin kurulabilmesi hedeflenmektedir.

6. KAYNAKLAR

ALFIREVIC, Z., MOUSA, H.A., MARTLEW, V., BRISCOE, L., PEREZ-CASAL, M., TOH, C.H., 2001, Postnatal screening for thrombophilia women with severe proegnancy complications, *Obstet Gynecol*, 97: 753-759.

ALLAART, C.F., SWISBERTUS, R., ROSENDAAL, F., REITSMA, P.H., BERTINA, R.M., BRIET, E., 1993, Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect, *Lancet*, 341: 134-138

AMANO, K., MICHNICK, D., MOUSSALLI, M., KAUFMAN, R., 1998, Mutation at either Arg336 or Arg562 in Factor VIII Is Insufficient for Complete Resistance to Activated Protein C (APC)-mediated Inactivation: Implications for the APC-Resistance Test, *Thrombosis and Haemostasis*, 79, 557-563.

AMIRAL, J., MARTINOLI, J.L., 1985, Laboratory assay for coagulation protein C, *Thrombosis and Hemorrhagic Disease*, 125-131.

ANTON, N., MASSICOTTE, P., 2001, Venous thromboembolism in pediatrics, *Semin Vasc Med*, I: 111–121.

APARICIO, C., DAHLBACK, B., 1996, Molecular mechanisms of activated protein C resistance. Properties of factor V isolated from an individual with homozygosity for the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene", *Biochem J.*, 313: 467

ARRUNDA, W.C., PIENEMAN, P.H., REISTSMA, P.P., 1995, Eleven Novel Mutation in the Factor VIII Gene From Brazilian Hemophilia A Patients, *Blood* 8(8): 3015-3020

BAYKAL, Y., ÖZET, G., KOCABALKAN, F., 1999, Venöz Tromboz İle İlişkili Risk Faktörleri, *Turkiye Klinikleri, J Med Sci*, 19: 236-241

BERG, M.J., TYMOCZKO, L.J., STRYER, L., 2001, *Biochemistry*, Freeman, 5th Ed. 285

BERGER, M., MATTHEISEN, M., KULE, B., SCHMIDT, H., 2005, High Factor VIII Levels in Venous Thromboembolism Show Linkage to Imprinted loci on Chromosomes 5 and 11, *Blood* 105(2): 638-644

BERTINA, R., 2001, Genetic Approach to Thrombophilia, *Thrombosis and Haemostasis*, 86, 92-103.

BERTINA, R., KOELEMAN, B., REITSMA, P., 1994, Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369, 64-67.

BICK, R.L., KAPLAN, H., 1998, Syndromes of thrombosis and hypercoagulability. Congenital and acquired causes of thrombosis, *Medical Clinics of North America*, 82(3): 409-433

BLOEMANKAMP, K.W., ROSENDAAL, F.R., HELMERHORST, F.M., BULLER, H.R., VANDERBROUCKE, J.P., 2000, Higher risk of venous thrombosis during early use of oral contraceptives in women with inherited clotting defects, *Arch Intern Med* 160: 49-52

BOVILL, EG., HASSTEDT, SJ., CALLAS, PW., 2000, The G20210A prothrombin polymorphism is not associated with increased thromboembolic risk in a large protein C deficient kindred, *Thromb Haemost*, 86: 366-370

BUCCIRALLI, P., ROSENDAAL, F.R., TRIPODI, A., MANNUCCI, P.M., 1999, Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antitrombin, protein C, protein S deficiency or activated protein C resistance: A multicenter collaborative family study, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19: 1026-1034.

BUTENAS, S., VANTVEER, C., MANN, K.G., 1999, Normal thrombin generation, *Blood*, 94 2169-2178

CHANGO, A., BOISSON, F., BARBE, F., QUILLIOT, D., DROESCH, S., PFISTER, M., 2000, The effect of 677C to T and 1298 A to C mutations on plasma homocysteine and 5,10-metylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects, *Br J Nutr*, 83: 593-596

CHUNG, I., GREGORY H.Y., 2003/2004, Virchow's Triad Revisited: Blood Constituents. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 33: 449-454

COUTURE, P., DEMERS, C., MORISSETTE, J., DELAGE, R., JOMPHE, M., COUTURE, L., SIMARD, J., 1998, Type I protein C deficiency in french canadians: Evidence of a founder effect and association of specific protein C gene mutations with plasma protein C levels, *Thrombosis Haemostasis*, 80: 551-556

DAHLBÄCK, B., 1995, Inherited Thrombophilia: Resistance to Activated Protein C as a Pathogenetic Factor of Venous Thromboembolism. *Blood*, 85, 607-614.

DAVIE, E.W., REINER, A.P., 1995, Intraduction to hemostasis and vitamin K-dependent coagulation factors, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 3181-3223

DOIG, R.G., BEGLEY, C.G., MCGRATH, K.M., 1994, Hereditary protein C deficiency associated with mutations in exon IX of the protein C gene, *Thrombosis Haemostasis*, 72(2): 203-208

EATON, D., RODRIGUEZ, H., VEHAR, G. H., 1986. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity, *Biochemistry*, 25, 505-512.

EMERK, K., 1994, *Endotel hücreleri ve genel özellikleri*. T.T.B. İzmir Tabip Odası. Tıpta Temel Bilimler kolu. Sonbahar Okulu (endotel), 1-7

EMMERICH, J., ROSENDAAL, F.R., CATTANEO, M., MARGAGLIONE, M., De STEFANO, V., CUMMING, T., ARRUDA, V., HILLARO, A., RENY, J.L., 2001, Combined effect of factor V Leiden and prothrombin20210A on the risk of venous thromboembolism-pooled analysis of 8 Case-control studies including 2310 Cases and 3204 controls. Study group for pooled -analysis in venous thromboembolism, *Thromb Haemost* 86: 809-816

ENDLER, G., KYRLE, PA., EICHINGER, S., EXNER, M., 2001, Multiplexed mutagenically separated PCR:simultaneous single-tube detection of the factor V R506Q, the prothrombin G20210A and the MTHFR A223V variants, *Clin Chem*, 47: 333-335

FAY, P. J., HAIDARIS, P. J., HUGGINS, C. F., 1993, Role of the COOH-terminal acidic region of A1 subunit in A2 subunit retention in human factor VIIIa, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 17861-17866.

FRANCIS, C.W., MARDER, V.J., 1987, Physiologic regulation and pathologic disorders of fibrinolysis, *Human Pathology*, 18(2): 263-274

FREIJE, D., SCHLESSINGER, D., 1992, A 1.6-Mb contig of yeast artificial chromosomes around the human factor VIII gene reveals three regions homologous to probes for the DXS115 locus and two for the DXYS64 locus, *American Journal of Human Genetics*, 51, 66-80.

FROSST, P., BLOM, H.J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C.A., MATTHEWS, R.G., BOERS, G.J., den HEIJER, M., KLUITJTMANS, L., van den HEUVEL, L.P., ROZEN, R., 1995, A Candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in MTHFR, *Nature Genet*, 10: 111-113

GERHARDT, A., SCHARF, R.E., BECKMAN, M.W., 2000, Prothrombin and Factor V mutations in women with history of thrombosis during pregnancy and the puerperium, *N Engl J Med*, 342: 374-380

GIROLAMI, A., SIMIONI, P., SCARANO, L., CARRARO, G., 1999, Prothrombin and the prothrombin 20210 G to A polymorphism: their relationship with hypercoagulability and thrombosis, *Blood Res*, 13: 205-210

GITSCHIER, J., WOOD, W. I., GORALKA, T. M., WION, K. L., CHEN, E. Y., EATON, D. H., VEHAR, G. H., CAPON D. J., LAWN R. M., 1984, Characterisation of the human factor VIII gene, *Nature*, 312, 326-330.

GRADY, D., WENGER, N.K., HERRINGTON, D., KHANS, S., FURBERG, C., HUNNINGHAKE, D., VITTINGHOFF, E., HULLEY, S., 2000, Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic disease, The Heart and Estrogen/progestin replacement study, *Ann Intern Med*, 132: 689-696

GUYTON, HALL, 1996, Hemostaz ve kan pıhtılaşması. Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevi, 463-473

HAYASHI, K., 1993, A simple and sensitive method for the detection of mutations in the genomic DNA, *PCR methods and amplification*, 1: 34-38

HILL-EUBANKS, D. C., PARKER, C. G., LOLLAR, P., 1989, Differential proteolytic activation of factor VIII-von-Willebrand factor complex by thrombin. *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.*, 86, 6508-6512.

HOLESTELLE, M.J., THINNES, T., CRAIN, K., 2001, Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo a closer look, *Thromb Haemost*, 86,855-861.

HOOPER, C., DILLEY, A., AUSTIN, H., WENGER, N. K., BENSON, J., EVATT, B. L., SILVA, V., RAWLINS, P., 1998, Absence of Mutations at APC Cleavage Sites Arg306 in Factor V and Arg336, Arg562 in Factor VIII in African-Americans. *Thrombosis and Haemostasis*, 79, 236.

IDO, M., HAYASHI, T., NISHIOKA, J., HOH, M., MINOURA, H., TOYODA, N., HIRAYAMA, M., KAWASAKI, H., SAKURAI, M., SUZUKI, K., 1996, Prenatal diagnosis of compound heterozygous deficiency of protein C by direct detection of the mutation sites, *Thrombosis Haemostasis*, 76(2): 277-278

IRELAND, H., THOMPSON, E., LANE, D.A., 1996, Gene mutations in 21 unrelated cases of phenotypic heterozygous protein C deficiency and thrombosis. *Thrombosis Haemostasis*, 75(6): 870-876

İLİÇİN, G., ÜNAL, S., BİBEROĞLU, K., AKALIN, S., SÜLEYMANLAR, G., 1996, Pıhtılaşma Bozuklukları, Temel İç Hastalıkları: 1350-1370

JANNEKE, OHLHOFF., 2001, *Abwesenheit von Mutationen an der APC-Bindungsstelle und an den APC-Schnittstellen Arginin 336 und Arginin 562 des Gerinnungsfaktor VIII bei 65 Patienten mit venöser Thrombose*, Thesis (PhD), Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik des Universitäts-Krankenhaus Eppendorf aus der Abteilung für Klinische Chemie

KALAFATIS, M., RAND, M.D., MANN, K.G., 1994, The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C, *J Biol Chem.*, 269: 31869-31880

KAMPHUISEN, P.W., DUISTERMANT, H., HAUWELINGEN, J.J., 1998, Familial clustering of factor VIII and von willebrant factor levels. *Thrombosis Haemostasis*, 80: 561-568

KAMPHUISEN, P., LENSEN, R., ROSENDAAL, F., HOUWING-DUISTERMAAT, J. J., EIKENBOOM, J.C., HARVEY, M., BERTINA, R. M., 2000, Heretability of elevated factor VIII antigen levels in factor V Leiden families with thrombophilia, *British Journal of Haematology*, 109, 519-522.

KANE, K.K., 1984, Fibrinolysis a review. *Ann. Clin. Lab. Sci*, 14: 443-449

KANE, W. H., DAVIE, W. E., 1986. Cloning of cDNA for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin, *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.*, 83, 6800-6804.

KARIO, K., POLCHAVEL, R.K., HOSHIDE, S., SHIMADA, K., MATSUO, M., 1998, Protein C gene polymorphism and hypertensive cerebrovascular disease in Japanese. *Thrombosis Haemostasis*, 79: 1215-1216

KOSCHINSKY, M. L., FUNK, W. D., VAN OOST, B. A., MACGILLIVRAY, R. T., 1986 Complete cDNA sequence of human preceruloplasmin, *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.*, 83, 5086-5090.

KOSTER, K., BLANN, A. D., ROSENDAAL, F. R., 1995, Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis, *The Lancet*, 345, 152-155.

KOSTER, T., ROSENDAAL, F.R., de RONDE, H., BRIËT, E., VANDENBROUCKE, JP., BERTINA, R.M., 1993, Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study, *Lancet*, 342: 1503

KÜÇÜKKAYA, R., 1999, *Trombofilide tanı yöntemleri*. XXVII. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul. Mezuniyet sonrası eğitim kursu, 27-36

LAFFAN, M., TUDDENHAM, E., 1998, Science, medicine and future: assessing thrombotic risk, *BMJ*, 317(7157): 520-523

LANE, D., GRANT, P., 2000, Role of hemostatic gene polymorphism in venous and arterial thrombotic disease, *Blood*, 95(5): 1517-1532.

LANE, D.A., MANNUCCI, P.M., BAUER, K.A., 1996, Inherited thrombophilia. *Thrombosis Haemostasis*, 76: 824-829

LANZKOWSKY P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 3th ed. San Diego: Academic Press 2000: 233- 87.

LEE, R.G., BITHELL, T.C., FOERSTER, J., ATHENS, J.W., LUKENS, J.N., 1993, *Platelets hemostasis and coagulation*. Wintrobe's Clinical Hematology, ninth edition, 511-516.

- LETICH, J.M., SHERMAN, C., BROZE, G., 1987, Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 317(16): 991-996
- LEVINSON, B., KENWRICK, S., GAMEL, P., FISHER, K., GITSCHIER, J., 1992, Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene, *Genomics*, 14, 585-589.
- LEVINSON, B., KENWRICK, S., LAKICH, D., HAMMOND, G., GITSCHIER, J., 1990, A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene, *Genomics*, 7, 1-11.
- LEYTE, A., VAN SCHIJNDEL, H. B., NIEHRS, C., HUTTNER, W. B., VERBEET, M. P., MERTENS, K., VAN MOURIK, J. A., 1991, Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII and von-Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 740-746.
- LINZ, H.V., 1985, The alteration of antitrombin III, protein C and other natural inhibitors in atherosclerosis and thromboembolism. *Thrombosis and Hemorrhagic Disease*, 6-15
- LIPPINCOTT, W.W., 1999, Principles of haemostasis and thrombosis. *Clinical Haematology*, 415-419
- MANNIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982, Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- MANNUCCI, P.M., BUCCIRELLI, P., ROSENDAAL, F.R., TRIPODI, A., 1999, Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antitrombin, protein C, protein S deficiency or activated protein C resistance: A multicenter collaborative family study. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19: 1026-1032
- MARLAR, R.A., MASTOVICH, S., 1990, Hereditary protein C deficiency: A review of the genetics, clinical presentation, diagnosis and treatment. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1: 319-330
- MARTINELLI, I., CATTENEO, M., TIOLI, E., STEFANO, V., CHIUSOLO, P., MANNUCCI, P.M., 1999, Genetic risk factors for superficial vein thrombosis, *Thrombosis Haemostasis*, 82: 1215-1217
- MARTINELLI, I., SACCHI, E., LANDI, G., TAIOLI, E., DUCA, F., 1998, High risk of cerebral-vein thrombosis in Carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives, *N Engl J Med*, 338: 1840-1841
- MATHIEU-DAUDE, F., CHENG, R., WELSH, J., MCCLELLAND, M., 1996, Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single Strand Conformation polymorphism (SSCP) gels, *Nucleic Acid Research*, 24:8, 1504-1507.

MILLAR, D.J., BEVAN, D., CHITOLIE, A., REYNAUD, M., CHISHOLM, M., KAKKAR, V.V., COOPER, D.N., 1995, Three novel mutations in the protein C (PROC) gene causing venous thrombosis. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 138-140

MIYATA, T., SAKATA, T., ZHENG, Y.Z., TSUKAMATO, H., UMEYANA, H., UCHIYAMA, S., IKUSAKA, M., YOSHIOKA, A., IMANAKA, Y., FIJIMURA, H., KAMBAYASHI, J., KATO, H., 1996, Genetic characterization of protein C deficiency in Japanese subjects using a rapid and nonradioactive method for single-strand conformational polymorphism analysis and a model building. *Thrombosis Haemostasis*, 76(3): 302-311

MURPHY, R.P., DONOGHUE, C., NALLEN, R.J., MELLO, M., REGAN, C., WHITEHEAD, A., 2000, Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in pregnancy, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 20: 266-270

NOGAMI, K., SHIMA, M., HOSOKAWA, K., 1999, Role of factor VIII C2 domain in Factor VIII Binding to Factor Xa, *J Biol Chem*, 274. 31000-31007.

NOGAMI, K., SHIMA, M., HOSOKAWA, K., 2000, The Factor VIII C2 domain contains the trombin Binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at Arg 1689, *J Biol Chem*, 275, 25774-25780.

NOLL, G., LUSCNER, T.F., 1995, Influence of lipoproteins on endothelial function. *Thrombosis Research*, 74: 45-54

NOLLAU, P., WAGENER, C., 1997, Methods for Detection of point mutations: Performance and quality assessment, *Clinical Chemistry*, 43:7, 1114-1128.

O'BRIEN, D.P., JOHNSON, D., BYFIELD, T., TUDDENHAM, E.G., 1992, Inactivation of factor VIII by factor IXa. *Biochemistry*, 31, 2805-2812.

OGER, E., LACUT, K., DREDEN, V.P., BRESSOLLETTE, L., ABGRALL J.F., BLOUCH, M.T., SCARABIN, P.Y., MOTTIER, D., 2003, High Plasma Concentration of Factor VIII coagulant is also a risk factor for venous thromboembolism in the elderly. *Haematologica/Journal of Hematology*, 88(04): 465-469

PIPE, S.W., SAENKO, E.L., EICKHORST, A.N., KEMBALL-COOK, G., KAUFMAN, R.J., 2001, Hemophilia A mutations associated with 1-stage/2-stage activity discrepancy disrupt protein-protein interactions with the triplicated A domains of thrombin-activated Factor VIIIa, *Blood*, 97, 685-691.

PITTMAN, D., MARQUETTE, K. A., KAUFMAN, R.J., 1994, Role of the B domain for factor VIII and factor V expression and function, *Blood*, 84:12, 4214-4215.

POORT, S.R., ROSENDAAL, F.R., BERTINA, R.M., 1996, A common genetic variation in the 3'- untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis, *Blood*, 88:

3698-3703

POUSTKA, A., DIETRICH, A., LANGENSTEIN, G., TONIOLO, D., WARREN, S. T., LEHRACH, H., 1991, Physical map of human Xq27-qter: localizing the region of the fragile X mutation, *Proceedings of the National Academy of Science, U. S. A.* 88, 8302-8306.

PUCA, E.K., 2002, Laboratory evaluation of thrombophilia in recurrent pregnancy loss, *Transfusion Medicine Update*, Issue 1

QIU-QIONG, C., TOUITOU, I., 1993, Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency, *Nucleic Acids Research*, 21: 3909-3910

REITSMA, P.H., BERNARDI, F., DOIG, R.G., GANDRILLE, S., GREENGARD, J.S., IRELAND, H., KRAWCZAK, M., LIND, B., LONG, S.R., POORT, S.R., SAITO, H., SALA, N., WITT, I., COOPER, D.N., 1995, Protein C deficiency. A database of mutations, 1995 update, *Thrombosis Haemostasis*, 73(5): 876-889

REVEL-VILK, S., MASSIROTTE, P., 2003, Thromboembolic diseases of childhood, *Blood Reviews*, 17: 1- 6

ROELSE, J. C., KOOPMAN, M. M., BULLER, H.R., TEN CATE, J. W., MONTARULI, B., VAN MOURIK, J. A., VOORBERG, J., 1996, Absence of mutations at the activated protein C cleavage sites of factor VIII in 125 patients with venous thrombosis, *British Journal of Haematology*, 92, 740-743.

ROSENDAAL, F.R., 1999, Venous thrombosis: A multiCausa disease, *Lancet*, 353: 1167-1173

ROSENDAAL, F.R., KOSTER, T., VANDENBROUCKE, J.P., REITSMA, P.H., 1995, High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance), *Blood*, 85: 1504

ROSENDAAL, F.R., VESSEY, M., RUMLEY, A., DALY, E., WOODWARD, M., HELMERHORST, F.M., LOWE, G.D., 2002, Hormonal replacement therapy prothrombotic mutations and the risk of venous thrombosis, *Br J Haematol*, 116: 851-854

SAENKO, E.L., SHIMA, M., SARAFANOV, A.G., 1999, Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid and functioning within the factor Xase complex, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9:7 185-192.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A., 1988, Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase, *Science*, 239: 487-491

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANNIATIS, T., 1989, *Appendixes molecular cloning model book*, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Newyork, USA, 3th Ed

SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D., 2001, *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, Eight Edition, The McGraw-Hill Company, USA, 4329

SHEFFIELD, V., BECK, J., KWITEK, A. E., SANDSTROM, D. W., STONE, E., 1993, The Sensitivity of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis for the Detection of Single Base Substitutions, *Genomics*, 16, 325-332.

SMIRNOV, MD., SAFA, O., ESMON, CT., 1999, Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin, *Blood*, 94: 3839-3846

SORIA, J.M., ALMASY, L., SOUTO, J.C., 2000, Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis, *Blood*, 95: 2780-2785

SORIA, J.M., BERG, L.T., FONTCUBERTA, J., KAKKAR, V.V., ESTIVILL, X., COOPER, D.N., SALA, N., 1996, Ectopic transcript analysis indicates that allelic exclusion is an important cause of type I protein C deficiency in patients with nonsense and frameshift mutations in the PROC gene. *Thrombosis Haemostasis*, 75(6): 870-876

TERZİOĞLU, M., YİĞİT, G., ORUÇ, T., 1993, *Koagülasyon ve hemostaz*, Fizyoloji Ders Kitabı. İ.Ü. Basımevi, İstanbul, 2 177-223

THOMPSON, A.R., 2003, Structure and function of the factor VIII gene and protein, *Semin Thromb Hemost*, 29:1 11-22

TOLLEFEN, D., 2006, *Blood Coagulation* (online), St. Louis, Washington University, <http://tollefen.wustl.edu/projects/coagulation/coagulation.html> [10.03.2006]

TOWNSON-DIZON, D.S., MEILNE, L., NELSON, L.M., VARNER, M., WARD, K., 1997, Fetal Carriers of the factor V Leiden are prone to miscarriage and placental infarction, *Am J Obstet Gynecol*, 177: 402

TSAI, JC., PERRELLA, MA., YOSHIZUMI, M., HSIEH, CM., HABER, E., SCHLEGEL, R., LEE, ME., 1994, Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine. A link to atherosclerosis, *Proc Nat Acad Sci*, 91: 6369-6373

TUDDENHAM, E. G. D., SCHWAAB, R., COOPER, D. N., 1994, Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, *Nucleic Acids Research*, 22, 5311-5333.

TULLO, A., SBISA, E., 2002, Molecular characterization of p53 mutations in primary and secondary liver tumors, *Molecular Biotechnology*, 21, 265-278

ULUTİN, O.N., 1976, The platelets fundamentals and clinical applications, Kağıt ve Basım İşleri A.Ş., 1976

ULUTİN, O.N., 1994, *Endotel ve hemostatik mekanizma*. İzmir Tabib Odası Temel Bilimler Okulu (endotel), 8-10

ULUTİN, O.N., 1997, Doğal inhibitörler. *Hemostaz ve tromboz*, 7-23

ULUTİN, T., 1997, *Hemostaz biyokimyası*, Ders Notları

ÜN, C., 2002, Hemofili A Hastalığının Moleküler Genetik Temelleri. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 3(3): 43-47

VANDERBROUCKE, JP., ROSING, J., BLOEMENKAMP, KW., 2001, Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis, *N Engl J Med*, 344: 1527-1535

VEHAR, G. A., KEYT, B., EATON, D., RODRIGUEZ, H., O'BRIEN, D. P., ROTBLAT, F., OPPERMAN, H., KECK, R., WOOD, W. I., HARKINS, R. N., TUDDENHAM, E. G. D., LAWN, R. M., CAPON, D. J. (1984). Structure of human factor VIII. *Nature*, 312, 337-342.

WALKER, F. J., CHAVIN, S. I., FAY, P. J., 1987. Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 252, 322-328.

WALKER, I.D., 2000, Thrombophilia in pregnancy, *Journal of Clinical Pathology*, 53(8): 573-580

WEISBERG, I., TRAN, P., CHRISTENSEN, B., SIBANI, S., ROZEN, R., 1998, A second genetic polymorphism in metylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity, *Mol Genet Metab*, 64: 169-172

WITT, I., 1985, *Biochemical basis of protein C and protein S: International Meeting of Danubian League against Thrombosis and Hemorrhagic Disease*, İstanbul, Sep 25-28.

WION, K. L., KELLY, D., SUMMERFIELD, J. A., TUDDENHAM, E. G. D., LAWN, R. M., 1985, Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues, *Nature*, 317, 726-729.

ZELECHOWSKA, M. G., VAN MOURIK, J. A., BRODNIEWICZ-PROBA, T., 1985, Ultrastructural lokalization of factor VIII procoagulant antigen in human liver hepatocytes. *Nature*, 317,729-731.

ZHENG, Y.Z., SAKATA, T., MATSUSUE, T., UMEYAMA, H., KATO, H., MIYATA, T., 1994, Six missense mutations associated with type I and type II protein C deficiency and implications obtained from molecular modelling. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 5: 687-695

ZIVELIN, A., ROSENBERG, N., FAIER, S., 1998, A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene, *Blood*, 92: 1119-1124

7. EKLER

Ek A: Tez çalışmasına katılan venöz tromboz hastası ve sağlıklı kontrol grubu bireylere ait DNA'ların spektrofotometrik ölçüm değerleri ve konsantrasyonları.

	A260	A280	A260/A280	C(ng/μl)
1	0,06	0,04	1,65	157,5
2	0,05	0,03	1,67	135
3	0,07	0,04	1,74	182,5
4	0,07	0,04	1,69	177,5
5	0,04	0,02	1,72	115
6	0,05	0,03	1,62	110
7	0,07	0,04	1,74	182,5
8	0,05	0,03	1,75	122,5
9	0,06	0,04	1,65	145
10	0,06	0,03	1,72	137,5
11	0,06	0,03	1,76	150
12	0,06	0,04	1,7	157,5
13	0,08	0,05	1,64	205
14	0,07	0,04	1,74	182,5
15	0,05	0,03	1,67	135
16	0,07	0,05	1,43	172,5
17	0,08	0,04	1,73	189
18	0,06	0,04	1,77	160
19	0,06	0,04	1,7	157,5
20	0,06	0,04	1,65	145
21	0,05	0,03	1,75	122,5
22	0,06	0,04	1,76	154
23	0,06	0,04	1,78	157
24	0,05	0,03	1,67	135
25	0,07	0,04	1,78	180
26	0,06	0,04	1,62	142,5
27	0,03	0,03	1,72	144
28	0,06	0,03	1,76	152
29	0,08	0,05	1,64	205
30	0,05	0,03	1,62	110
31	0,04	0,04	1,7	165
32	0,06	0,04	1,75	158
33	0,04	0,03	1,46	95
34	0,04	0,02	1,76	92,5
35	0,06	0,04	1,73	155
36	0,04	0,02	1,62	97,5
37	0,04	0,04	1,79	166
38	0,06	0,04	1,76	154
39	0,08	0,05	1,74	200
40	0,07	0,04	1,75	163

Ek B: Hasta Bilgilendirme Formu**Proje Adı:** Venöz Trombozlu Hastalarda Faktör VIII Geninin Moleküler Analizi**Araştirmacı:** Araş. Gör. Mustafa AY

Tromboz kanın damarlar içerisinde patolojik bir şekilde pıhtılaşması durumudur. Batı dünyasında ve toplumumuzda hastalık ve ölümlere neden olduğu bilinmektedir. Tromboz, kan akımındaki değişiklikler, damar duvar değişiklikleri, pıhtılaşma faktörleri ve bunların inhibitörlerinin kan düzeylerindeki değişiklikleri sonucu ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda trombotik hastalıkların önlem ve tedavisindeki gelişmelere katkıda bulunmak ve tromboz patogenezi aydınlatmak amaçlanmaktadır. Bu yüzden, çalışmalar daha çok moleküler biyoloji ve genetik temeline dayandırılmaktadır. Bu amaçla venöz tromboz hastalarında pıhtılaşma sisteminde görevli faktörlerden biri olan faktör VIII'in düzeyi belirlenecektir. Yüksek faktör VIII düzeyi venöz trombozda bir risk faktörü oluşturduğundan, bu özelliğe sahip kişilerde, faktör VIII geninin moleküler analizinin yapılması planlanmaktadır. Sizden alınacak kan örneğinde bu araştırmanın yapılmasını kabul etmeniz bilime büyük bir katkı sağlayacaktır.

Ek C: Hasta Onay Formu

Proje Adı: Venöz Trombozlu Hastalarda Faktör VIII Geninin Moleküler Analizi

Araştirmacı: Araş. Gör. Mustafa AY

Çalışma ile ilgili bilgileri okuduktan ve tarafıma sözel olarak açıklama yapıldıktan sonra ilgili araştırmaya katılmayı kabul ediyorum.

Çalışmaya Katılanın

Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Kırklareli’de doğdum. Orta öğretimimi Kırklareli Fahri Kasapoğlu Orta Öğretim Okul’unda, lise eğitimimi Kırklareli Atatürk Lisesi’inde tamamladım.1994 yılında kayıt yaptırdığım Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nden 1998 yılında mezun oldum. Aynı yıl başladığım , Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans öğrenimimi 2001 yılında tamamladım. 2002 yılının Şubat ayında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküller Biyoloji ve Genetik programında Doktora öğrenimime başladım. 1999-2001 yılları arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak görev yaptım. 2001 yılından bu yana İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.

SUMMARY

MOLECULAR IDENTIFICATION OF FACTOR VIII GENE REGION IN VENOUS THROMBOLITIC PATIENTS

Thrombosis is pathologic coagulation of blood in vessels. It is known that it leads to disease and death in the world and in Turkish population. Thrombosis results from variations in blood flow, structural changes in vessel walls, alterations in the level of coagulation factors and their inhibitors. Since the recent researches are focused on improvement of therapy strategies, prevention and identification of thrombosis pathogenesis, generally the techniques employed in these studies are based on molecular biology and genetics.

Pathogenesis of thrombosis is a complex multifactorial condition in which various hereditary and environmental factors play role. The studies focused on thrombosis until today involves antithrombin III, protein C and S, factor V, prothrombin, methylenetetrahydrofolat reductase (MTHFR) gene regions and the mutations found within these gene regions. Besides, most of the researches performed about factor levels consist of physiologic studies. These studies revealed that high FVIII level is associated with thrombosis. Also, in many cases it was mentioned that high FVIII levels are inherited.

In this study, experiment groups are selected from 20 individuals with venous thrombosis diagnosis and control groups are selected from 20 healthy individuals. FVIII gene promoter regions and 26 exon regions of all individuals were amplified by polymerase chain reaction and unknown mutation detection or polymorphism screening were made by SSCA method.

As a result of our analysis, we have not detected any different patterns in the FVIII gene promoter region of healthy individuals and venous thrombosis patients in the SSCA polyacrylamide gels which were performed after PCR. In FVIII gene, there was no pattern difference between exon 8/9 and exon 11 regions which have an APC cleavage site when venous thrombosis patients and healthy individuals were compared. A different pattern was detected from a venous thrombosis patient in exon 19 which has an APC binding region. After sequence analysis, it was found that there is not any mutation or a polymorphism.

Different patterns were detected in the exon 6, exon 13, exon 14F and exon 25 regions of FVIII gene. It was also found that there were no mutations or polymorphism in exon 6 and exon 13 according to sequence analysis of the individuals who have different patterns. Base changes were detected in specific regions of 3 individuals after the sequence analysis of exon 14F and exon 25. While one of the base changes detected in the 14F region, was found to change the amino acid sequence of the gene product, other 2 base changes were found not to affect the amino acid sequence.

As a result of molecular analysis performed on factor VIII promoter and 26 exon regions, neither any mutations nor polymorphisms related with high levels of factor VIII were detected.

ÖZET

VENÖZ TROMBOLİ HASTALARINDA FAKTÖR VIII GEN BÖLGESİNİN MOLEKÜLER TANISI

Tromboz kanın damarlar içerisinde patolojik bir şekilde pıhtılaşması durumudur. Dünyada ve Türk toplumunda hastalık ve ölümlere neden olduğu bilinmektedir. Tromboz, kan akımındaki değişiklikler, damar duvar değişiklikleri, pıhtılaşma faktörleri ve bunların inhibitörlerinin kan düzeylerindeki değişiklikleri sonucu ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, tromboz patogenezinin önlenmesi ve tanımlanması üzerinde yoğunlaştığından, bu çalışmalarda genellikle moleküler biyoloji ve genetik temeline dayanan teknikler kullanılmaktadır.

Tromboz patogenezi, multifaktöriyel olup çok sayıda kalıtsal ve edinsel faktörün değişik mekanizmalarla rol oynadığı karmaşık bir süreç ile meydana gelmektedir. Tromboz ile ilgili çalışmalar bugüne kadar antitrombin III, protein C ve S, faktör V, protrombin, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gen bölgeleri ve bu gen bölgelerindeki spesifik mutasyonlara odaklanmıştır. Bununla birlikte faktör yükseklikleri ile ilgili olarak yapılan araştırmaların birçoğu fizyolojik çalışmalardan oluşmaktadır. Bu çalışmalar, faktör VIII düzeyi yüksekliğinin tromboz ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca yüksek faktör VIII düzeylerinin kalıtsal olduğunda birçok olguda belirtilmektedir.

Bu tez çalışmasında, çalışma grubu venöz tromboz teşhisi konulmuş 20 birey ile 20 sağlıklı kontrol bireyden oluşturuldu. Tüm bireylerin faktör VIII geni promotör bölgesi ve 26 ekson bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılıp, SSCA yöntemi ile bilinmeyen bir mutasyon ya da polimorfizm taraması yapıldı.

Yaptığımız analizler sonucunda faktör VIII geni promotör bölgesinde venöz tromboz hastaları ve sağlıklı kontrol grubu bireyleri açısından, PCR sonrası yapılan SSCA poliakrilamid jel görüntülerinde herhangi bir patern farklılığına rastlamadık. Faktör VIII geninde, APC kesim yerlerinin bulunduğu ekson 8/9 ve ekson 11 bölgelerinin venöz tromboz hastaları ve sağlıklı kontrol grubu bireyleri için, herhangi bir patern farklılığına rastlamadık. APC bağlanma bölgesi olan ekson 19'da bir venöz tromboz hastasında farklı patern belirlendi. Dizileme analiz sonucunda bunun bir mutasyon ya da polimorfizm olmadığı saptandı.

Faktör VIII geninin ekson 6, ekson 13, ekson 14F ve ekson 25 bölgelerinde ise farklı paternler belirlendi. Farklı patern veren bireylerin dizileme analizi sonuçlarına göre ekson 6 ve ekson 13'te herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm olmadığı saptandı. Ekson 14F ve ekson 25 bölgelerine ait dizileme sonuçlarında 3 bireye ait belirli bölgelerde baz değişimleri olduğu tespit edildi. 14F bölgesinde saptanan baz değişimlerinden birinin gen ürününün amino asit dizisini değiştirdiği belirlenirken, diğer 2 baz değişikliğinin amino asit dizisine etki etmediği saptandı.

Sonuç olarak, faktör VIII geni promotör bölgesi ve 26 ekson bölgesinde yapılan moleküler analizler sonucunda, faktör VIII seviyesi yüksekliği ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm olmadığı tespit edildi.