



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KALITSAL TROMBOFİLİ'NİN MOLEKÜLER
ANALİZİ**

**Uzm.Bio.Bilgen DÖLEK
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman
Prof.Dr.Nermin GÖZÜKIRMIZI**

Eylül, 2004

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KALITSAL TROMBOFİLİ'NİN MOLEKÜLER
ANALİZİ**

**Uzm.Bio.Bilgen DÖLEK
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman
Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI**

Eylül, 2004

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Trombofili, kanın damarlar ve kalp içersinde anormal bir biçimde pıhtılaşması olayıdır. Kalıtsal trombofili ile bağlantılı olabilecek mutasyonların taranması, yeni mutasyon veya varyasyonların tanımlanması ve etkilerinin araştırılması; klinik teşhisin doğrulanmasına, genetik risk faktörlerinin belirlenmesine ve dolayısı ile kişiye bağlı risk faktörlerinin (sigara kullanımı, şişmanlık, stres, doğum kontrol hapı kullanımı vb.) azaltılması veya mümkünse yok edilmesine yardımcı olacaktır.

Bu çalışmada, Türkiye popülasyonuna ait genel tromboemboli ve derin ven trombozu “DVT: Deep Vein Thrombosis” hasta ve kontrol grupları ile gebelik komplikasyonu hasta ve kontrol grupları üzerinde faktör V Leiden, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) 677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları polimeraz zincir reaksiyonu “PCR: Polymerase Chain Reaction” ve restriksiyon enzim analizi “REA: Restriction Enzyme Analysis” teknikleri ile incelendi. Yeni mutasyon veya varyasyonların tespiti için tek zincir konformasyon analizi “SSCA: Single Strand Conformation Analysis” ve DNA dizi analizi tekniklerinden yararlandı.

Doktora tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleri ile yön gösteren, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim üyelerinden, danışman hocam Sayın **Prof.Dr.Nermin Gözükırmızı**'ya, doktora tez izleme komitemde bulunan değerli hocalarım İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim üyesi Sayın **Prof.Dr.Avni Kuru**'ya ve Marmara Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof.Dr.Ahmet Zehir**'e çok teşekkür ederim.

Tezimin deneysel aşamalarını, Düzen Laboratuvarlar Grubu Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'nde gerçekleştirme olanağı sağlayan Düzen Laboratuvarlar Grubu kurucusu ve yöneticisi Sayın **Prof.Dr.Yahya Laleli**'ye ve Sayın **Uzm.Dr.Altan Yalçın**'e, tüm çalışmalarım sırasında deneyimlerini ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Sayın **Dr.Serpil Eraslan**'a, Sayın **Biyolog Sevim Eroğlu**'na ve Sayın **Uzm.Dr. Belgin Eroğlu Kesim**'e en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm çalışmalarımda bana destek veren **AİLEME** teşekkür ederim.

Bu çalışma, T-29/23072002 sayılı proje ile T.C. İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücülüğü tarafından desteklenmiştir.

Eylül, 2004

Bilgen DÖLEK

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. Faktör V Gen Mutasyonları ve Aktive Protein C Dirençliliği	16
2.2. Metilentetrahidrofolat redüktaz Gen Mutasyonları ve Hiperhomosisteinemi	20
2.3. Protrombin Gen Mutasyonları	22
3. MALZEME VE YÖNTEM	25
3.1. Çalışma Grubu	25
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu	25
3.2.2. DNA'nın Kalitatif Tayini	26
3.2.3. DNA'nın Kantitatif Miktar Tayini	27
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	27
3.2.4.1. PCR Bileşenleri	28
3.2.4.2. Primerler	29
3.2.4.3. DNA Polimeraz Enzimi ve Tamponu	30
3.2.4.4. PCR Programları	30
3.2.5. DNA Analiz Yöntemleri	31
3.2.5.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	31
3.2.5.2. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)	32
3.2.5.3. Tek Zincir Konformasyon Analizi	35
3.2.5.4. İstatistiksel Hesaplamalar	38
3.2.5.5. DNA Dizi Analizi	40
4. BULGULAR	43
4.1. Çalışma Grubu	43
4.2. Yöntem	43
4.2.1. Genomik DNA İzolasyonu Bulguları	43
4.2.2. DNA'nın Kalitatif Bulguları	43
4.2.3. DNA'nın Kantitatif Miktar Tayini Bulguları	44
4.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları	44
4.2.5. DNA Analiz Yöntemleri	44
4.2.5.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi Bulguları	44
4.2.5.2. Restriksiyon Enzim Analizi Bulguları	46
4.2.5.3. Tek Zincir Konformasyon Analizi (SSCA) Bulguları	52
4.2.5.4. İstatistiksel Hesaplama Sonuçları	60
4.2.5.5. DNA Dizi Analiz Bulguları	78
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	81

6. KAYNAKLAR	90
7. EKLER	98
8. ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 : Virchow triad'ı [3].	4
Şekil 2.2 : İnaktif proteinin proteolitik kesim veya başka bir proteinin bağlanması ile aktif hale gelmesi [4].	5
Şekil 2.3 : Kan-pıhtılaşma kademeleri [5].	6
Şekil 2.4 : <i>In vivo</i> kan pıhtılaşmasının başlaması [4].	8
Şekil 2.5 : Pıhtılaşma faktörlerinin yapısının şematik olarak gösterilmesi [4].	9
Şekil 2.6 : Protrombinde (faktörII) γ - karboksiglutamat bakiyesi içeren bölge [4].	10
Şekil 2.7 : Protrombin, VII, IX ve X biyosentezinde K vitamininin rolü [4].	11
Şekil 2.8 : Trombin tarafından faktör VIII'in aktivasyonu [4].	12
Şekil 2.9 : Protrombin aktivasyon kompleksi [4].	13
Şekil 2.10 : Fibrinojen proteininin yapısı [4].	14
Şekil 2.11 : Fibrin molekülünün polimerizasyonu [4].	14
Şekil 2.12 : Faktör XIIIa'nın transglutaminasyon aktivitesi [4].	15
Şekil 2.13 : Faktör V'in trombin ile aktivasyonu ve APC ile inaktivasyonu [21].	17
Şekil 2.14 : Homosistein metabolizması [46].	20
Şekil 3.1 : PROMEGA firmasına ait Φ HinfI-DNA markırının % 8'lik poliakrilamid jeldeki görünümü.	31
Şekil 4.1 : Genomik DNA'ların % 1.5 (w/v) agaroz jeldeki görünümleri.	44
Şekil 4.2 : PCR ürünlerinin % 8 (29:1) poliakrilamid jelde gösterilmesi.	45
Şekil 4.3 : Faktör V Leiden mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ve kesim ürünlerinin % 12 (29:1)'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri.	47
Şekil 4.4 : MTHFR677C>T mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ve kesim ürünlerinin % 12 (29:1)'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri.	49
Şekil 4.5 : MTHFR1298A>C mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ve kesim ürünlerinin % 12 (19:1)'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri.	50
Şekil 4.6 : Protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ve kesim ürünlerinin % 6 (19:1)'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri.	52
Şekil 4.7 : Faktör V Leiden mutasyonunu barındıran ilgili gen bölgesi PCR ürünlerine ait SSCA çalışması.	54
Şekil 4.8 : MTHFR1298A>C mutasyonunu barındıran ilgili gen bölgesi PCR ürünlerine ait SSCA çalışması.	57
Şekil 4.9 : Protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran ilgili gen bölgesi PCR ürünlerine ait SSCA çalışması.	58
Şekil 4.10 : Protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran ilgili gen bölgesi SSCA çalışmalarında saptanan farklı SSCA modellerinin gösterilmesi.	59
Şekil 4.11 : Protrombin20210G>A mutasyonu gen bölgesi [80].	79
Şekil 4.12 : Protrombin20210G>A mutasyonu için homozigot normal genotipi olan PCR örneğinin gen dizisinin DNA dizi analizi tekniği ile gösterimi.	79
Şekil 4.13 : Protrombin20210G>A mutasyonu için heterozigot mutant genotipi olan PCR örneğinin gen dizisinin DNA dizi analizi tekniği ile gösterimi.	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 : Pıhtılaşma faktörleri ve molekül ağırlıkları [4].	7
Tablo 2.2 : Enzimatik olmayan protein kofaktörler [4].	11
Tablo 2.3 : Faktör V ve trombositler tarafından protrombin aktivasyonunun hızlandırılması [4].	13
Tablo 3.1 : NaCl yöntemi ile genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar.	26
Tablo 3.2 : Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon ve solüsyonu.	27
Tablo 3.3 : Faktör V Leiden mutasyonunun belirlenmesi amacı ile uygulanan PCR koşulları.	28
Tablo 3.4: MTHFR677C>T mutasyonunun belirlenmesi amacı ile uygulanan PCR koşulları.	28
Tablo 3.5: MTHFR1298A>C mutasyonunun belirlenmesi amacı ile uygulanan PCR koşulları.	28
Tablo 3.6: Protrombin20210G>A mutasyonunun belirlenmesi amacı ile uygulanan PCR koşulları.	29
Tablo 3.7 : Primer isimleri ve baz dizileri.	29
Tablo 3.8 : Faktör V Leiden, MTHFR677C>T ve protrombin20210G>A mutasyonlarının belirlenmesinde uygulanan PCR programı.	30
Tablo 3.9 : MTHFR1298A>C mutasyonunun belirlenmesi için uygulanan PCR programı.	30
Tablo 3.10 : % 8 (29:1) Poliakrilamid jel solüsyonunun hazırlanması.	31
Tablo 3.11 : Gümüş boyama tekniğinde kullanılacak solüsyonlar ve içerikleri.	32
Tablo 3.12 : Faktör V Leiden mutasyonunun belirlenmesi için uygulanan enzim kesim yöntemi.	33
Tablo 3.13 : MTHFR677C>T mutasyonunun belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi yöntemi.	33
Tablo 3.14 : MTHFR1298A>C mutasyonunun belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi yöntemi.	33
Tablo 3.15 : Protrombin20120G>A mutasyonunun belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi yöntemi.	34
Tablo 3.16 : % 6 (19:1) Poliakrilamid jel solüsyonunun hazırlanması.	34
Tablo 3.17 : % 12 (29:1) Poliakrilamid jel solüsyonunun hazırlanması.	35
Tablo 3.18 : % 12 (19:1) Poliakrilamid jel solüsyonunun hazırlanması.	35
Tablo 3.19 : SSCA yükleme solüsyonunun hazırlanışı.	38
Tablo 4.1 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubu bireylerinin faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarına ilişkin genotipleri.	62
Tablo 4.2 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubunda, Faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları için elde edilen ham olasılık değerleri (OR).	63
Tablo 4.3 : DVT hasta ve kontrol grubu bireylerinin faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarına ilişkin genotipleri.	65
Tablo 4.4 : DVT hasta ve kontrol grubunda, faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları için elde edilen ham olasılık değerleri (OR).	66
Tablo 4.5 : Gebelik komplikasyonları grubu bireylerinin faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarına ilişkin genotipleri.	68
tablo 4.6 : Gebelik komplikasyonları grubunda, faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları için elde edilen ham olasılık değerleri (OR).	69
Tablo 4.7 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubu arasında, faktör V Leiden mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	70

Tablo 4.8 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubu arasında MTFR677C>T mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	70
Tablo 4.9 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubu arasında MTFR1298A>C mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	71
Tablo 4.10 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubu arasında protrombin 20210G>A mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	71
Tablo 4.11 : DVT hasta ve kontrol grubu arasında, faktör V Leiden mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	72
Tablo 4.12 : DVT hasta ve kontrol grubu arasında, MTFR677C>T mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	72
Tablo 4.13 : DVT hasta ve kontrol grubu arasında, MTFR1298A>C mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	73
Tablo 4.14 : DVT hasta ve kontrol grubu arasında, protrombin20210G>A mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	73
Tablo 4.15 : Gebelik komplikasyonları hasta grubu ve kontrol grubunda faktör V' in χ^2 değerler tablosu.	74
Tablo 4.16 : Gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol grubu arasında MTFR677C>T mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	74
Tablo 4.17 : Gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol grubu arasında, MTFR1298A>C mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	75
Tablo 4.18 : Gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol grubu arasında, protrombin20210G>A mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.	75
Tablo 4.19 : χ^2 dağılım fonksiyonun eşik değerleri tablosu [79].	77

SEMBOL LİSTESİ

APC	:Aktive protein C
APCR	:Aktive protein C dirençliliği “ <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>C</u> <u>R</u> esistance”
ASO	:Allele Özgü Oligonükleotid “ <u>A</u> llele <u>S</u> pesific <u>O</u> ligonucleotide”
APS	:Amonyum peroksidisülfat
Asp	:Aspartat
Bç	:Baz çifti
Ca	:Kalsiyum
CβS	:Sistatyonin β-sentaz “ <u>C</u> ystathionine <u>β</u> <u>S</u> ynthase”
Da	:Dalton
DHF	:Dihidrotetrafolik asit
DNA	:Deoksiribonükleik asit
dNTP	:2' deoksiribonükleozit 5' trifosfat
DVT	:Derin ven trombozu “ <u>D</u> eep <u>V</u> ein <u>T</u> hrombosis”
EGF	:Epidermal büyüme faktörü “ <u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor”
EDTA	:Etilendiamintetraasetikasit
EtBr	:Etidyum bromür
Gla	:γ-karboksiglutamat
His	:Histidin
HMWK	:Yüksek molekül ağırlıklı kininojen “ <u>H</u> igh <u>M</u> olecular <u>W</u> eight <u>K</u> ininogene”
Kb	:Kilobaz
MI	:Kalp krizi “ <u>M</u> yocardial <u>I</u> nfection”
MTHFR	:Metilentetrahidrofolat redüktaz
MT/MT	:Homozigot mutant
MT/N	:Heterozigot mutant
N/N	:Homozigot normal
OD	:Optik dansite
OR	:Ham olasılık oranı “ <u>O</u> dds <u>R</u> atio”
PA	:Plazminojen aktivatör
PCR	:Polimeraz zincir reaksiyonu “ <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction”
PL	:Fosfolipit “ <u>P</u> hospholipide”
REA	:Restriksiyon enzim analizi “ <u>R</u> estriction <u>E</u> nzyme <u>A</u> nalysis”
SAH	:S-adenozil homosistein
SAM	:S-adenozil metiyonin
Ser	:Serin
SDS	:Sodyumdodesilsülfat
SSCA	:Tek Zincir Konformasyon Analizi “ <u>S</u> ingle <u>S</u> trand <u>C</u> onformation <u>A</u> nalysis”
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TE	:Tris-EDTA
TEB	:Tris-EDTA-Borik asit
TEMED	:N, N, N', N'-tetrametilen diamin
THcy	:Total homosistein
THF	:Tetrahidrofolik asit
TF	:Doku faktörü “ <u>T</u> issue <u>F</u> actor”
TFPI	:Doku faktörü yolu inhibitörü “ <u>T</u> issue <u>F</u> actor <u>P</u> athway <u>I</u> nhibitor”
UV	:Ultraviyole
VTE	:Venöz tromboemboli
vWF	:von Willebrand faktörü
XC	:Ksilen siyanol

ÖZET

KALITSAL TROMBOFİLİ'NİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Bu tez çalışmasında, faktör V Leiden, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) 677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarının, kalıtsal trombofilik bozukluklar, derin ven trombozu (DVT) ve gebelik komplikasyonlarındaki rollerinin incelenmesi amaçlandı. İlk olarak, Türkiye tromboemboli hastalarında bu mutasyonların frekansları hesaplandı. Ayrıca tek zincir konformasyon analizi (SSCA) ve DNA dizi analizi teknikleri ile bilinmeyen mutasyonların taranması ve adlandırılması gerçekleştirildi.

Çalışmada, genel tromboemboli grubu olarak adlandırılan toplam 270 trombofilik hasta ve 67 kontrol bireyde restriksiyon enzim analizine (REA) dayalı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile tüm mutasyonlar analiz edildi. Sonuçlar, genel tromboemboli grubundan oluşturulan DVT ve gebelik komplikasyonları alt gruplarında bağımsız olarak değerlendirildi. DVT grubunda, 46 hasta ve 67 kontrol bireyde, gebelik komplikasyonları grubunda ise komplikasyonlu gebelikleri olan 60 kadın hasta ve 33 sağlıklı kadında adı geçen mutasyonlar analiz edildi. Genel tromboemboli grubunda, faktör V Leiden mutasyonu için 7 hasta homozigot (% 2.65) ve 69 hasta heterozigot (% 25.5) mutant, MTHFR677C>T mutasyonu için 20 hasta homozigot (% 7.5) ve 112 hasta heterozigot (% 41.4) mutant, MTHFR1298A>C mutasyonu için 24 hasta homozigot (% 9) ve 146 hasta heterozigot (% 54) mutant ve protrombin20210G>A mutasyonu için 3 hasta homozigot (% 1.2) ve 20 hasta heterozigot (% 7.4) mutant olarak belirlendi. DVT grubunda, faktör V Leiden mutasyonu için 2 hasta homozigot (% 4.5) ve 17 hasta heterozigot (% 36.9) mutant, MTHFR677C>T mutasyonu için 5 hasta homozigot (% 11) ve 18 hasta heterozigot (% 39) mutant, MTHFR1298A>C mutasyonu için 8 hasta homozigot (% 17.5) ve 21 hasta heterozigot (% 45.6) mutant ve protrombin20210G>A mutasyonu için 4 hasta heterozigot mutant (% 9) olarak belirlendi. Gebelik komplikasyonları grubunda, faktör V Leiden mutasyonu için 1 hasta homozigot (% 1.67) ve 12 hasta heterozigot mutant (%20.0), MTHFR677C>T mutasyonu için 2 hasta homozigot (% 3.4) ve 29 hasta heterozigot (% 48.31) mutant, MTHFR1298A>C mutasyonu için 5 hasta homozigot (% 8.4) ve 32 hasta heterozigot (% 53.3) mutant ve protrombin20210G>A mutasyonu için 1 hasta homozigot (% 1.7) ve 2 hasta heterozigot (% 3.3) mutant olarak belirlendi.

Genel tromboemboli, DVT ve gebelik komplikasyonları hasta gruplarında, sırası ile, faktör V Leiden (% 28.15, 41.4 ve 21.67) ve protrombin20210G>A (% 8.6, 9 ve 5) mutasyonları kontrol gruba kıyas ile daha yüksek frekanslarda belirlendi. MTHFR677C>T ve MTHFR1298A>C mutasyonları tüm hasta (% 48.9, 50 ve 51.71 ve % 63, 63.1 ve 61.7) ve kontrol gruplarında (% 37.3, 37.3 ve 36.4 ve % 62.7, 62.7 ve 63.6) istatistiksel olarak yakın sıklıkta görülmektedir. Adı geçen iki mutasyonun Türkiye popülasyonunda tromboemboli hastalarında, DVT ve gebelik süresince etkili olmadığı düşünülmektedir.

SUMMARY

MOLECULAR ANALYSIS OF INHERITED THROMBOFILIA

The aim of this thesis was to investigate the role of factor V Leiden, prothrombin20210G>A, metylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T, and MTHFR1298A>C mutations, in inherited thrombophilic disorders, deep vein thrombosis (DVT) and pregnancy complications. The frequencies of these mutations among the Turkey thrombophilia patients were calculated. Screening and identification of unknown mutations using single strand conformation analysis (SSCA) and DNA sequencing was performed.

In this study, a total number of 270 thrombophilic patients and 67 normal controls, which formed our major thromboembolia group, were analysed for all these mutations using polymerase chain reaction (PCR) based restriction enzyme analysis (REA). The results were interpreted in two subgroups, namely, the DVT group and pregnancy complications group. 46 patients and 67 normal controls were analysed within the DVT group. On the other hand, 60 women suffered pregnancy complications were analysed with 33 normal controls. In the major thromboembolia group, 7 patients were found to be homozygous and 69 patients were heterozygous for factor V Leiden with a calculated frequency of 2.65 % and 25.5 %, 20 patients were found to be homozygous and 112 patients were heterozygous for MTHFR677C>T with a calculated frequency of 7.5 % and 41.4 %, 24 patients were found to be homozygous and 146 patients were heterozygous for MTHFR1298A>C mutations with a calculated frequency of 9 % and 54 %, 3 patients were found to be homozygous and 20 patients were heterozygous for prothrombin 20210G>A with a calculated frequency of 1.2 % and 7.4 % respectively. In the DVT group, 2 patients were found to be homozygous and 17 patients were heterozygous for factor V Leiden with a calculated frequency of 4.5 % and 36.9 %, 5 patients were found to be homozygous and 18 patients were heterozygous for MTHFR677C>T with a calculated frequency of 11 % and 39 %, 8 patients were found to be homozygous and 21 patients were heterozygous for MTHFR1298A>C mutations with a calculated frequency of 17.5 % and 45.6 %, 4 patients were heterozygous for prothrombin 20210G>A with a calculated frequency of 9 % respectively. In the pregnancy complications group, only one patient were found to be homozygous and 12 patients were heterozygous for factor V Leiden with a calculated frequency of 1.67 % and 20.0 %, 2 patients were found to be homozygous and 29 patients were heterozygous for MTHFR677C>T with a calculated frequency of 3.4 % and 48.31 %, 5 patients were found to be homozygous and 32 patients were heterozygous for MTHFR1298A>C mutations with a calculated frequency of 8.4 % and 53.3 %, only one patient were found to be homozygous and 2 patients were heterozygous for prothrombin 20210G>A with a calculated frequency of 1.7 % and 3.3 % respectively.

In major thromboembolia, DVT and pregnancy complications patient groups, the high prevalence of the factor V Leiden mutation (% 28.15, 41.4, and 21.67) and prothrombin20210G>A (% 8.6, 9, and 5) was determined. On the other hand, the high prevalence of the MTHFR677C>T and MTHFR1298A>C mutations both in normal controls (% 37.3, 37.3, 36.4 and 62.7, 62.7, 63.6) and patients (% 48.89, 50, 51.71 and 62.3, 63.1, 61.67) doesn't support a role of this mutation in Turkey major thrombophilia patients group, DVT patient group and during pregnancy.

1. GİRİŞ

Tromboz kanın damarlar içerisinde patolojik bir şekilde pıhtılaşması durumudur. Batı dünyasındaki hastalık ve ölüm olaylarının en önemli ve yaygın nedenlerinden biri olarak bilinmektedir. Bu nedenle, son yıllarda tromboz patogenezinin aydınlatılması amacı ile yapılan çalışmalar, trombotik hastalıkların önlem ve tedavisi için büyük önem taşımaktadır.

Kanın pıhtılaşma yeteneğinin artması veya trombotik olaylara yatkınlık olarak adlandırılan trombofili, multifaktöriyal bir hastalık durumudur. Aktive protein C dirençliliği “APCR: Activated Protein C Resistance”, faktör V Leiden, antitrombin III, protein C ve protein S yetersizlikleri, protrombin20210G>A, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) mutasyonları, artmış lipoprotein seviyeleri gibi genetik bozukluklar ile hipertansiyon, dislipidemi, şeker hastalığı, hiperhomosisteinemi gibi damar duvarlarında değişiklikler yapan edinsel koşulların tromboz için yaygın risk faktörleri olduğu bilinmektedir.

Kan pıhtılaşmasını düzenleyen proteinlerin genlerinde meydana gelen kusurların, kalp krizi “MI: Myocardial Infarction”, felç, akciğer embolisi, derin ven trombozu “DVT: Deep Vein Thrombosis”, 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 negatif etkilerin azaltılması açısından önem taşımaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, genel kısımlar bölümünde tez konusu olan tromboz patogenezi ve biyokimyası hakkında temel bilgi verildi. Ayrıca, faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları ve tromboz

arasındaki ilişki, literatür bilgilerine dayanarak irdelendi. Tezin malzeme ve yöntem bölümünde, DNA ekstraksiyon yöntemi, bu yöntemde kullanılan tampon ve solüsyonların içerikleri ile hazırlanışları hakkında bilgi verildi. Yine bu bölümde, incelenmesi istenilen gen bölgesinin çoğaltılmasını hedefleyen polimeraz zincir reaksiyonu “PCR: Polymerase Chain Reaction”, incelenen mutasyona özgü restriksiyon enzim analiz (REA) tekniklerinde kullanılan maddeler ile uygulama koşulları, tek zincir konformasyon analizi “SSCA: Single Strand Conformation Analysis” analizi uygulama koşulları, SSCA analizinin sonuçlarına göre uygulanan DNA dizi analizi tekniği ve kullanılan sistemler 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, tez çalışma gruplarındaki bireylerde incelenen mutasyonlara ait genotipler verildi. Kikare testi ve Fischer’s kesin p değeri yöntemleri ile istatistiksel olarak tüm sonuçlar değerlendirildi. 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 tez yazımında yararlanılan literatür bilgileri verildi. Özgeçmiş bölümünde ise tez yazarı ile ilgili bilgiler sunuldu.

Hasta grubu, Düzen Laboratuvarlar Grubu, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'ne tromboemboli ön tanısı ile başvuruda bulunan ve birbirleri ile akrabalık ilişkisi olmayan 270 kişiden oluşturuldu. Hasta grubu'nun 184'ü kadın ve 86'sı erkekten ibaretti. 184 kadın hastanın 60'ının gebelikleri sırasında pıhtı oluşumuna bağlı olduğu düşünülen ölü doğum, tekrarlı düşükler gibi problemler ile karşılaştıkları belirlendi. Verileri diğer hasta popülasyonundan ayrı olarak değerlendirebilmek amacı ile gebelik komplikasyonları grubu adlı alt bir grup oluşturuldu. Ayrıca, 270 kişilik klinik olarak tromboemboli ön tanısı almış hasta grubu içerisinde 46 hasta DVT grubu olarak ele alındı. Frekanslar diğer gruplardan bağımsız olarak değerlendirildi. Genel kontrol ve gebelik komplikasyonları kontrol grupları, birbirleri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan ve kalp damar hastası olmayan bireylerden oluşturulmaya özen gösterildi.

Belirlenen hasta ve kontrol gruplarındaki bireylere ait EDTA'lı kanlardan, NaCl-DNA ekstraksiyonu yöntemi ile DNA eldesi sağlandı. Çalışmada, faktör V Leiden, protrombin20210G>A, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C mutasyonlarının, Türkiye

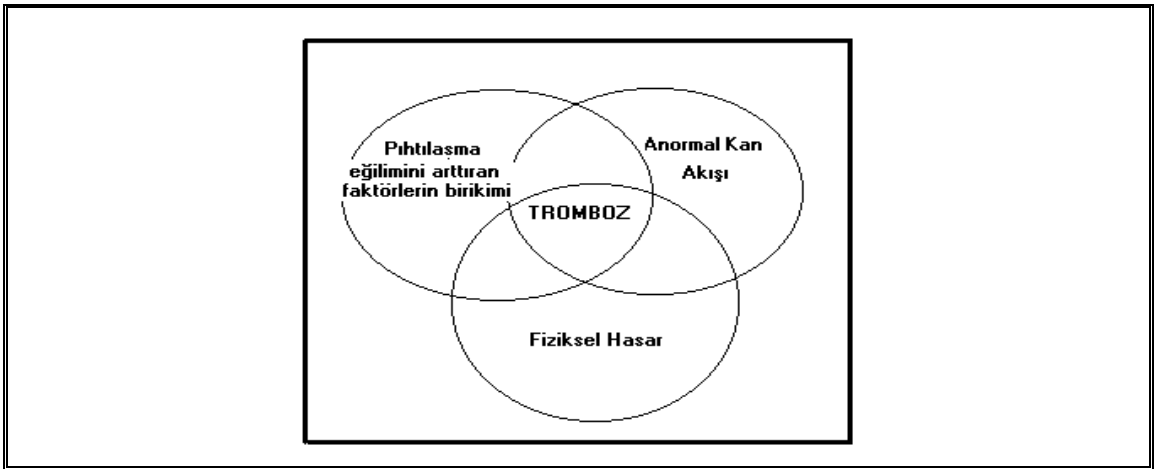
tromboemboli hasta populusyonunda görölme sıklığının belirlenmesi öncelikle amaçlandı. Bu amaç ile, ilgili gen bölgelerindeki varolan mutasyonların moleküler tanısı PCR ve bu işlemi takiben REA teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi. Tanımlanan mutasyonların genel tromboemboli ve belirlenen iki alt grup üzerindeki etkileri araştırıldı.

Hasta grubu içinde, MTHFR gen bölgesi üzerinde meydana gelen MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C mutasyonlarını homozigot mutant/normal, heterozigot mutant ve “compound”(compound heterozigot: bireyin iki allelinde aynı gen bölgesi için farklı mutasyonları heterozigot olarak taşıması durumu olarak tanımlanmaktadır.) heterozigot olarak kalıtan, total homosistein seviyeleri bilinen hasta bireylerde ilgili mutasyonlar için genotip-fenotip ilişkisinin kurulabilmesi hedeflendi.

Faktör V, protrombin ve MTHFR gen bölgeleri üzerinde, günümüze kadar tanımlanmış mutasyonların dışında yeni mutasyon veya varyasyonların varlığını tespit etmek amacı ile SSCA tekniğinden yararlanıldı. SSCA jel bilgilerine göre, normal SSCA modellerinden sapmalar gösteren 8 protrombin20210G>A mutasyonu gen bölgesi PCR ürünü otomatize DNA dizi analizi tekniği ile incelendi.

2. GENEL KISIMLAR

Kan damarları ya da kalp içerisinde kanın elementlerinin anormal bir biçimde pıhtılaşmasına tromboz, oluşan pıhtıya ise trombüs denilmektedir. Trombüsün bağlı olduğu yerden kopup, dolaşımında serbestçe hareket etmesi ise tromboemboli olarak adlandırılmaktadır [1]. Tromboemboli, kan akımı ve basıncının yüksek olduğu arteriyal sistemde ve/veya kan akımının ve basıncının düşük olduğu venöz sistemde meydana gelmektedir. Arteriyal ve venöz tromboz arasında; trombüs içeriğindeki değişiklikler (venöz sistemde fibrince zengin, arteriyal sistemde trombositlerce zengin) ve arteriyal trombozdaki damar hasarının varlığı (aterom) gibi bazı farklar bulunsa da her ikisinin patogeneğinde ortak temel mekanizmaların rol oynadığı bilinmektedir [2]. Bunlar; damar duvarı zedelenmesi, kan akımındaki değişiklikler ve kanın pıhtılaşma yeteneğindeki artış olarak tanımlanmaktadır [Şekil 2.1]. Damar duvarı zedelenmesi, tek başına tromboza yol açan önemli bir nedendir. Damar endotelindeki zedelenme özellikle kalp ve arteriyal sistemlerdeki trombüs oluşumunda önemlidir. Hasara uğramış damar duvarı ile trombositlerin etkileşimi sonucu trombositlerden dışarı verilen büyüme faktörünün, damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyaran güçlü bir mitojen etkisi vardır [1].

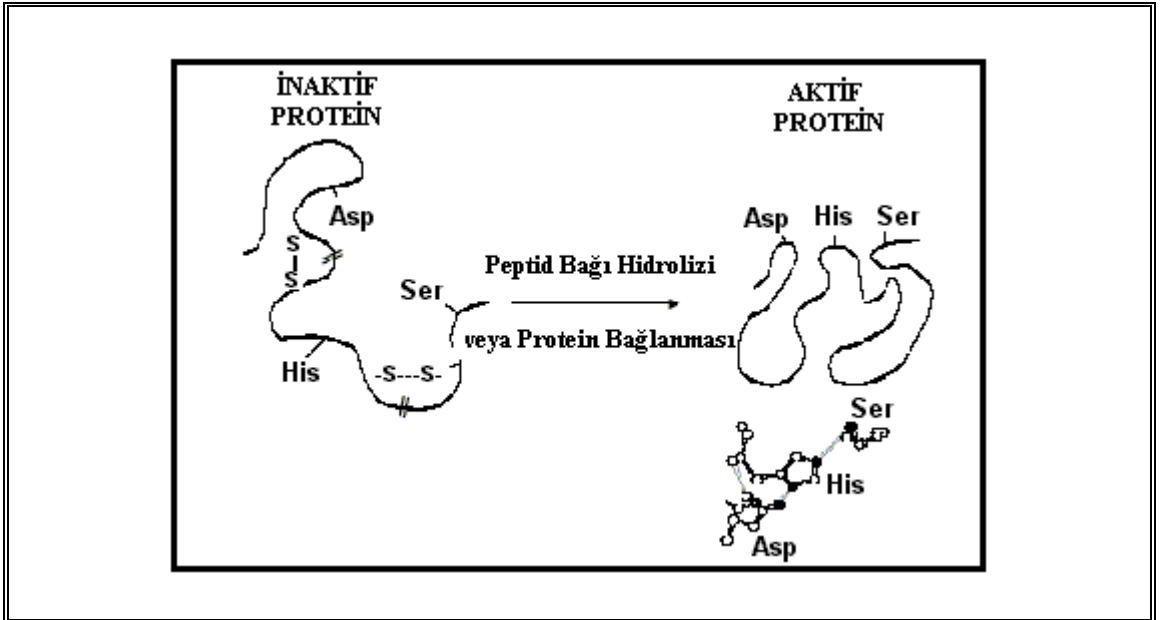


Şekil 2.1 : Virchow triad'ı [3].

Endotelial zedelenme, anormal kan akışı (staz ve türbülans) ve kanın pıhtılaşma yeteneğindeki artış, bağımsız olarak ve/veya birlikte, trombüs oluşumunda rol oynamaktadır [3].

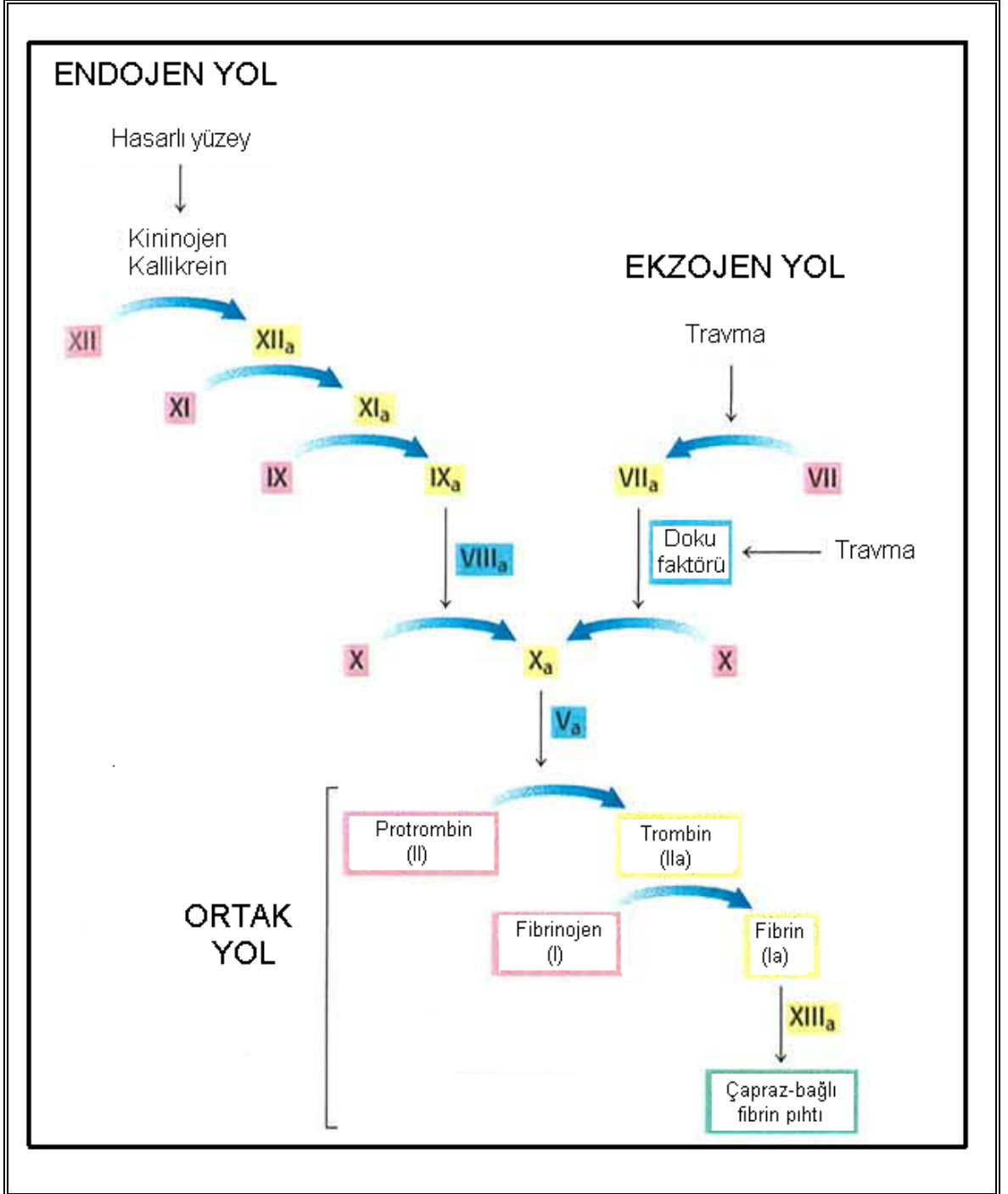
Tromboz olayında, kan akımının yavaşlaması oldukça önemlidir. Staz hallerinin görüldüğü ve kan akımının girdap biçimindeki hareketleri oluşturduğu bölgelerde, kanın laminar akımı bozulmakta ve kan hücreleri aksiyal bölgeden perifere, endotel hücrelerin yanına gelmektedir. Aksiyal akımdan ilk ayrılanlar trombositlerdir. Endotel lezyonu olduğu zaman, trombositler endotel üzerine çökerek yapışmaktadırlar. Trombositleri, lökositler ve eritrositler takip etmektedir. Bir süre sonra trombositler parçalanmakta ve pıhtılaşmayı sağlayan maddeler açığa çıkarak trombus oluşmaktadır. Bu tip tromboz, kan akımının yavaş olduğu venlerde daha sıklıkla görülmektedir [1].

Kan pıhtılaşması, “homeostasis” olarak adlandırılan vücut savunma mekanizmasının önemli bir parçasıdır. Kan pıhtılaşmasına yol açan 3 yol bilinmektedir. Bunlar; endojen yol (faktör VIII, IX, XII, prekallikrein, yüksek molekül ağırlıklı kininojen “HMWK: High Molecular Weight Kininogene”), ekzojen yol (faktör VII, doku faktörü) ve ortak yol (faktör II, V, X ve fibrinojen) dur. Pıhtılaşma olayı, zimojen (inaktif protein) aktivasyonu reaksiyonları serisidir [Şekil 2.2]. Her bir kademedeki zimojen, peptid bağlarının kesilmesi ile aktif proteaza dönüştürülmektedir. Bu kademelerde; proteazlar, zimojenler, kofaktörler, kalsiyum iyonları ve *in vivo* trombositler ile *in vitro* fosfolipit bileşenleri tarafından oluşturulan yüzeyler rol oynamaktadır [Şekil 2.3] [4].



Şekil 2.2 : İnaktif proteinin proteolitik kesim veya başka bir proteinin bağlanması ile aktif hale gelmesi [4].

Hidroliz disülfid (S-S) bağlarını kesmekte ve aktif faktörde His (Histidin), Asp (Aspartat) ve Ser (Serin) bakiyeleri aynı hizaya gelmektedir [4].



Şekil 2.3 : Kan-pıhtılaşma kademeleri [5].

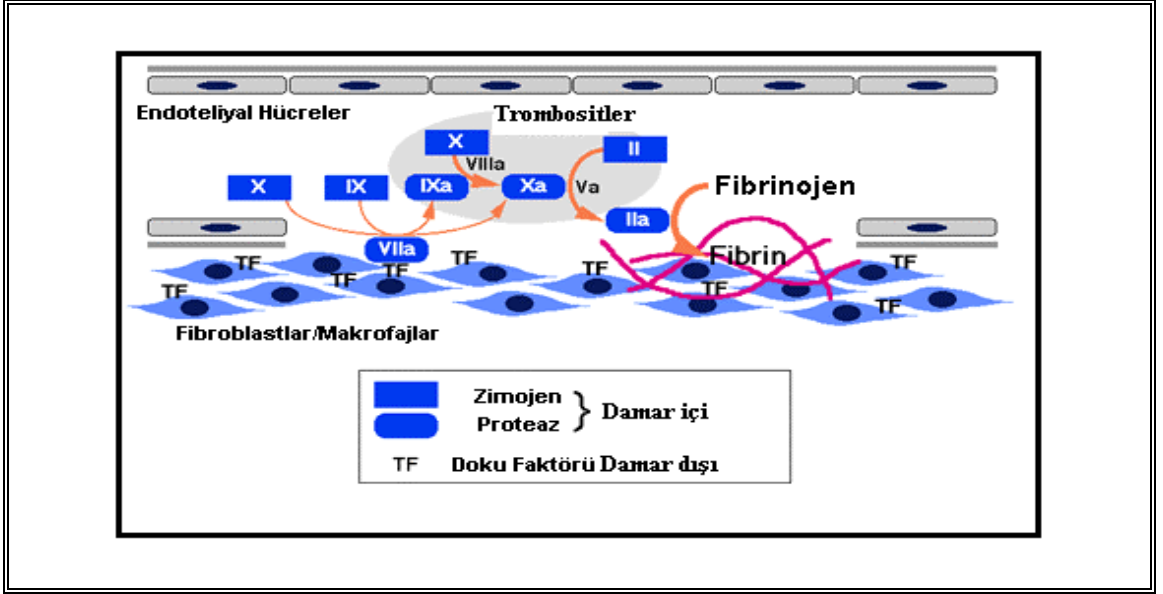
Fibrin pıhtı endojen, ekzojen ve ortak yolda görev alan pıhtılaşma faktörlerinin birlikte iş görmeleri ile şekillenmektedir. Endojen yol, faktör XII (Hageman faktör)'nin hasarlı bir damar yüzeyi ile temasa geçip aktif olması ile başlamaktadır. Ekzojen yol, travma ile tetiklenmektedir, bu durum faktör VII'nin aktif olmasına ve kan damarlarından doku faktörü adı verilen bir lipoprotein salınımına neden olmaktadır. Kan pıhtılaşma kademelerinde, pıhtılaşma faktörlerinin inaktif formları pembe, aktif formları ise sarı ("a" ile belirtilmektedir) renk ile gösterilmektedir. Reaksiyonu teşvik eden enzimler mavi renk ile gösterilmektedir. Bu sürecin en çarpıcı özelliği; bir pıhtılaşma faktörünün aktif formunun bir sonraki pıhtılaşma faktörünün aktivasyonunu katalizlemesidir [5].

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

Tablo 2.1 : Pıhtılaşma faktörleri ve molekül ağırlıkları [4].

FAKTÖR	MOLEKÜLER AĞIRLIK (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
Prekallikrein	82.000
HMWK	108.000

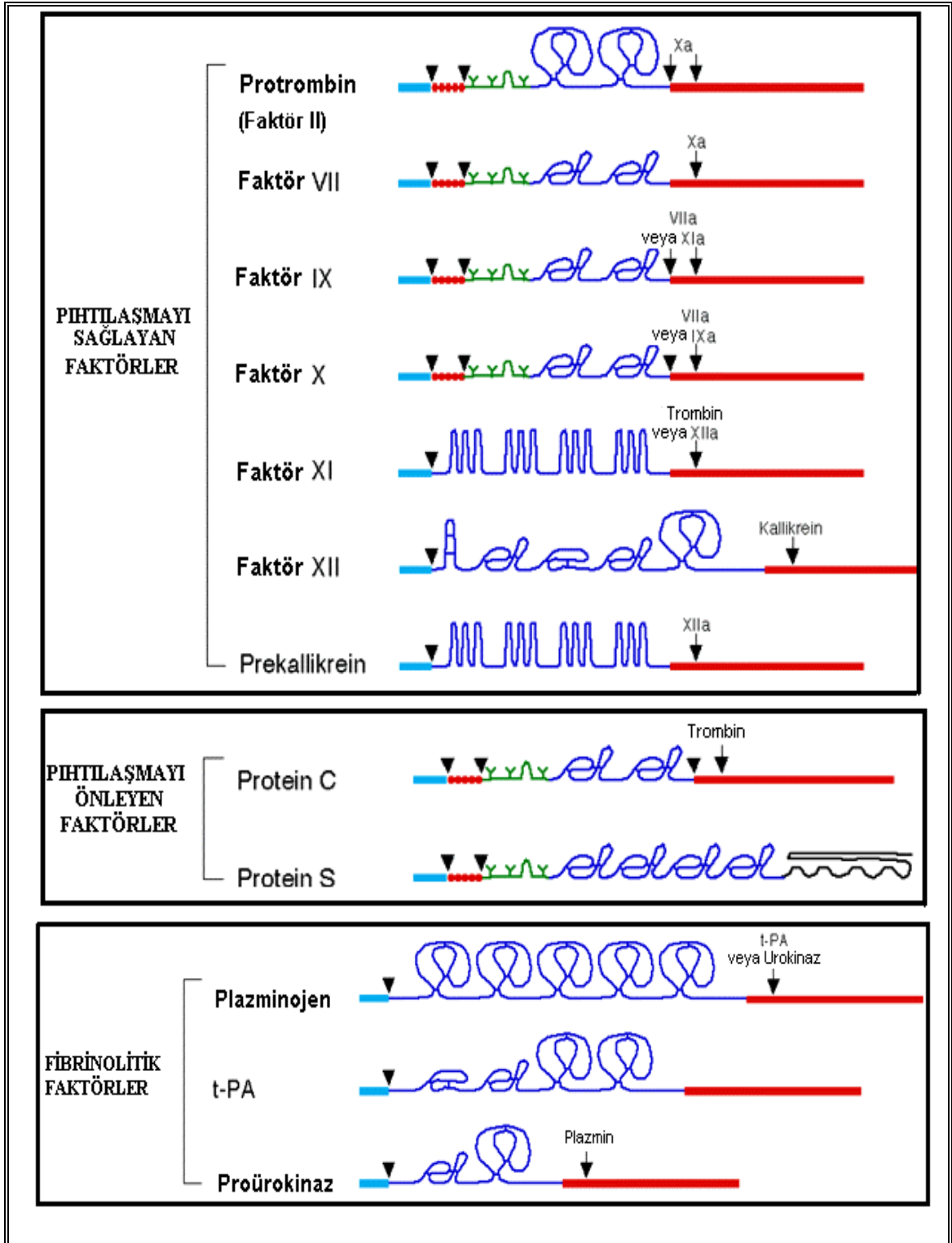
In vitro pıhtılaşma; faktör XII, prekallikrein ve HMWK veya kaolinin cam ya da suni herhangi bir yüzeye bağlanmasıyla endojen yol ile sağlanmaktadır. İlk bağlanma, faktör XII ve prekallikreinin karşılıklı aktivasyonu ile olmaktadır [Şekil 2.3]. Faktör XII; XI, IX, X ve II faktörlerinin sırasıyla aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. Plazmanın doku faktörüne maruz kalması, *in vivo* pıhtılaşmayı başlatmaktadır. Doku faktörü, normalde plazma ile temas halinde olmayan hücrelerin (makrofajlar, fibroblastlar) yüzeyinden salınan enzim olmayan bir lipoproteindir. Plazmanın bu hücrelere maruz kalması, zedelenen kan damarının dışında pıhtılaşmayı başlatmaktadır. Endotelial hücreler de endotoksin, tümör nekroz faktörü, interlökin-1 gibi faktörler ile teşvik edildiklerinde doku faktörü salgılamakta ve patolojik şartlar altında trombüs oluşumuna katılmaktadırlar. Doku faktörü, faktör VIIa'ya bağlanarak, faktör X aktivasyonunu yaklaşık olarak 30.000 kat arttırmaktadır. Faktör VII, doku faktörü ile aktiflenmesine rağmen, doku faktörü ile etkileşmek için, faktör Xa ve az miktarda faktör VIIa plazmada her zaman mevcuttur. Faktör VIIa, aynı zamanda doku faktörü ile birlikte, faktör IX'u da aktifleyerek endojen ve ekzojen yollar arasında bir bağlantı sağlamaktadır [Şekil 2.3, Şekil 2.4]. Faktör IXa ve Xa, onların enzim olmayan protein kofaktörleri (VIIIa ve Va) ile trombositlerin yüzeyinde biraraya gelmektedirler. Bu durum, faktör Xa ve trombin seviyelerinin artmasına yol açmaktadır. En son proteaz trombin, çözünebilir fibrinojen proteinini çözünmeyen fibrin haline dönüştürmekte ve faktör XIIIa, fibrini kovalent çapraz bağlar ile sıkılaştırılmış hale getirmektedir [4].



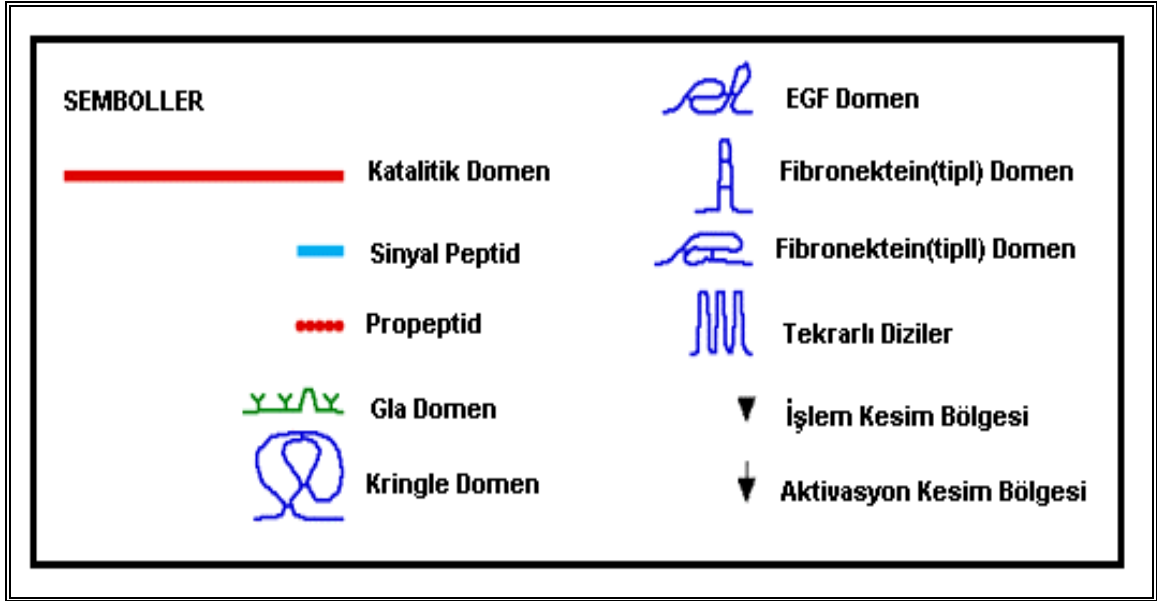
Şekil 2.4 : *In vivo* kan pıhtılaşmasının başlaması [4].

Doku faktör yolu inhibitörü “TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor”, 34 kDa molekül ağırlığında bir protein olup, plazma lipoproteinleri ve damar endoteli ile ilişkilidir. TFPI, faktör Xa’ya bağlanarak onu inhibe eder. Xa-TFPI kompleksi daha sonra faktör VII/doku faktörü ile etkileşime girer. Faktör X ve faktör IX’un aktivasyonunu önler. Endojen yol ile VII/doku faktörü pıhtı oluşumunu sağlayabilir. Faktör IXa ve VIIIa, pıhtı oluşumu için gerekli olan trombini bol miktarda üretebilir. TFPI, VIIa/doku faktörünün endojen yol ile faktör X’un aktivasyonu için yeterli miktarda faktör IXa’yı üretmediği sürece pıhtılaşmayı önleyebilmektedir [4].

Pıhtılaşmaya katılan bazı proteaz zimojenlerin yapısı (protrombin, VII, IX, X, XI, XII ve prekallikrein vb.) Şekil 2.5’te gösterilmektedir. Her bir protein, karaciğerden salınmakta ve bir sinyal peptid taşımaktadır. Bu sinyal, onun endoplazmik retikulum (E.R.)’a taşınımı boyunca ortadan kaldırılmaktadır. Her bir zimojenin karboksil ucunda (C-ucu) bulunan yaklaşık 200 amino asit bakiyesi tripsine benzerdir. Bu bölge Ser, Asp ve His bakiyeli proteazın aktif bölgesini (katalitik domen) içermektedir. Proteinler, epidermal büyüme faktörü “EGF: Epidermal Growth Factor” ve fibronektin gibi diğer proteinlere benzer çeşitli domenler de içermektedir. Bu domenler, proteazlar ve onların substratları, kofaktörleri ve/veya inhibitörleri arasındaki özgün etkileşimleri sağlamaktadır [4].

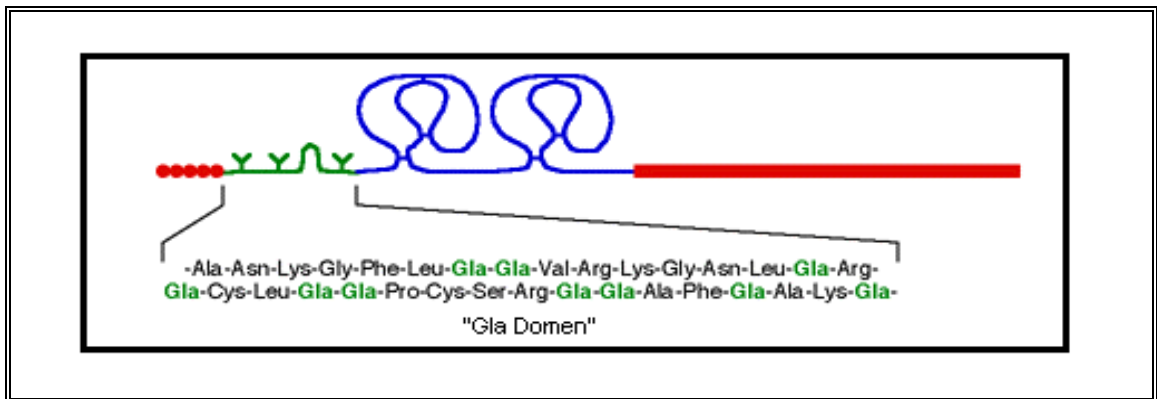


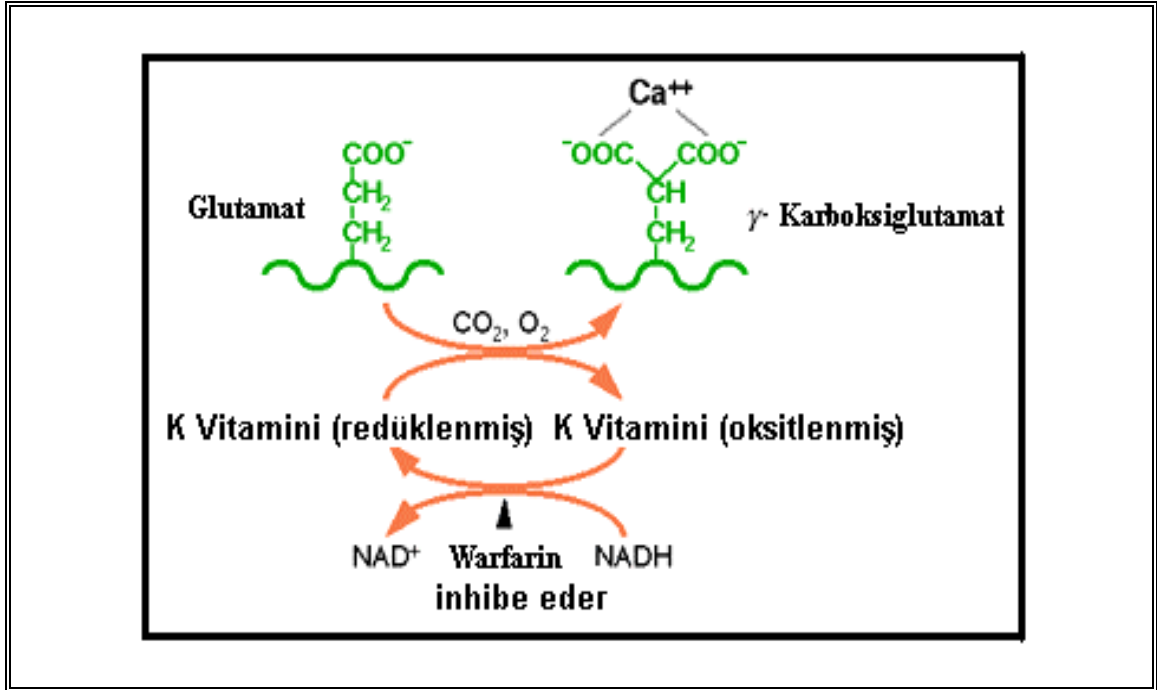
Şekil 2.5 : Pıhtılaşma faktörlerinin yapısının şematik olarak gösterilmesi [4].



(Şekil 2.5'in devamı)

Faktör II, VII, IX ve X'un amino (N-ucu) uçları birbirine benzerdir. Sinyal peptid ortadan kaldırıldıktan sonra, E.R. ve Golgi aygıtındaki bir karboksilaz bu proteinlerin herbirinin propeptid bölgesine bağlanmakta ve γ -karboksiglutamat (Gla) domeninin yakınındaki yaklaşık 10-12 glutamat (Glu) bakiyesini Gla'ya dönüştürmektedir [Şekil 2.6 ve 2.7]. Gla bakiyeleri, kalsiyum iyonlarına bağlanmakta ve bu durum pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu için gerekmektedir. Gla sentezi, K vitaminine gereksinim duymaktadır. K vitamini, γ -karboksilasyonu sırasında, okside olmakta ve siklusun düzenli devam etmesi için tekrar redüklenmesi gerekmektedir [Şekil 2.7]. Warfarin (coumarin) gibi antikoagülant ilaçlar, K vitamini sentezini inhibe etmekte ve aktif faktör II, VII, IX ve X'un sentezini önlemektedir [4].

Şekil 2.6 : Protrombinde (faktörII) γ - karboksiglutamat bakiyesi içeren bölge [4].

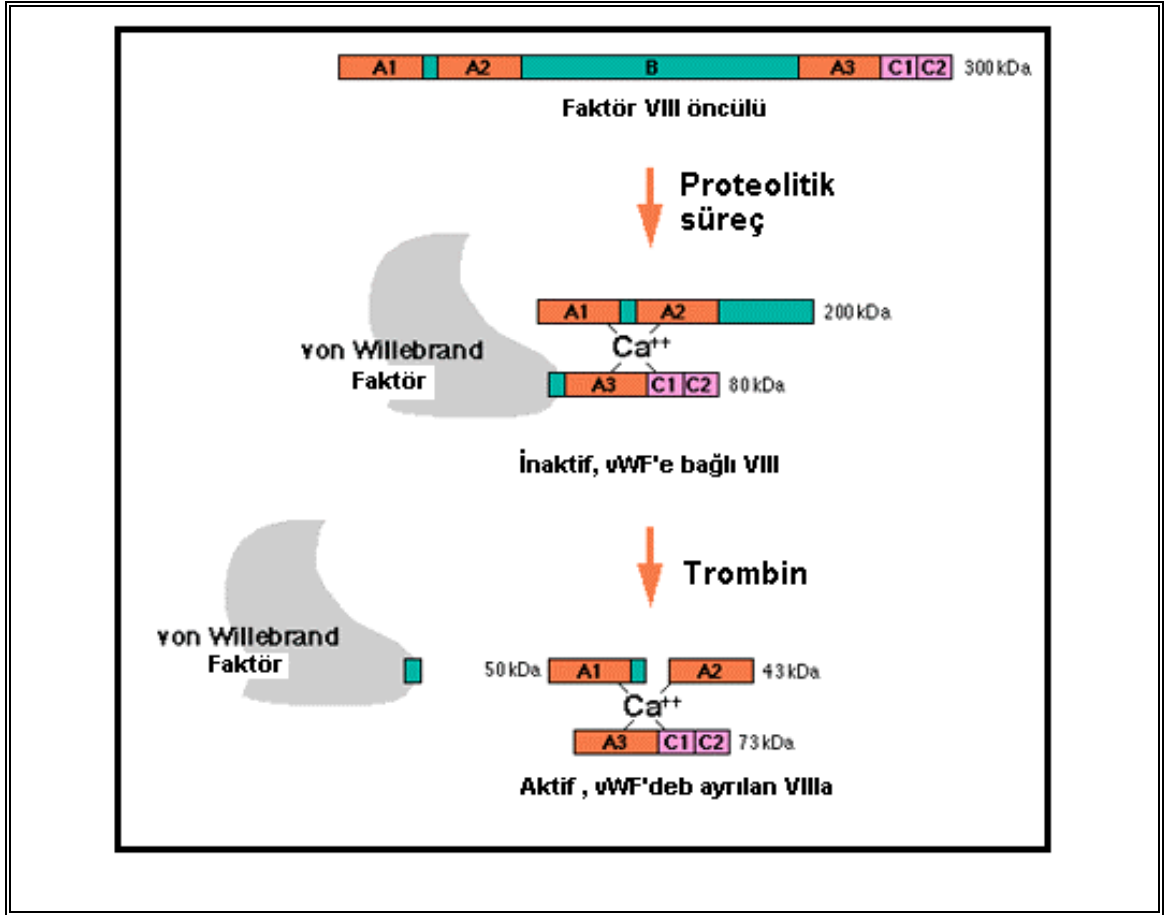


Şekil 2.7 : Protrombin, VII, IX ve X biyosentezinde K vitamininin rolü [4].

Enzim olmayan protein kofaktörler; faktör V, VIII, doku faktörü ve HMWK'dir [Tablo 2.2]. Faktör V ve VIII, bakır bağlayan protein seruloplazmine (Şekil 2.8'te gösterilen A1, A2 ve A3 domeni) benzer tekrarlı dizileri içeren büyük plazma proteinleridir. Trombin, faktör V ve VIII'i öncül formlarına göre 50 kat daha fazla pıhtılaşma aktivitesine sahip olmaları için kesmektedir. Bu faktörler de, faktör Xa ve IXa'nın proteolitik aktivitelerini arttıran kofaktörler olarak iş görmektedirler. Faktör VIII, von Willebrand faktörüne bağlı olarak plazmada sirküle olmaktadır. Von Willebrand faktörü yetersizliği olan bir hastanın plazmadaki faktör VIII konsantrasyonu da yetersiz bulunmaktadır. Doku faktörü, aktive olmuş monositler, çeşitli sitokinlere maruz kalan endotelial hücreler ve diğer hücrelerin yüzeyinden salınan integral bir membran proteinidir. Plazmada bulunmaz. Faktör VIIa'nın proteolitik yeterliliğini arttırmaktadır [Tablo 2.2.] [4].

Tablo 2.2 : Enzimatik olmayan protein kofaktörler [4].

KOFAKTÖR	BULUNDUĞU YER	MOLEKÜLER AĞIRLIK (Da)	AKTİVASYONU	KOFAKTÖR OLDUĞU PLAZMA FAKTÖRÜ
Faktör V	Plazma	300.000	Trombin	Faktör Xa
Faktör VIII	Plazma	300.000	Trombin	Faktör IXa
Doku faktörü	Hücre yüzeyi	40.000		Faktör VIIa
HMWK	Plazma	110.000		Faktör XIIa



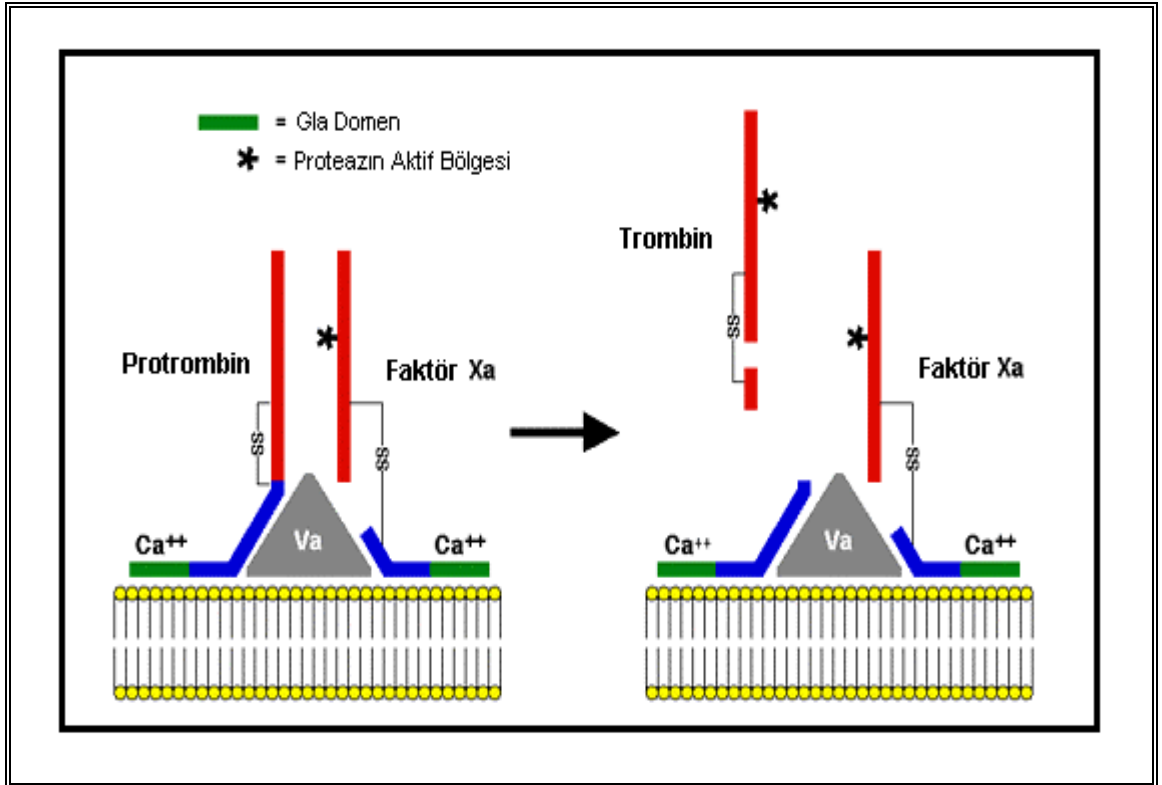
Şekil 2.8 : Trombin tarafından faktör VIII'in aktivasyonu [4].

Faktör Xa, protrombindeki (zimojen) iki peptid bağına keserek, protrombini trombine dönüştürmektedir. Protrombinin Xa tarafından aktivasyonu, faktör Va, trombositler (ya da fosfolipitler) ve kalsiyum iyonları tarafından hızlandırılmaktadır [Tablo 2.3]. Tüm sistem, protrombini tek başına Xa ve Ca⁺²'un yaptığından 300.000 kat daha fazla aktive etmektedir. Fosfolipit ve faktör Va, protrombin aktivasyonunu bağımsız olarak hızlandırmaktadır [Tablo 2.3]. Hızlı aktivasyon, sadece protrombin ve Xa'da değil, Gla bakiyelerinde de meydana gelmekte ve Ca⁺² bağlamaktadır. Kalsiyum bağlanması, bu faktörlerin *in vivo* trombositler, *in vitro* fosfolipitler tarafından oluşturulan membran yüzeyine bağlanmasını sağlamak amacı ile bu faktörlerin Gla domenlerinin konformasyonunda değişikliklere neden olmaktadır. "Protrombinaz" kompleksinin bileşenleri arasındaki etkileşimler Şekil 2.9'da gösterilmektedir. "Homeostasis" in meydana geldiği bölgede biriken trombositlerin, protrombin aktivasyonu için yüzey oluşturduğu bilinmektedir. Faktör IXa ve kofaktörü VIIIa tarafından X aktivasyonu, protrombin aktivasyonuna benzer bir mekanizma ortaya koymaktadır [4].

Tablo 2.3 : Faktör V ve trombositler tarafından protrombin aktivasyonunun hızlandırılması [4].

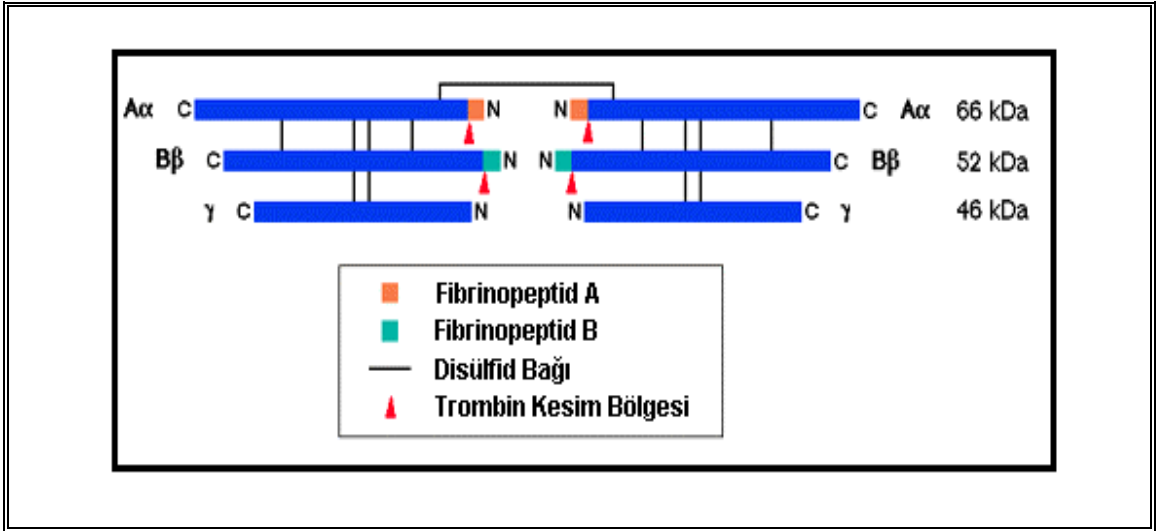
UNSURLAR	TROMBİN MİKTARI	ZAMAN
Protrombin, Xa, Ca ⁺²	1	35 gün
Protrombin, Xa, PL, Ca ⁺²	50	17 saat
Protrombin, Xa, Va, Ca ⁺²	350	2.4 saat
Protrombin*, Xa*, Va, PL, Ca ⁺²	<1000	>50 dakika
Protrombin, Xa, Va, PL, Ca ⁺²	19.000	2.5 dakika
Protrombin, Xa, Va, trombositler, Ca ⁺²	300.000	10 saniye

Protrombin* ve Xa*: K vitamini yokluğunda sentez edilen protrombin ve Xa'nın Gla'sız formlarıdır. Gla varlığında daha kısa zamanda daha bol miktarda trombin elde edilmektedir[4].

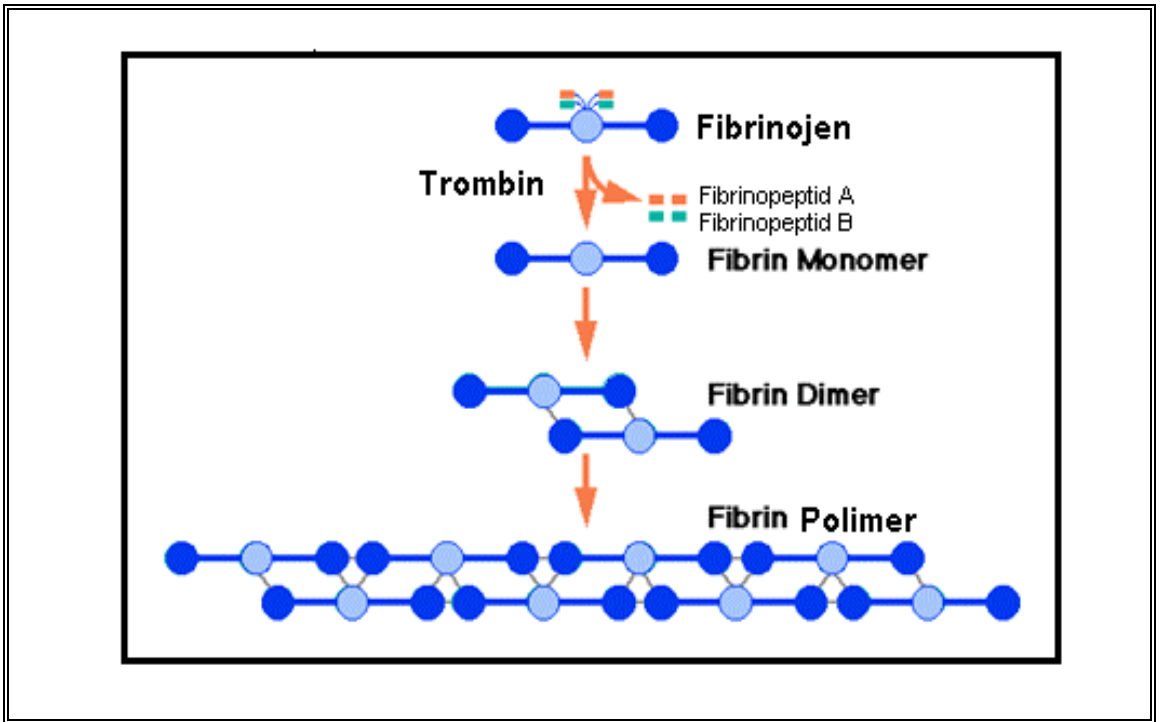


Şekil 2.9 : Protrombin aktivasyon kompleksi [4].

Fibrinojen, 330.000 Da molekül ağırlığında bir protein olup, disülfid bağları ile 3 tane polipeptid zincirinin kovalent olarak bağlanmasından ibarettir [Şekil 2.10]. Trombin, A α ve B β zincirlerinin N- ucundan A (16 amino asit bakiyesi) ve B (14 amino asit bakiyesi) fibrinopeptidlerini keserek, fibrinojeni fibrine dönüştürmektedir. Fibrinopeptidlerin ortadan kaldırılması ile fibrin monomerlerinden uzun polimerleri içeren jel şekillenmektedir [Şekil 2.11] [4].

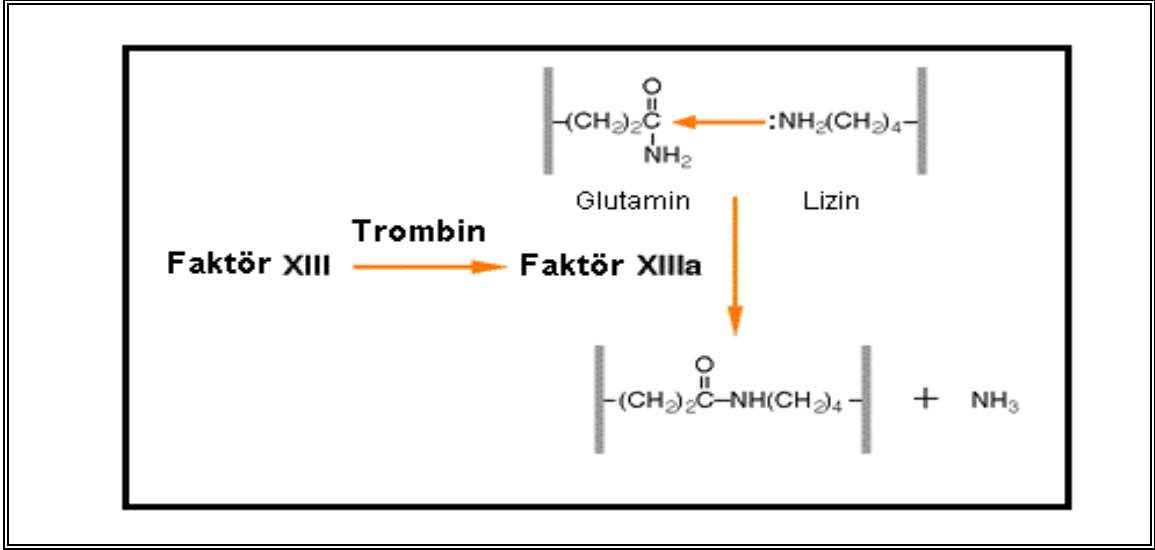


Şekil 2.10 : Fibrinojen proteininin yapısı [4].



Şekil 2.11 : Fibrin molekülünün polimerizasyonu [4]

Faktör XIIIa tarafından fibrin polimerlerinin kovalent çapraz bağlanması, *in vivo* yaranın iyileşmesi ve sıkı pıhtı oluşumu için gereklidir. Faktör XIII'ün zimojen formu, trombin tarafından [Şekil 2.12] XIIIa'ya dönüştürülmektedir. XIIIa, bitişik fibrin monomerlerinde, γ -zincirinin C- ucuna çapraz bağlanmayı başlatan transglutaminasyon reaksiyonunu katalizlemektedir.



Şekil 2.12 : Faktör XIIIa'nın transglutaminasyon aktivitesi [4].

Kanın pıhtılaşma yeteneğinin artması veya trombotik olaylara yatkınlık olarak adlandırılan trombofili, multifaktöriyel bir hastalıktır [6]. Trombofili, tek başına ve/veya arterosklerotik damar hastalıkları ile birlikte, kalp krizi, felç, akciğer embolisi ve DVT altında yatan en önemli nedenlerdendir [7, 8]. Son on yıl içinde, kan pıhtılaşmasını düzenleyen proteinlerin genlerinde meydana gelen kusurların, genç erişkinlerdeki venöz trombotik olaylar, tekrarlı düşük, ölü doğum ve diğer gebelik komplikasyonları için risk faktörü olduğu bilinmektedir [1, 9]. Ayrıca kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların temelinde, arteriyel trombotik olayların yer aldığı yapılan çeşitli çalışmalar ile gösterilmektedir. Birden fazla doğumsal risk faktörü ya da bir doğumsal risk faktörü ile edinsel bir faktörün birlikte bulunma durumu tromboz riskini arttırmaktadır [6]. Venöz tromboz için doğum kontrol hapı kullanımı/hormon tedavisi, ameliyat ve travma, uzun süreli hareketsizlik (uzun süreli yatak istirahati, felç durumu veya yolculuk), yaş, kanser, venöz tromboz hikayesi [10]; arteriyel trombotik hastalıklar için doğumsal kalp bozuklukları, damarsal anormallikler, damar hasarları, enfeksiyon hastalıkları ve nadiren doğumsal metabolik fonksiyon yetersizlikleri edinsel risk faktörleri olarak sayılmaktadır [11].

APCR, faktör V Leiden, antitrombin III, protein C ve protein S yetersizlikleri, protrombin20210G>A mutasyonları ve artmış lipoprotein seviyeleri gibi doğumsal trombofilik etkenlerin rolünün hem yetişkinler hem de çocuklarda, venöz tromboz için yaygın risk faktörleri olduğu bilinmektedir [12]. Bununla birlikte, çocuk yaşlardaki

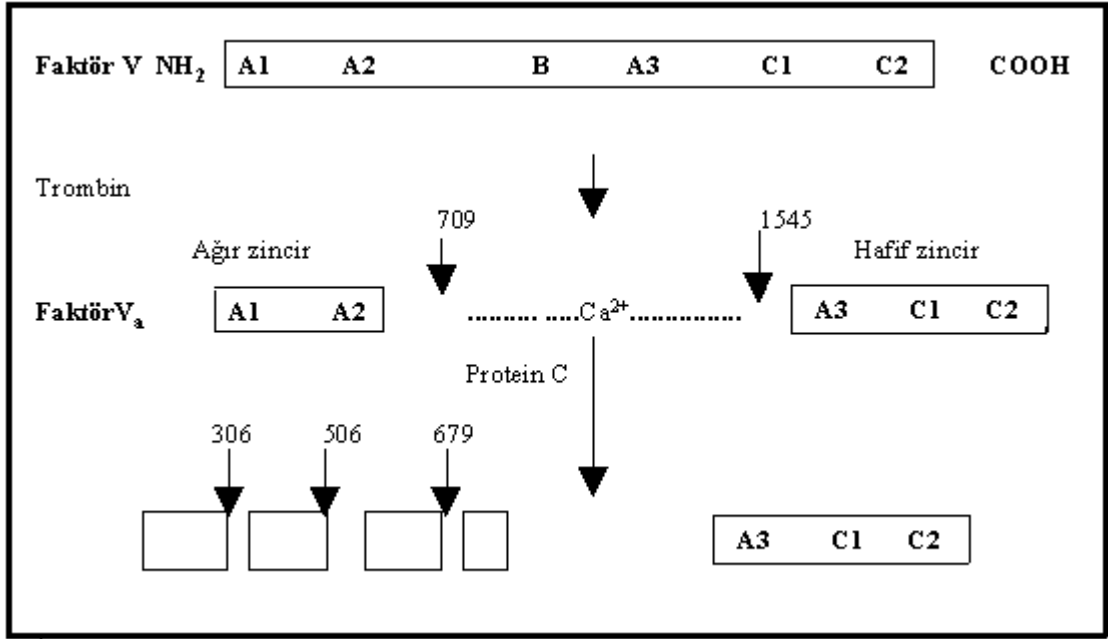
felçli hastalarda “homeostatic” kusurların belirlenmesi ile ilgili bilgi sınırlı bulunmaktadır [13]. Hipertansiyon, dislipidemi, şeker hastalığı ve hiperhomosisteinemi gibi damar duvarlarında değişiklikler yapan koşulların tromboz üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [14]. Ancak son yıllarda yapılan çalışmaların ışığında, faktör V Leiden, protrombin20210G>A ve MTHFR mutasyonlarının arteriyal trombotik hastalıklar için risk faktörleri oldukları ortaya konulmaktadır [15].

2.1. FAKTÖR V GEN MUTASYONLARI VE AKTİVE PROTEİN C DİRENÇLİLİĞİ

Faktör V geni, 1. kromozomun 1q23 bölgesinde yer almaktadır [9]. Bu gen bölgesi yaklaşık 80 kilobaz (kb) çifti uzunluğunda olup 25 ekson ve 24 introndan oluşmaktadır [16].

Faktör V proteini (MA. 300 kDa) karaciğer, dalak ve böbreklerde sentezlenir. Plazmada da bulunur. Faktör V, trombin tarafından faktör V_a'ya aktiflenince faktör X_a ve protrombin ile kompleks oluşturmaktadır. Faktör V, kan pıhtılaşma sistemindeki en önemli proteinlerinden biridir [17]. Aktive protein C (APC)'nin kofaktörü olup, APC ile birlikte faktör V_{IIIa}'yı inaktive etmektedir [18].

APC, faktör V_a ve faktör V_{IIIa}'yı inaktive ederek, kanın pıhtılaşmasını düzenleyen serin proteaz enzimidir. APC, faktör V_a proteinini 679, 506 ve 306'daki arginin bölgelerinden keserek inaktive etmektedir [19]. Faktör V geninin 10. eksonunun 1691. nükleotidindeki guanin bazının adenine dönüşmesiyle; faktör V polipeptidinin 506. pozisyonundaki arginin glisin amino asitine değişmekte, böylece 506'daki kesim engellenmiş olmaktadır. Mutant faktör V, 306'dan kesilmesiyle inaktive olabilmekte, fakat bu durum yaklaşık 10 kat daha yavaş gerçekleşmektedir [Şekil 2.13]. Böylece faktör V molekülü, proteolitik inaktivasyona dirençli olmakta ve trombin seviyesinde yükselmeye sebebiyet vermektedir. Bu duruma aktive protein C dirençliliği denilmektedir [20].



Şekil 2.13 : Faktör V'in trombin ile aktivasyonu ve APC ile inaktivasyonu [21].

A, B ve C faktör V polipeptidinin domenleridir. Trombin, inaktif faktör V proteinini B domeninden keserek aktiflerken, APC bu domenleri Ca^{2+} ile birbirine yaklaştırarak inaktive etmektedir [21].

APCR'ye neden olan faktör V Leiden mutasyonu olarak adlandırılan bu mutasyon, otozomal dominant olarak kalıtım göstermektedir [22]. Bu nedenle, trombofili için yüksek risk grubunu oluşturan bireylerin taranması oldukça önem taşımaktadır. Faktör V Leiden mutasyonunun tromboz riskini heterozigot taşıyıcılarda yaklaşık olarak 8 [23], homozigot mutant bireylerde ise 80 kat [24] arttırdığı bildirilmektedir. APCR'nin normal bireylerdeki insidansı % 3-5, venöz tromboz öyküsü olan hastalarda yaklaşık olarak % 20 civarında olduğu bilinmektedir [25, 26].

Protrombin ve faktör V Leiden mutasyonlarını heterozigot olarak taşıyan bir bireyde, tromboz riskinin yaklaşık olarak 20 [27], bu mutasyonları taşıyan bir kadında hamilelik sırasındaki riskin ise 100 kez [28] arttığı bildirilmektedir. Ayrıca faktör V Leiden gibi kalıtsal trombofilik bozuklukları olan kadınlarda, bir yıl süreli doğum kontrol hapı kullanımının tromboz riskinin çok fazla yükselmesine neden olduğu ileri sürülmektedir [29]. Çok sayıdaki çalışmada, kadınlarda hormon tedavisinin venöz tromboemboli (VTE) riskini 2-4 [30] ve bu tedavinin APCR ile birleştiği durumlarda 13 [31], faktör V Leiden mutasyonunu heterozigot olarak taşıyanlar ile birlikte bulunduğu durumlarda ise VTE riskini 15 kez yükselttiği [32] bildirilmektedir.

Ayrıca, hamilelik sırasında meydana gelen bazı sorunlar (preeklampsi, düşükler, tromboz vb.) ile faktör V Leiden mutasyonunun ilişkili olduğu düşünülmektedir [33]. Normal kadınlardaki % 4.2'lik düşük oranına karşın, faktör V Leiden mutasyonunu taşıyanlarda bu oranın % 11'e yükseldiği bildirilmektedir [34]. Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda faktör V Leiden mutasyonunun hamilelikteki hipertansiyon ile ilgili olmadığı ileri sürülmektedir. [34, 35].

Faktör V gen bölgesi üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda, bu gen bölgesi üzerinde Leiden mutasyonu dışında başka mutasyonlar da belirlenmiştir. Faktör V geni üzerinde günümüze kadar belli başlı 5 mutasyon adlandırılmıştır. Bunlar, faktör V Leiden, Hong-Kong, Cambridge, 4 baz çifti (bç) delesyon ve 4 bç insersiyon mutasyonlarıdır. Chan ve diğ. (1998) faktör V geninin 7. eksonunun 1090. pozisyonunda bulunan nükleotidindeki adenin bazının guanin bazına dönüşmesiyle, faktör V polipeptidinin 306. pozisyonundaki arginin amino asidinin glisin amino asidine değiştiğini belirlediler. Bu mutasyonu faktör V Hong-Kong mutasyonu olarak adlandırdılar [36]. Faktör V Cambridge mutasyonu ise, 306. pozisyonundaki kodonda arginin amino asidinin (AGG) tirozin amino asidine (ACG) değişimini içermekte ve bu durum APCR'ye neden olmaktadır [37]. Guasch ve diğ. (1998) faktör V geninin 13. eksonunda 4 baz çiftlik bir delesyon olduğunu tespit ettiler. Bu mutasyon çerçeve kayması tipinde bir mutasyona neden olarak, 1303. pozisyonundaki kodonda durdurucu bir kodon oluşturmakta ve bu noktadan sonra protein sentezi durduğu için, faktör V molekülünün hafif zinciri tamamen ve B domeninin bir kısmı oluşmamaktadır [38]. Zehnder ve diğ. (1999), faktör V gen bölgesinin 25 eksonunu DNA dizi analizi tekniği ile incelerken, faktör V geninin 13. eksonunda 2856. pozisyonundaki nükleotidinde 4 baz çiftlik bir insersiyon tespit ettiler. Bu mutasyon çerçeve kayması mutasyonu oluşturarak, trombin aktivasyon bölgesinin kaybına neden olmaktadır [39].

Faktör V geni üzerindeki mutasyonlar, REA, SSCA ve Allele Özgü Oligonükleotid "ASO: Allele Spesific Oligonucleotide" polimeraz zincir reaksiyonu gibi farklı teknikler kullanılarak incelenmektedir.

Faktör V geni üzerindeki mutasyonları adlandırmak için en çok uygulanan yöntem REA'dır. Tek bir baz çiftinin değişimi ile oluşan bu mutasyon 4-6 bç.lik restriksiyon enzim bölgesinin ortadan kalkmasına neden olmaktadır. Faktör V geni üzerindeki Leiden mutasyonu *MnlI* restriksiyon enzimi kullanılarak incelenmektedir [8, 40].

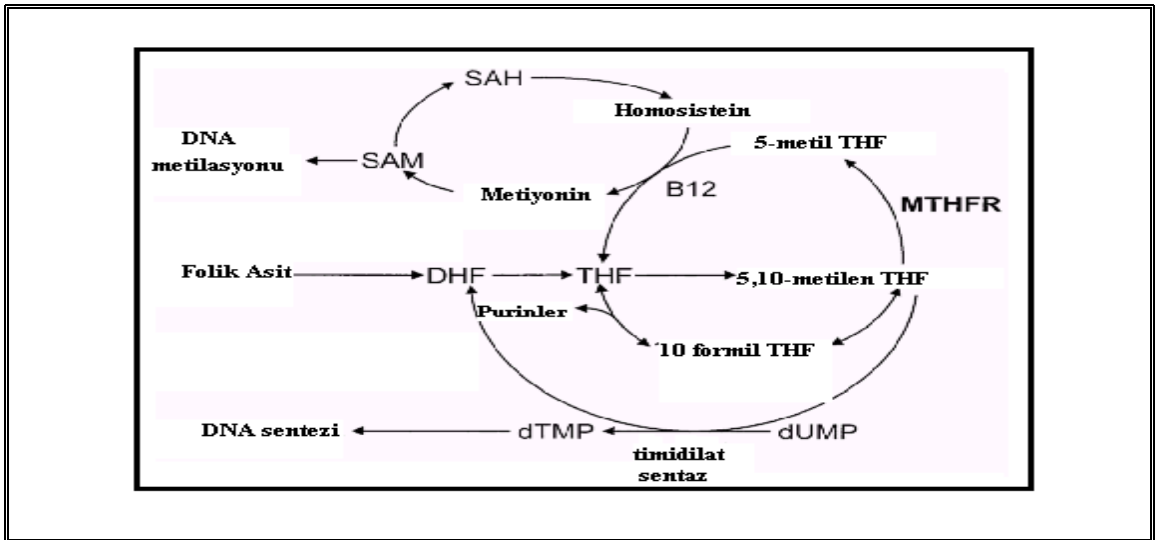
Bilinmeyen mutasyonların adlandırılması için en çok kullanılan yöntemlerden biri SSCA'dır. Teknik, birbirinin tamamlayıcısı olan tek zincirli DNA moleküllerinin denatüre olmayan jel koşullarında, farklı yürüme hızları ile ayırt edilmeleri prensibine dayanmaktadır. Herhangi bir mutasyon olduğu zaman, yürümede sapmalar olmaktadır. Normal modelin dışında görülen bantlar için, daha sonra DNA dizi analizi yapılmakta ve yürüme farkına neden olan DNA değişikliği görüntülenip isimlendirilmektedir. SSCA tekniği, insan genindeki polimorfizmlerin belirlenmesi amacı ile 1989 yılından beri kullanılmaktadır [41]. Bu yöntemde, normal ve mutant modeli birbirinden ayırt edebilmek için, jel ve elektroforez koşullarının çok iyi optimize edilmesi gerekmektedir. Elektroforez bittikten sonra, jel gümüş boyama tekniği ile boyanmakta ve tek zincirlere ait bant modelleri görünür hale getirilmektedir. SSCA tekniği faktör V gen bölgesi üzerinde bulunan bilinmeyen mutasyonları tanımlamak amacı ile kullanılmaktadır [42].

Faktör V gen bölgesi üzerindeki mutasyonları tanımlamak amacı ile kullanılan bir diğer teknik ASO-PCR'dur. Herhangi bir restriksiyon enzim kesim bölgesi değişimine neden olmayan, nokta mutasyonlarının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin temeli, mutasyonun bulunduğu bölgeye özgü ya da allele özgü primer kullanımına dayanmaktadır. Ayrıca, amplifikasyonun kontrolü için hem normal hem de mutasyonlu bireylerde bant veren bir kontrol bölgeye ait bir çift primer kullanılmaktadır. İncelenen örnek mutasyonu taşıyor ise hem kontrol bölge hem de mutasyona özgü bölgede PCR ürünü oluşmakta ve jel elektroforezi ile varlığı kolaylıkla saptanabilmektedir. İncelenen örnek mutasyonu taşıyor ise sadece kontrol bölgede PCR ürünü oluşmaktadır [43].

2.2. METİLENTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GEN MUTASYONLARI VE HİPERHOMOSİSTEİNEMİ

MTHFR geni 1. kromozomun 1p36.3 bölgesinde yer almaktadır. cDNA dizisi 2.2 kb uzunluğunda olup 11 eksondan oluşmaktadır. Bu genin ana ürünü, 77 kDa ağırlığındadır. Ancak bazı dokularda 70 kDa ağırlığında izoformları gözlenmektedir [44].

Homosistein, metiyoninden metabolize olan sülfür içeren 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 homosisteinin yeniden metilasyonu, betain-homosistein metil transferaz aracılığıyla gerçekleşmektedir. Beslenme ile alınan metiyonin, metiyonin siklusunda metil transferaz ile, metil grubu vericisi olarak iş gören S-adenozil metiyonin (SAM)'e dönüşmektedir. Bu reaksiyonda oluşan diğer bir ürün, S-adenozil homosistein hidrolaz tarafından, homosistein ve adenezine hidrolizlenen S-adenozil homosistein (SAH)'dir [Şekil 2.14]. Homosistein, katabolik transsülfürasyon yoluna da girmektedir. Bu yoldaki ilk enzim, B6 vitaminine bağımlı sistatyonin β -sentaz (CBS)'dir. Sistatyonin, B6 vitaminine bağımlı sistatyonaz aracılığıyla sisteine dönüşmektedir [45].



Şekil 2.14 :Homosistein metabolizması [46].

Homosistesin metabolizmasında folik asit, MTHFR, S-adenozil metiyonin (SAM), S-adenozil homosistein (SAH), dihidrotetrafolik asit (DHF) ve tetrahidrofolik asit (THF)'in işlevlerinin gösterilmesi [46].

Total plazma homosistein (tHcy) seviyesindeki artış, arteriyal ve venöz tromboz için önemli bir risk faktörüdür. VitaminoB12 ve folat, homosistein metabolizmasındaki gerekli kofaktörlerdir. Bu vitaminlerin eksikliğinde, homosistein seviyesindeki artış sonucu hiperhomosisteinemi meydana gelmektedir. Homosistein metabolizmasında görev alan ve yüksek homosistein seviyesi ile koroner arter hastalıklarının ortaya çıkışında artışa neden olan birkaç tane genetik polimorfizm vardır. Bunların içinde en iyi tanımlananlar, MTHFR geninde belirlenen mutasyonlardır. MTHFR geni üzerinde belli başlı iki mutasyonu bulunmaktadır. Bunlar; MTHFR677C>T ve 1298A>C nokta mutasyonlarıdır [44].

MTHFR677C>T mutasyonu, MTHFR geninin üzerinde 677. nükleotidindeki sitozin (C) bazının timin (T) bazına transisyonudur. Mutasyon, MTHFR'nin katalitik domenindeki, alanin aminoasidinin valin aminoasidine dönüşümüne neden olmaktadır [47]. Bu nokta mutasyonu, homozigot ve heterozigot mutantlarda MTHFR enziminin aktivitesini, sırası ile, % 70 ve % 35 olmak üzere azaltmaktadır. MTHFR677C>T mutasyonunun moleküler genetiği 1997 yılında aydınlatıldı. Kodlanan protein, 37 °C ve daha yüksek sıcaklıklarda daha düşük enzimatik aktiviteye sahip olduğu için, bu mutasyon termolabil mutasyon olarak da adlandırılmaktadır. MTHFR 677C>T homozigot mutant bireylerden alınan örnekler, 37 °C'de % 50-60 daha düşük aktivite gösterirken 46°C'de enzim aktivitesi yaklaşık olarak % 65 azalmaktadır [48].

MTHFR gen bölgesi üzerinde MTHFR677C>T mutasyonunun meydana gelmesi sonucunda, plazma homosistein seviyesinde artış gözlenmekte ve çeşitli klinik tablolar oluşmaktadır. Homosistein, günümüzde kardiyovasküler, serebrovasküler ve periferel vasküler hastalıklar için doza bağımlı bir tarzda etkili olan diğer risk faktörlerinden (sigara, şişmanlık vs.) bağımsız majör bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir [48]. Homosistein, arterlerdeki düz kas hücrelerinde DNA sentezini artırarak, arterosklerotik hastalıkların meydana gelmesinde rol oynamaktadır [49]. Yüksek plazma homosistein seviyelerinin, DVT için risk faktörü olduğu bildirilmektedir [50]. Kadınlarda, hiperhomosisteineminin nöral tüp kusurlu çocukların doğumuna ve tekrarlı düşüklere yol açtığı bildirilmektedir [51]. Bununla birlikte, yapılan son çalışmalarda MTHFR'nin sadece homozigot olduğu durumlarda ve diğer trombofilik risk faktörleri varlığında düşüklere neden olduğu ileri sürülmektedir [52].

MTHFR1298A>C mutasyonu MTHFR geninin 7. eksonundaki bir nokta mutasyonu olup, genin 1298. nükleotidindeki adenin bazının sitozin bazına transversiyonudur. Bu mutasyon, MTHFR enziminin regülatör domenindeki glutamin amino asidinin alanin amino asidine değişimine neden olmaktadır [53]. MTHFR1298A>C ve MTHFR677C>T (1298A>C/677C>T) genotipi olan “compound” heterozigotlarda *in vitro* enzim aktivitesinin yaklaşık olarak % 50 azaldığı ve olayın biyokimyasal profilinin artan homosistein seviyesi ile azalan folat seviyelerine neden olan homozigot MTHFR677C>T mutasyonuna benzediği gösterildi [54].

MTHFR geni üzerindeki polimorfizmleri belirlemek amacı ile, uygulanan en yaygın yöntem REA'dır. Yöntemde, MTHFR genindeki ilgili gen bölgelerinin PCR'ını takiben, MTHFR677C>T ve MTHFR1298A>C gen bölgesi PCR ürünleri sırasıyla, *HinfI* ve *MboII* restriksiyon enzimleri ile kesime uğratılmakta ve kesim ürünleri poliakrilamid jel elektroforez ile analiz edilmektedirler [55, 56].

2.3. PROTROMBİN GEN MUTASYONLARI

Protrombin geni, 11. kromozomun 11p11.2-11p11.12 bölgesinde yer almaktadır. Gen bölgesi yaklaşık 21 kb uzunluğunda olup, 14 ekson ve kodlama yapan bölgeleri birbirinden ayıran 13 introndan oluşmaktadır. Genin yaklaşık % 90'ı intronlardan ibarettir [57]. Protrombin (MA.72 kDa), karaciğerde sentezlenen tek zincirli bir glikoproteindir. Protrombinin, amino terminal bölgesi 10 adet karboksi-glutamat amino asit bakiyesi taşımaktadır. Serin bağımlı aktif proteaz kısmı ise molekülün karboksi terminal bölgesinde yer almaktadır. Protrombin, trombosit yüzeyinden salınan aktif iki zincirli trombin molekülünü meydana getirmek üzere trombosit membranında V_a ve X_a faktörlerinden oluşan komplekse bağlanarak, faktör X_a tarafından iki konumda proteolitik kesimden geçmektedir. Trombinin A ve B zincirleri, bir disülfid köprüsü ile bir arada tutulmaktadır [5].

Protrombin geninin, VTE hikayesi olan ailelerde venöz tromboz için aday gen olduğu düşünülmeye başlanmasından itibaren yapılan çok sayıdaki çalışmalar sonucunda Poort ve diğ. protrombin20210G>A mutasyonunu buldular [58].

Protrombin20210G>A mutasyonu, protrombin geninin translasyonu yapılmayan 3' ucundaki 20210. nükleotindeki guanin bazının adenin bazına transisyonu olarak adlandırılmaktadır [59]. Avrupa'da protrombin20210G>A mutasyonunun dağılımı yaklaşık olarak % 2'dir. En yüksek dağılım % 3'lük sıklık oranı ile Güney Avrupa'dadır. En düşük dağılım bölgesi ise kıtanın kuzey kısımlarıdır. Amerika'da sıklık oranı, ırklara bağlı olarak % 1-2 arasında değişmektedir. Bu mutasyon, Afrikalı Amerikalılar ve yerli Amerikalılar'da nadiren görülmektedir [60]. Protrombin20210G>A mutasyonun etkileri, ilk olarak homozigot normal (G20210G) genotipi olan kişilere göre, heterozigot mutant (G20210A) genotipi olanların plazma protrombin seviyesinin yüksek olduğunun belirlenmesi ile aydınlatıldı [61]. Son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında, protrombin20210G>A mutasyonunun, gen ürününün 3' ucunda işlenmede artış ve 3' ucu kesim sinyalinin tanımlanmasında artışa neden olduğu belirlendi. Bu durum protrombin için, mRNA'nın birikmesi ve protein sentezinin artması ile sonuçlanmaktadır [62].

Butenas ve diğ. (1999), artan plazma protrombin seviyelerinin VTE etkili olduğunu ileri sürdüler [63]. Protrombin20210G>A mutasyonu ve VTE arasındaki ilişki çok sayıdaki çalışma ile gösterildi [64]. Poort ve diğ. (1996) tarafından 20210A allelinin VTE riskini 3 kat ve bunu takiben diğer çalışmalarda bu riskin 2-12 kat arttırdığı saptandı [65]. Bununla birlikte, homozigot mutant protrombin20210G>A allelinin VTE ile ilişkisi bilinmesine rağmen, homozigot mutant protein S, C ve faktör V Leiden mutasyonları kadar yaygın bir risk faktörü olmadığı ifade edilmektedir [66]. Bazı çalışmalarda, protrombin20210G>A allelinin faktör V Leiden ve/veya homozigot mutant MTHFR677C>T mutasyonları ile birlikte olduğu durumlarda, tromboz riskinin arttığı gözlemlendi [67]. Kadınlarda VTE meydana gelme riski, doğum kontrol hapı kullanımı, hamilelik, protrombin20210G>A ve faktör V Leiden mutasyonlarının birlikte bulunduğu durumlarda artış göstermektedir [68]. Martinelli ve diğ. (1998) yaptıkları bir çalışmada, VTE riskinin doğum kontrol hapı kullanmayan ve protrombin20210G>A mutasyonunu taşımayan kadınlarda 16.3, doğum kontrol hapı kullanan ve mutasyonu taşıyan kadınlarda ise 149 kat arttığını belirttiler [69].

Protrombin gen bölgesi üzerindeki protrombin20210G>A mutasyonu, guanin bazının adenin bazına dönüşümüne neden olmaktadır [59]. Bu tek nükleotidlik değişim, *HindIII* restriksiyon enzimi için kesim bölgesi oluşturmaktadır. Kesim sonrasında elektroforez yapılan örneklerde, mutant allelin normal allele göre moleköl ağırlığı daha küçük bir bant verdiği görölmektedir [58]. Çoklu PCR yöntemi ile protrombin ve faktör V Leiden mutasyonları aynı anda belirlenebilmektedir. Bu teknikte, her iki mutasyon bölgesine özgü primer çiftleri ve diğer PCR bileşenleri, aynı PCR tüpüne konularak, aynı anda PCR yapılmaktadır. Bu işlemi takiben PCR ürünlerine SSCA analizi uygulanmaktadır [70].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBU

Hasta grubu, Düzen Laboratuvarlar Grubu, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'ne tromboemboli ön tanısı ile başvuruda bulunan ve birbirleri ile akrabalık ilişkisi olmayan, 184 kadın, 86 erkek, toplam 270 kişiden oluşturuldu. 60 kadın hastada, gebelik döneminde, pıhtı oluşumuna bağlı olduğu düşünülen, ölü doğum, tekrarlı düşük hikayesi vardı. Verileri genel hasta popülasyonundan ayrı olarak değerlendirebilmek amacı ile bu grup "gebelik komplikasyonları grubu" adı altında toplandı. Ayrıca, klinik olarak tromboemboli ön tanısı almış 270 kişiden 46'sının doppler ultrasonografi, venografi vb. teknikler ile venöz tromboz geçirdikleri tespit edildiği bildirildi. Bu bireyler de "DVT grubu" olarak ele alınarak frekanslar diğer gruplardan bağımsız olarak değerlendirildi. Kontrol grubu, birbirleri ile akrabalık ilişkisi olmayan ve tromboz hikayesi bulunmayan bireylerden seçildi. Genel kontrol grubu 67 kişiden, gebelik komplikasyonları kontrol grubu ise gebelik sürecini problemsiz tamamlamış 33 kadından oluşturdu. Ayrıca çalışma gruplarına katılan tüm bireylerden DNA materyalleri üzerinde yapılacak araştırma çalışmalarına izin verdiklerine dair yazılı onay alınarak çalışmanın etik kurallara ve Sağlık Bakanlığı yönetmeliklerine uygun olmasına özen gösterilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada bireylerden 5 ml'lik K₃EDTA'lı tüplere alınan kan materyalleri kullanıldı. EDTA'lı kanlardan NaCl yöntemi uygulanarak, DNA izolasyonları yapıldı [71].

Steril 50 ml'lik tüpte, 5 ml EDTA'lı kan ve 15 ml soğuk eritrosit parçalama tamponu (pH 8.3) [Tablo 3.1] iyice karıştırıldı. 15 dakika 4 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüp, 4 °C 5000 devirde (rpm) 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak çökelti 5 ml eritrosit parçalama tamponu ile süspanse edildi.

Süspansiyon 4 °C 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı. Çökelti 1.5 ml hücre çekirdeği parçalama tamponu (pH 8.0) [Tablo 3.1] eklenerek iyice karıştırıldı. Karıştırıldıktan sonrası tüpe 200 µl steril distile su, 15 µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 25 µl % 10 sodyum dodesil sülfat (SDS) (w/v) ilave edilerek 56 °C'lik etüvde 3 saat veya 37 °C'lik etüvde bütün gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, karışıma 2.5 ml steril destile su ve 2.5 ml 5M NaCl eklenerek iyice karıştırıldı. Tüp 25 °C'de 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı yeni 50 ml'lik tüpe aktarıldı. Proteinleri içeren çözelti ise atıldı. DNA'yı içeren üst sıvıya 2 hacim saf etil alkol eklenerek DNA'nın iplikçik halinde çökmesi sağlandı. Çöken DNA mikropipet ucu ile steril 1.5 ml'lik eppendorf tüpe transfer edildi. Tüpteki alkolün uçması beklendikten sonra, DNA yaklaşık 300 µl Tris-EDTA tamponunda (pH 8.0) [Tablo 3.1] çözdürüldü.

Tablo 3.1 : NaCl yöntemi ile genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar.

TAMPON/SOLÜSYON ADI	İÇERİK	SON KONSANTRASYON
Eritrosit Parçalama Tamponu (pH 8.3)	NH ₄ Cl	155 mM
	KHCO ₃	10 mM
	Na ₂ EDTA	0.1 mM
Hücre Çekirdeği Parçalama Tamponu (pH 8.0)	Tris-HCl	10 mM
	Na ₂ EDTA	2 mM
	NaCl	400 mM
%10 SDS	Sodyum Dodesil Sülfat	% 0.14 (w/v)
Tris-EDTA Tamponu (TEB) (pH 8.0)	Tris-HCl	10 mM
	Na ₂ EDTA	0.1 mM

3.2.2. DNA'nın Kalitatif Tayini

DNA'nın kalitatif miktar tayini, % 1 (w/v)'lik agaroz jel [Tablo 3.2] ısıtıcılı magnetik karıştırıcıda kaynatılarak hazırlandı. Tampon sıcaklığının yaklaşık 50-55 °C'ye kadar soğuması beklendi. DNA'nın UV ışığı altında görülebilmesi için 1.25 µl etidyum bromür (EtBr) (10 mg/ml) eklenerek, elektroforez kasedine döküldü. Kaset soğukta

bekletildi. Yaklaşık 20-30 dakika sonra donan jel, içinde 0.5XTEB tampon bulunan elektroforez tankına alındı. DNA'ların 1 µl'si 9 µl 1X elektroforez yükleme tamponu [Tablo 3.2] ile karıştırılarak, 10 µl olacak şekilde jel kuyucuklarına yükleme yapıldı.

Jel, 150 voltta (V) 20 dakika yürütüldü. İncelenen DNA ile kontrol DNA UV ışık altında karşılaştırılarak kalitatif DNA miktarı belirlendi.

Tablo 3.2 : Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon ve solüsyonu.

TAMPON/SOLÜSYON ADI	İÇERİK	SON KONSANTRASYON
5X TEB Tamponu (pH 8.0)	Trizma baz	445 mM
	Borik asit	445 mM
	Na ₂ EDTA	10 mM
Elektroforez Yükleme Solüsyonu	Bromofenol mavisi	2.5 mg/ml
	% 10 SDS	% 1 (w/v)
	Gliserol	% 87 (v/v)

3.2.3. DNA'nın Kantitatif Miktar Tayini

İzole edilen genomik DNA'nın kantitatif miktarı tayini, spektrofotometrik ölçümlerle yapıldı. Tris-EDTA tamponu ile 1/50 oranında seyreltilen örneklerin, UV-spektrofotometresinde 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakılarak, çift zincirli DNA molekülünün konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı [72].

$$\text{DNA Konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Seyreltme oranı} \quad (\text{Denklem 3.1})$$

DNA molekülünün saflığı; 260 nm dalga boyunda okunan absorbans değerinin, 280 nm dalga boyunda okunan absorbans değerine oranı belirlenerek kontrol edildi [73].

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışmada, faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarını belirlemek amacı ile uygun oligonükleotid çiftleri kullanılarak PCR'ları yapıldı.

3.2.4.1. PCR Bileşenleri

Çalışmada PCR koşulları literatür bilgilerinden modifikasyonlar ile gerçekleştirildi [kaynak]. Her bir mutasyon için temelde uygulanacak PCR koşulları, Tablo 3.3 [74], Tablo 3.4 [75], Tablo 3.5 [76] ve Tablo 3.6 [77]'da verilmektedir.

Tablo 3.3 : Faktör V Leiden mutasyonunun belirlenmesi amacı ile uygulanan PCR koşulları.

PCR BİLEŞENLERİ	µl/TÜP	SON KONSANTRASYON
Steril bidestile H ₂ O	17.1	-
10 X Tampon	3.0	1.2 X
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	1.5 mM
dNTP karışımı (25 mM)	0.2	0.2 mM
Primer1 990 (10pmol/ µl)	1.0	10 pmol
Primer2 6967 (10pmol/ µl)	1.0	10 pmol
Taq polimeraz (5U/ µl)	0.2	1 U
DNA (150 ng/ µl)	1.0	150 ng
Toplam hacim	25.0	

Tablo 3.4: MTHFR677C>T mutasyonunun belirlenmesi amacı ile uygulanan PCR koşulları.

PCR BİLEŞENLERİ	µl/TÜP	SON KONSANTRASYON
Steril bidestile H ₂ O	18.7	-
10 X Tampon	2.5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	1.5 mM
dNTP karışımı (25 mM)	0.2	0.2 mM
Primer1MTHFR-1 (10pmol/ µl)	0.5	5 pmol
Primer2 MTHFR-2 (10pmol/ µl)	0.5	5 pmol
Taq polimeraz (5U/ µl)	0.1	0.5 U
DNA (150 ng/ µl)	1.0	150 ng
Toplam hacim	25.0	

Tablo 3.5: MTHFR1298A>C mutasyonunun belirlenmesi amacı ile uygulanan PCR koşulları.

PCR BİLEŞENLERİ	µl/TÜP	SON KONSANTRASYON
Steril bidestile H ₂ O	18.7	-
10 X Tampon	2.5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	1.5 mM
dNTP karışımı (25 mM)	0.2	0.2 mM
Primer1 1298-F (10pmol/ µl)	0.5	5 pmol
Primer2 1298-R (10pmol/ µl)	0.5	5 pmol
Taq polimeraz (5U/ µl)	0.1	0.5 U
DNA (150 ng/ µl)	1.0	150 ng
Toplam hacim	25.0	

Tablo 3.6: Protrombin20210G>A mutasyonunun belirlenmesi amacı ile uygulanan PCR koşulları.

PCR BİLEŞENLERİ	µl/TÜP	SON KONSANTRASYON
Steril bidestile H ₂ O	18.7	-
10 X Tampon	2.5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	1.5 mM
dNTP karışımı (25 mM)	0.2	0.2 mM
Primer1PT20210-F (10pmol/ µl)	0.5	5 pmol
Primer2PT20210-R (10pmol/ µl)	0.5	5 pmol
Taq polimeraz (5U/ µl)	0.1	0.5 U
DNA (150 ng/ µl)	1.0	150 ng
Toplam hacim	25.0	

3.2.4.2.Primerler

Bu çalışmada, faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarını belirlemek için yapılan PCR'larda, hedef gen bölgelerine özgün olarak kullanılan oligonükleotidlerin isimleri ve dizileri Tablo 3.7'de verilmektedir [74, 75, 76, 77]. Bu çalışmada kullanılan primerler, literatür bilgilerinden elde edilip ticari olarak primer sentezi yapan ELİPS firmasından temin edildi.

Tablo 3.7 : Primer isimleri ve baz dizileri.

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ	ÇOĞALTILAN GEN BÖLGESİ (BÇ)	PRİMERİN BAZ SAYISI
6967	TGC CCA GTG CTT AAC AAG ACC A	267	20
990	TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA	267	22
MTHFR-1	TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA	198	23
MTHFR-2	AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG	198	20
1298-R	CACTTTGTGACCATTCCGGTTT G	163	23
1298-F	CTTTGGGGAGCTGAAGGACTAC TAC	163	25
PT20210-F	TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC	345	20
PT20210-R	ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C	345	22

3.2.4.3.DNA Polimeraz Enzimi ve Tamponu

PCR sırasında, termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan izole edilen Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldı. Bu enzim, çok yüksek ısılarla dayanmakla birlikte, yaklaşık 70-75 °C sıcaklık ve pH 9.0' da ve DNA'nın 5' ucundan 3' ucuna doğru polimeraz aktivitesi göstermektedir. Bu çalışmada, kullanılan Taq DNA polimeraz enzimleri 5U/ μ l'dir (PROMEGA, Wisconsin, USA ve MBI, USA). PCR tamponu olarak ise MgCl₂ içermeyen 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) ve % 1 TritonX-100 içeren 10X tampon kullanıldı.

3.2.4.4.PCR Programları

Tablo 3.8, Tablo 3.9'da faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarını belirlemek amacı ile yapılan PCR'larda, mutasyon bölgesine özgün PCR programları gösterilmektedir. Bu programlar literatür bilgilerinden küçük değişiklikler ile belirlendi [74, 75, 76, 77] .

Tablo 3.8 : Faktör V Leiden, MTHFR677C>T ve protrombin20210G>A mutasyonlarının belirlenmesinde uygulanan PCR programı.

PROGRAM TÜRÜ	DERECE	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
İlk denatürasyon	94	2'	-
Denatürasyon	91	20''	30
Bağlanma	56	30''	
Uzatma	68	45''	
Son uzatma	72	3'	-
Bekleme	15	F/e	-

Tablo 3.9 : MTHFR1298A>C mutasyonunun belirlenmesi için uygulanan PCR programı.

PROGRAM TÜRÜ	DERECE	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
İlk denatürasyon	92	2'	-
Denatürasyon	92	60''	35
Bağlanma	51	60''	
Uzatma	72	60''	
Son uzatma	72	7'	-
Bekleme	15	F/e	-

': Dakika, '': Saniye, F/e: Süresiz.

3.2.5. DNA Analiz Yöntemleri

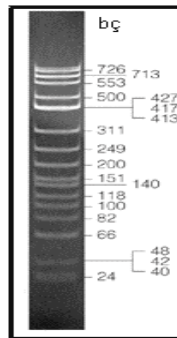
3.2.5.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

% 30 (29:1) ve % 30 (19:1) stok poliakrilamid jelleri ısıtıcı manyetik karıştırıcıda hazırlandı. % 30 (29:1) stoktan % 8 (29:1) jel dilüsyonu yapıldı. Hazırlanan jel, % 10 APS ve TEMED ilavesi ile jel kasetine döküldü. Polimerizasyon için 10-15 dakika beklenip jel, elektroforez tankına yerleştirildi. PCR'ların işlediğini belirlemek amacı ile 5 µl PCR ürünü ve 2 µl elektroforez yükleme solüsyonu [Tablo 3.10] karıştırıldı. Hazırlanan karışım, içerisinde 1XTEB tampon bulunan elektroforez tankındaki % 8 (29:1)'lik poliakrilamid jele [Tablo 3.2] yüklenip 150 V'ta 25-30 dakika analiz edildi.

Tablo 3.10 : % 8 (29:1) Poliakrilamid jel solüsyonunun hazırlanması.

İÇERİK	MİKTAR
% 30 (29:1) Stok Poliakrilamid Jel Solüsyonu (29 gr akrilamid ve 1 gr bis-akrilamid)	2.7 ml
Distile su	5.2 ml
% 10 APS (Amonyum peroksidisülfat)	100 µl
5XTEB Tamponu	2.0 ml
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametil Etilen Diamin)	8.5 µl
Toplam Hacim	10 ml

Faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları gen bölgelerinin PCR ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforez analizi yapılırken DNA bant büyüklükleri bilinen ticari Φ HinfI-DNA (PROMEGA, Wisconsin, USA) markırını kullanıldı [Şekil 3.1].



Şekil 3.1 : PROMEGA firmasına ait Φ HinfI-DNA markırının % 8'lik poliakrilamid jeldeki görünümü.

DNA bantlarının belirlenmesi amacı ile yapılan poliakrilamid jeller, elektroforezin bitimini takiben gümüş boyama tekniği uygulanarak boyandı. Gümüş boyama tekniğinde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri aşağıdaki Tablo 3.11’de verilmektedir [78].

Tablo 3.11 : Gümüş boyama tekniğinde kullanılacak solüsyonlar ve içerikleri.

SOLÜSYON ADI	İÇERİK
Fiksasyon Solüsyonu	% 10 (v/v) Etil alkol % 0.5 (v/v) Asetik asit
Boyama Solüsyonu	% 0.1 (w/v) Gümüş nitrat
Geliştirme Solüsyonu	% 1.5 (w/v) NaOH % 0.01 (w/v) NaBH ₄ % 0.4 (v/v) Formaldehit
Durdurma Solüsyonu	% 0.75 (w/v) NaCO ₃
Gliserol Solüsyonu	% 5 (v/v) Gliserol

3.2.5.2. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

Faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A gen mutasyonları restriksiyon enzim analizi ile incelendi. Faktör V gen bölgesi üzerinde yer alan faktör V Leiden mutasyonunu belirlemek amacı ile ticari olarak *Moraxella nonliquefaciens*'den klonlanan MnlI genini taşıyan *E.coli* suşundan elde edilen *MnlI* (New England Biolabs, USA) restriksiyon enzimi kullanıldı. MTHFR gen bölgesinde yer alan MTHFR677C>T mutasyonunu belirlemek için kullanılan *HinfI* (MBI, USA) ve protrombin gen bölgesi üzerinde bulunan protrombin20210G>A mutasyonunu belirlemek için kullanılan *HindIII* (MBI, USA) restriksiyon enzimleri, sırası ile, ticari olarak *Haemophilus influenzae*'den klonlanan *HinfI* ve *HindIII* genini taşıyan *E.coli* suşundan üretilmektedir. MTHFR gen bölgesinde bulunan MTHFR1298A>C mutasyonu ise *MboII* (MBI, USA) restriksiyon enzimi ile incelenmekte ve bu enzim ticari olarak *Moraxella bovis*'den klonlanan *MboII* genini taşıyan bir *E.coli* suşundan elde edilmektedir [79]. Yukarıda adı geçen dört mutasyonun belirlenmesi amacı ile uygulanan enzim kesim yöntemleri ve kullanılan restriksiyon enzimleri Tablo 3.11, Tablo 3.12., Tablo 3.13 ve Tablo 3.14’te verilmektedir.

Tablo 3.12 : Faktör V Leiden mutasyonunun belirlenmesi için uygulanan enzim kesim yöntemi .

İÇERİK	MİKTAR
PCR ürünü	8.0 µl/tüp
Mnl I (5U/µL, New England Biolabs, USA) 5'...CCTC (N) ₇ ▼. 3' 3'...GGAG (N) ₆ ▲...5'	0.4 µl (2 saat/37°C)
10X Tampon (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ pH 8.4)	1.0 µl
Distile su	0.6 µl
Toplam hacim	10.0 µl

Tablo 3.13 : MTHFR677C>T mutasyonunun belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi yöntemi.

İÇERİK	MİKTAR
PCR ürünü	8.0 µl/tüp
Hinf I (10U/µl, MBI, USA) 5'...G ▼ANT C...3' 3'...C TNA ▲G..5'	0.5 µl (2 saat/37°C)
10X Tampon (100 mM KCl, 10Mm Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ pH 8.5)	1.0 µl
Distile su	0.5 µl
Toplam hacim	10.0 µl

Tablo 3.14 : MTHFR1298A>C mutasyonunun belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi yöntemi.

İÇERİK	MİKTAR
PCR ürünü	8.5 µl/tüp
MboII(10U/µl, MBI, USA) 5'.....GAAGA(N) ₈▲3' 3'.....CTTCT (N) ₇ ...▲.5'	0.5 µl (2 saat/37°C)
10X Tampon (100 mM KCl, 10Mm Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ pH 8.5)	1.0 µl
Toplam hacim	10.0 µl

Tablo 3.15 : Protrombin20120G>A mutasyonunun belirlenmesi için uygulanan enzim kesimi yöntemi.

İÇERİK	MİKTAR
PCR ürünü	8.0 µl/tüp
HindIII (10U/µl, MBI, USA) 5'... A▼AGCTT...3' 3'...TTCGA▲A...5'	0.5 µl (2 saat/37°C)
10X Tampon (100 mM KCl, 10Mm Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ pH 8.5)	1.0 µl
Distile su	0.5 µl
Toplam hacim	10.0 µl

Çalışmada kullanılan poliakrilamit jellerin konsantrasyonu ve yürütme koşulları, analizler esnasında çeşitli denemeler sonucunda belirlendi. Faktör V Leiden ve MTHFR677C>T mutasyonları gen bölgelerine ait PCR ve REA ürünleri % 12 (29:1)'lik; MTHFR1298A>C mutasyonu gen bölgesi PCR ve REA ürünleri % 12 (19:1) ve protrombin20210G>A mutasyonu gen bölgesi PCR ve REA ürünleri ise % 6 (19:1)'lık poliakrilamit jellerde analiz edildi. Faktör V Leiden ve MTHFR677C>T gen mutasyonlarının yer aldığı gen bölgesine ait PCR ile REA ürünleri 150V'da 60 dakika analiz edildi. MTHFR1298A>C mutasyonunun yer aldığı gen bölgesine ait PCR ile REA ürünleri ise 180 V'da 30 dakika elektroforez edildi. Protrombin20210G>A mutasyonunun bulunduğu gen bölgesine ait PCR ile REA ürünleri 150V'da 45 dakika elektroforez edildi. Stok poliakriamit jellerin ve dilüsyonlarının hazırlanışı Tablo 3.16, Tablo 3.17 ve Tablo 3.18'de verilmektedir.

Tablo 3.16 : % 6 (19:1) Poliakrilamit jel solüsyonunun hazırlanması.

İÇERİK	MİKTAR
% 30 (19:1) Stok Poliakrilamit Jel Solüsyonu (28.5 gr akrilamit ve 1.5 gr bis-akrilamit)	2 ml
Distile su	5.9 ml
% 10 APS (Amonyum peroksidisülfat)	100 µl
5XTEB	2 ml
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametil Etilen Diamin)	8.5 µl
Toplam Hacim	10 ml

Tablo 3.17 : % 12 (29:1) Poliakrilamid jel solüsyonunun hazırlanması.

İÇERİK	MİKTAR
% 30 (29:1) Stok Poliakrilamid Jel Solüsyonu (29 gr akrilamid ve 1gr bis-akrilamid)	2 ml
Distile su	1.9 ml
% 10 APS (Amonyum peroksidisülfat)	100 µl
5XTEB	1 ml
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametil Etilen Diamin)	8.5 µl
Toplam Hacim	5 ml

Tablo 3.18 : % 12 (19:1) Poliakrilamid jel solüsyonunun hazırlanması.

İÇERİK	MİKTAR
% 30 (19:1) Stok Poliakrilamid Jel Solüsyonu (28.5 gr akrilamid ve 1.5gr bis-akrilamid)	2 ml
Distile su	1.9 ml
% 10 APS (Amonyum peroksidisülfat)	100 µl
5XTEB	1 ml
TEMED (N,N,N,N'-Tetrametil Etilen Diamin)	8.5 µl
Toplam Hacim	5 ml

İncelenen 4 mutasyonun gen bölgelerine ait PCR ve REA ürünleri PROMEGA firmasından temin edilen ΦHinfI-DNA markırı ile birlikte analiz edildi. Elektroforez sonrası tüm jeller gümüş nitrat boyama ile boyandı.

3.2.5.3. *Tek Zincir Konformasyon Analizi* “*Single Strand Conformation Analysis-SSCA*” SSCA, analiz edilecek PCR ürünlerinin denatürasyonu ile elde edilen tek zincirli DNA’ların farklı konsantrasyonlardaki poliakrilamid jel ve elektroforez koşullarında bant modellerinin belirlenmesine yarayan bir tekniktir. Teknikte dikkat edilmesi gereken belli koşullar vardır. Bunlar; sıcaklık, PCR reaksiyonları ve jel matrisidir.

*SICAKLIK: En önemli kriterlerden biridir, oda sıcaklığı veya 4 C⁰,de elektroforez yapılmaktadır [80].

*GLİSEROL: % 5-10 arasındaki gliserolün elektroforez boyunca tek zincir modellerinin rezolüsyonunu iyileştirdiği bilinmektedir [80].

*PCR REAKSİYONLARI: PCR sırasında optimum primer konsantrasyonları kullanmak önemlidir. Çünkü aşırı primer tek zincirli bantların hareketini etkilemektedir [81].

*JEL MATRİKSİ: Birbirinin tamamlayıcısı olan tek zincirlerin daha iyi ayrılması için, poliakrilamit jel hazırlarken akrilamit oranına göre, çapraz bağlayıcının (NNN-Bisakrilamit) yüzdesi daha düşük olmalıdır [82].

Bu çalışmada faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarının bulunduğu gen bölgeleri üzerindeki bilinmeyen mutasyonların varlığını tespit etmek için SSCA tekniği'nden yararlanıldı. Faktör V, MTHFR ve protrombin gen bölgelerine yönelik uygulanan SSCA çalışmaları PCR'ları Tablo 3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu bölümü'nde belirtilen koşullara göre yapıldı.

Yukarıda adı geçen 3 gen bölgesine ait PCR ürünleri poliakrilamit jellere yüklendi. Optimizasyon çalışmaları en iyi rezolüsyon modellerini belirlemek için farklı sürelerde (8-21 saat), farklı voltajlarda (200-300 V), farklı wattlarda (2-9 W) ve çeşitli konsantrasyonlardaki poliakrilamit jeller kullanılarak yapıldı. Tek zincir ürünleri büyüklüklerine göre değil, konformasyonlarına göre ayrılacağı için yapılan analizlerde DNA markırı kullanılmadı.

Poliakrilamit Jel Solüsyonu Hazırlanması :

Faktör V Leiden mutasyonu gen bölgesi için, en iyi rezolüsyonu veren SSCA poliakrilamit jeli, çeşitli denemeler sonucunda belirlendi. Analizler sırasında; 1XTEB tamponu, % 10 gliserol, 0.50 ml % 10 APS ve 20 µl TEMED içeren, son hacmi 40 ml olacak şekilde % 40 (37.5:1) stok poliakrilamit solüsyonundan % 12 (37.5:1) dilüsyon poliakrilamit jeller hazırlandı. Hazırlanan jeller, 15x20 cm uzunluğunda, 0.8 mm kalınlığındaki iki cam düzeneğin arasına döküldü ve 15 kuyuluk tarak sisteme yerleştirildi. Jelin polimerize olması için yaklaşık 20-30 dakika beklendi.

MTHFR667C>T mutasyonuna ait gen bölgesi SSCA çalışması için, en iyi rezolüsyonu verecek jel koşullarını belirlemek amacı ile % 30 (29:1) ve % 40 (37.5:1) poliakrilamit jel stoklarından % 8, 10 ve 12'lik olmak üzere farklı konsantrasyonlarda jeller

hazırlandı. Bu jellere, farklı miktarlarda PCR ürünü yüklenerek, farklı elektroforetik koşullar altında (100 V, 200 V ve 8-12 W vb.) analiz edildi. MTHFR667C>T mutasyonunun yer aldığı gen bölgesinin farklı bir noktasında meydana gelen ender bir mutasyon olan MTHFR1298A>C mutasyonu REA ile incelenerek SSCA modeli belirlendi.

MTHFR1298A>C gen bölgesi için, en iyi rezolüsyonu veren SSCA poliakrilamit jeli çeşitli denemeler sonucunda belirlendi. Analizler sırasında; 0.5 X TEB tamponu, % 1 etilen glikol, % 1 formamid, 0.50 ml APS ve 20 µl TEMED içeren, son hacmi 40 ml olacak şekilde % 40 (37.5:1) stok poliakrilamit solüsyonundan % 10 (37.5:1) poliakrilamit jeller hazırlandı. Hazırlanan jeller 15x20 cm uzunluğunda, 0.8 mm kalınlığındaki iki cam düzeneğin arasına döküldü.

Protrombin20210G>A gen bölgesi için, en iyi rezolüsyonu veren SSCA poliakrilamit jeli çeşitli denemeler sonucunda belirlendi. Analizler sırasında; 0.5 X TEB tamponu, % 5 etilen glikol, 0.50 ml APS ve 20 µl TEMED içeren, son hacmi 40 ml olacak şekilde % 40 (37.5:1) stok poliakrilamit solüsyonundan % 10 (37.5:1) poliakrilamit jeller hazırlandı. Hazırlanan jeller, 15x20 cm uzunluğunda, 0.8 mm kalınlığındaki iki cam düzeneğin arasına yerleştirildi.

Elektroforez Koşulları :

Faktör V Leiden mutasyonunu barındıran gen bölgesine ait PCR ürünlerinden 8 µl alınarak, 1:1 oranında olacak şekilde Tablo 3.19'da belirtilen içerikteki SSCA yükleme solüsyonundan eklendi. 5 dakika 95 °C'de denatüre edildikten sonra, derhal buza alındı. Daha önceden hazırlanan SSCA jeline yüklenerek (Poliakrilamit Jel Solüsyonu Hazırlanması Bölümünde belirtildiği gibi) 200 V'ta, 21 saat 4 °C'de yürütüldü.

MTHFR1298A>C mutasyonunu barındıran gen bölgesine ait PCR ürünlerinden 2 µl ve Tablo 3.19'da belirtilen içerikteki SSCA yükleme solüsyonundan ise 4 µl eklendi. İlk olarak 5 dakika 95 °C'de denatüre edildikten sonra, PCR tüpleri vortekslendi. 5.000 rpm'de 10-15 saniye santrifüj edildi. Bu işlemi takiben PCR ürünleri; 2-3 dakika 95 °C'de tekrar denatüre edilerek – 20 °C 1-2 dakika bekletildi. Daha önceden hazırlanan SSCA jeline (Poliakrilamit Jel Solüsyonu Hazırlanması Bölümü'nde

belirtildiği gibi) PCR ürünleri yüklenmeden önce 5-10 dakika ön yürütme yapıldı. PCR ürünleri, 8 W'ta 9 saat 4 °C'de gün boyu yürütüldü.

Protrombin20210G>A mutasyonunun bulunduğu gen bölgesine ait PCR ürünlerinden 8 µl alınarak, 1:1 oranında olacak şekilde Tablo 3.19'da belirtilen içerikteki SSCA yükleme solüsyonundan eklendi. 5 dakika 95 °C'de denatüre edildikten sonra, hemen buza alınıp SSCA jeline yüklendi (Poliakrilamit Jel Solüsyonu Hazırlanması Bölümü'nde belirtildiği gibi). 200 V'ta, 18 saat 4 °C'de elektroforez edildi.

Tablo 3.19 : SSCA yükleme solüsyonunun hazırlanışı.

SOLÜSYON ADI	İÇERİK	SON KONSANTRASYON
SSCA Yükleme Solüsyonu	NaOH	10 mM
	Formamid	% 95 (v/v)
	Bromofenol mavisi	% 0.05 (w/v)
	Ksilen siyanol (X.C.)	% 0.05 (w/v)

Gümüş Boyama Tekniği :

PCR bantlarını belirlemek için, 15x20 cm uzunluğundaki SSCA jelleri, gümüş boyama tekniği ile boyandı. Jel görüntüleri saklandı.

3.2.5.4. İstatistiksel Hesaplamalar

Tromboemboli ön tanısı almış 270 kişilik bir hasta ve 67 kişilik bir kontrol grupları üzerinde, faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları tarandı. 270 kişiden oluşan genel tromboemboli hasta grubu içersinden 46 kişilik DVT ve 60 kişilik gebelik komplikasyonları adlı 2 alt grup oluşturuldu. Her bir mutasyon için, 3 hasta grubu ve kontrol grupları üzerinde homozigot normal (N/N), heterozigot mutant (MT/N) ve homozigot mutant (MT/MT) genotipe sahip bireyler tespit edildi. Elde edilen sayısal değerler, Türkiye toplumundaki tromboemboli, DVT ve gebelik komplikasyonları hasta gruplarında faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarının sıklıklarını belirlemek için değerlendirildi.

Bu çalışmada istatistiksel değerlendirmelerde, sayımla elde edilen nitel değişkenlerin çeşitli sınıflandırma biçimlerine göre (tek değişkenli, iki değişkenli vb.) analizini yapmak, nicel değişkenlerin alışılmış kuralların dışında bazı bilimsel amaçları gerçekleştirmek için özgün sınıflama biçimlerini (kategorik grupta) ve frekans dağılımını ele alarak dağılım biçimine yönelik analiz etmekte uygulanan Kikare Testi (χ^2) kullanıldı [83].

χ^2 analizinde, öncelikle hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin incelenen mutasyonlar için beklenen değerlerinin hesaplanması gereklidir. Beklenen hasta grubu birey sayılarını bulmak için faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonların genel hasta grubundaki yüzdeleri hesaplanıp ilgili mutasyon analizi yapılan toplam birey sayısı ile çarpıldı. Beklenen kontrol grubu birey sayılarını bulmak için ilgili mutasyonların genel kontrol birey yüzdeleri hesaplandı. Faktör V Leiden, MHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyon analizi yapılan toplam birey sayıları ile çarpıldı. Daha sonra beklenen değerler ile gözlenen değerler arasındaki farkların kareleri alınarak beklenen değere bölündü. Bulunan her değer ait olduğu gözün χ^2 değeridir. Analiz χ^2 değerini bulmak için her göz için bulunan χ^2 değerleri toplandı.

Genel χ^2 değeri, serbestlik derecesine göre χ^2 tablosuna bakılarak 0.05 olasılık düzeyine göre kikare tablo değerleri (χ^2_t) bulundu.

$$\text{Serbestlik derecesi} = (\text{sıra}-1)(\text{sütun}-1) \quad (\text{Denklem 3.2})$$

formülü kullanılarak hesaplandı.

Elde edilen veriler $\chi^2 \geq \chi^2_t$ ise farklılık önemli, $\chi^2 \leq \chi^2_t$ ise farklılık önemsiz olarak yorumlandı.

Bu çalışmada, tromboemboli, DVT ve gebelik komplikasyonları hasta grupları ile kontrol grupları arasında, faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları açısından istatistiksel olarak birbirinden bağımsız olarak değerlendirildi.

İstatistiksel analizler yapılırken, öncelikle her bir hasta grubu ve kontrol grubu için incelenen mutasyon açısından bireylerin genotipleri belirlendi. Fischer kesin testi p değeri hesaplanarak genotiplerin bu gruplardaki çıkma olasılıkları değerlendirildi. Fischer kesin testindeki p değerinin hesaplanmasında yapılan ölçümlere ait hasta ve kontrol grubu değerlerinin matrisi kullanıldı. Bu matriste, sırasıyla hasta ve kontrol grubuna ait N/N değerler A ve B harfleri ile ifade edilirken, hasta ve kontrol gruplarının MT/N ve MT/MT gruplarının toplamları C ve D harfleri ile sembolize edildi. Bütün grupların toplamları da n harfi ile ifade edildi ($n=A+B+C+D$). Buna göre Fischer kesin testi p değeri, aşağıdaki denklik ile formüle edildi. Gözlenen değerlere ait p değerleri hesaplandı.

$$P = \frac{[(A+B)! \cdot (C+D)! \cdot (A+C)! \cdot (B+D)!]}{[n! \cdot A! \cdot B! \cdot C! \cdot D!]} \quad (\text{Denklem 3.3})$$

Daha sonra her bir mutasyon için ilgili hasta ve kontrol gruplarında genotip yüzdeleri ve allel frekansları belirlendi. Hasta ve kontrol gruplarının birbirine oranı olarak adlandırılan OR (Odds Ratio) değerleri hesaplandı. Kısaca OR olarak adlandırılan ham olasılık oranı, tüm hasta gruplarında her bir mutasyon ile ilgili olarak hesaplandı. Aşağıda verilen formülde; p1 ile hasta grubunun görülme yüzdesi, p2 ile de kontrol grubunun görülme yüzdesi gösterildi.

$$OR = \frac{[p1 / (1-p1)]}{[p2 / (1-p2)]} \quad (\text{Denklem 3.4})$$

3.2.5.5. DNA Dizi Analizi

Protrombin20210G>A mutasyonu gen bölgesi PCR'ları için yapılan SSCA çalışmaları sonucunda bu gen bölgesi ile ilgili olarak homozigot normal, homozigot mutant ve heterozigot mutant genotiplere ait SSCA modelleri belirlendi. Bu modellerden farklılık gösteren 8 hastaya ait PCR örneği tespit edildi. Bu PCR örneklerinde, bilinmeyen bir mutasyon ya da polimorfizmin var olup olmadığının belirlenmesi için PCR ürünlerinin ait olduğu hasta DNA'ları tespit edilerek, DNA dizi analizi tekniği ile doğrulanması hedeflendi.

Protrombin20210G>A mutasyonunun ilgili gen bölgelerinde SSCA ile farklı bir model saptanan hastalara ait DNA'lar, otomatize DNA dizi analizi sisteminde (Applied Biosystems Intercooperation-ABI 3100 Avant) incelendi. 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 dideoksi gelirse bu nükleotitte serbest 3'OH grubu bulunmadığından zincir uzması 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 dizisi belli olmaktadır.

Bu çalışmada, ABI 3100 Avant DNA dizi analizi tekniği ile 8 hastaya ait protrombin geni PCR ürünleri incelendi. Bunun için ilk olarak, incelenmesi istenen DNA örneklerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu bölümü Tablo 3.6'da belirtilen protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran hedef gen bölgesi PCR koşullarına uygun olarak 50 µl hacimde PCR'ları Tablo 3.8'de belirtilen PCR programına göre yapıldı. Daha sonra elde edilen ilk PCR ürünlerinin, MgSO₄-etil alkol (0.2 M MgSO₄, % 70 etil alkol) yöntemi ile aşırı primer, dNTP'lerden arındırılması hedeflendi. İlk PCR'ın işlediğini kontrol etmek amacı ile 5 µl PCR ürünü % 1.5 (w/v)'luk agaroz jele yüklendi. 30 dakika elektroforez edildi. PCR'ın uygun olduğu belirlendikten sonra, geriye kalan 45 µl'lik PCR ürünü, 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınarak üzerine 150 µl MgSO₄-etanol solüsyonundan eklenip 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra, tüpler 15 dakika 4.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpler bir kağıt havlunun üzerine ters olacak şekilde çevrildi. PCR ürünlerinin alkolden tamamen kurtulmaları için 37 °C'lik etüvde 10-15 dakika bekletildi. Tüpler kurduktan sonra, PCR ürünleri 10 µl distile H₂O'da çözüldü. Dizi analizi PCR'ı için hedef gen bölgesi olarak kullanıldı. Hem ilk PCR hem de dizi analizi PCR'ı için Tablo 3.7'de dizileri

belirtilen primerler kullanıldı. Tablo 3.20’de protrombin geni DNA dizi analizi PCR koşulları gösterilmektedir. Herbir dizi analizi reaksiyonu için primer çiftlerinden sadece bir tanesi (ileri/geri primer) kullanılmaktadır. Tablo 3.21’de ise protrombin geni dizi analizi PCR programı verilmektedir.

Tablo 3.20: Protrombin geni DNA dizi analizi PCR koşulları.

PCR BİLEŞENLERİ	TÜP/ μ l	SON KONSANTRASYON
Steril bidestile H ₂ O	4.5	-
5 X Dizileme Tamponu	1.0	0.5 X
Primer1PT20210-F (0.8 pmol/ μ l)/	2.0	1.6 pmol
Primer2PT20210-R (0.8 pmol/ μ l)	2.0	1.6 pmol
ddNTP karışımı	0.5	-
I.PCR ürünü	2.0	200-500 ng
Toplam hacim	10.0	

Tablo 3.21: Protrombin geni DNA dizi analizinde uygulanan PCR programı.

PROGRAM TÜRÜ	DERECE	ZAMAN	DÖNGÜ SAYISI
İlk denatürasyon	98	2’	-
Denatürasyon	94	10’’	35
Bağlanma	50	50’’	
Uzatma	60	4’	
Bekleme	4	F/e	-

’: Dakika, ’’: Saniye, F/e: Süresiz

Dizi analizi PCR’inin bitimini takiben PCR ürünleri, tekrar MgSO₄-etanol yöntemi ile saflaştırıldı. PCR ürünleri, 20 μ l distile H₂O’da çözüldü. 15 μ l PCR ürünü dizi analizi cihazı içinde bulunan tabladaki kuyucuklara, içlerinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde konuldu. ABI 3100 Avant otomatize dizi analizi cihazında yaklaşık 1.5 saat analiz edildi. Sonuçlar, protrombin genine ait nükleotid dizi bilgileri ile karşılaştırılarak yorumlandı.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışmada, klinik olarak tromboemboli ön tanısı almış ve İstanbul Düzen Laboratuvarı, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi'ne başvuruda bulunan kişiler ile kontrol grubunu oluşturan bireylere ait kan materyalleri kullanıldı. Faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A gen mutasyonlarını belirlemek için, 270 kişilik hasta ve 67 kişilik kontrol grubu üzerinde inceleme yapıldı. Hasta grubu içinde 46 kişilik DVT ve 60 kişilik gebelik komplikasyonları alt grupları ayrıca değerlendirildi. Gebelik komplikasyonları kontrol grubunu, gebelik sürecini sorunsuz tamamlamış 33 kadın oluşturdu.

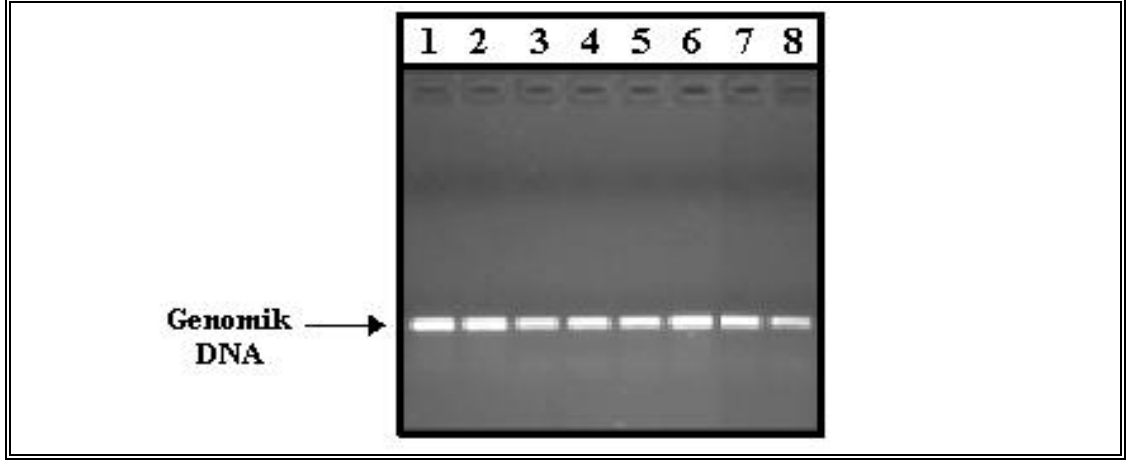
4.2. YÖNTEM

4.2.1. Genomik DNA İzolasyonu Bulguları

Genomik DNA izolasyonu, toplam 270 kişilik hasta grubu ve 67 kişilik kontrol grubunu oluşturan bireylere ait 5 ml'lik K₃EDTA'lı tüplere alınan kan materyallerinden, Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde 3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu kısmında belirtilen NaCl yöntemine göre yapıldı.

4.2.2. DNA'nın Kalitatif Bulguları

İzole edilen tüm genomik DNA'lar % 1 (w/v)'lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. Genomik DNA'larına ait bantlar ultraviyole (U.V.) ışık altında parlak ve net tekli hatlar halinde gözlemlendi. Bunların içinden örnek olarak seçilen 8 farklı bireye ait jel görüntüsü Şekil 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.1 : Genomik DNA'ların % 1.5 (w/v) agaroz jeldeki görünüşleri.

1-8 numaraları, bireylerin genomik DNA'larının yükleme yapıldıkları kuyuları göstermektedir.

4.2.3. DNA'nın Kantitatif Miktar Tayini Bulguları

İzole edilen genomik DNA'nın kantitatif miktar tayini, spektrofotometrik ölçümler ile yapıldı. Spektrofotometre analizleri sonucunda, O.D.₂₆₀ değerinden yola çıkılarak saptanan DNA konsantrasyonları birbirinden farklılık göstermekle birlikte bütün örnekler 150 ng/µl olacak şekilde TE tamponu ile dilüsyonları yapıldı. Çalışmaya dahil edilen DNA'ların, saflığı O.D.₂₆₀ ve O.D.₂₈₀ değerlerinin birbirlerine olan oranı alınarak değerlendirildi. Hesaplanan DNA konsantrasyonları (C) ve saflık dereceleri EKLER Bölümünde Ek-A, Ek-B ve Ek-C tablolarında verilmektedir.

4.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

Genomik DNA'lardaki hedef gen bölgeleri, Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde belirtildiği gibi PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Bu amaç ile uygun oligonükleotidler kullanılarak, faktör V Leiden, MTHFR677C>T ve MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarını barındıran ilgili gen bölgeleri farklı PCR programları ve koşulları uygulanarak çoğaltıldı.

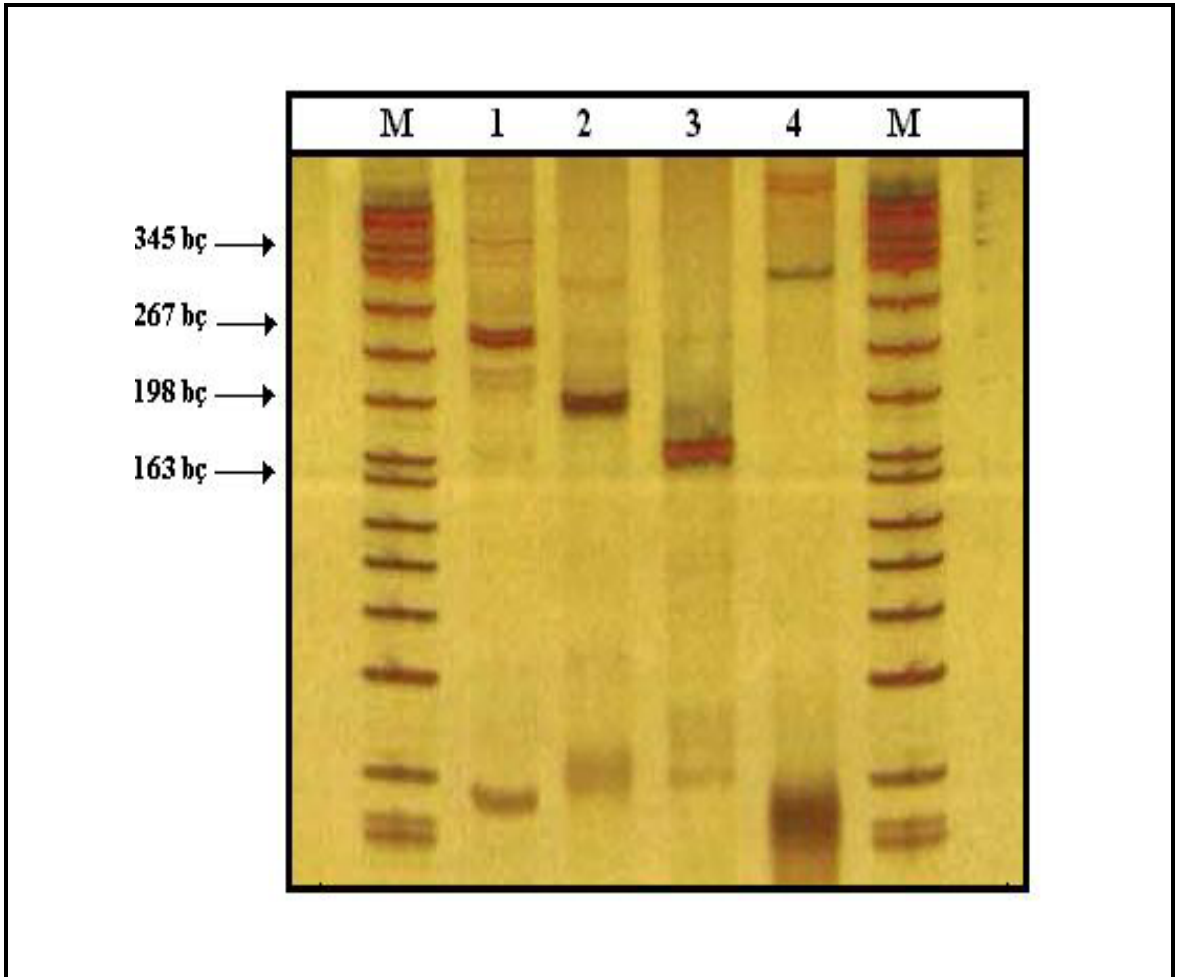
4.2.5. DNA Analiz Yöntemleri

4.2.5.1. Poliakrilamid Jel Elektrofrez Bulguları

PCR'ların işlediğini belirlemek amacı ile faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarını barındıran ilgili gen bölgelerine ait 5 µl PCR ürünü ve 2 µl elektrofrez yükleme solüsyonu karıştırıldı. Hazırlanan karışım, içerisinde 1XTEB tampon bulunan elektrofrez tankındaki

% 8 (29:1)'lik poliakrilamid jele yüklendi ve 150 V'ta 25-30 dakika elektroforez edildi. PCR ürünleri molekül ağırlığı bilinen bir DNA markırı ile analiz edildi.

Jel üzerindeki DNA markırı ve literatür bilgisinden yararlanılarak [74], 1 numaralı hatta faktör V Leiden gen bölgesine ait PCR ürününün 267 bç, 2 numaralı hatta MTHFR677C>T mutasyonu gen bölgesine ait PCR ürününün 198 bç, 3 numaralı hatta MTHFR1298A>C mutasyonu gen bölgesine ait PCR ürününün 163 bç ve 4 numaralı hatta protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ürününün 345 bç büyüklüğünde bantlar verdikleri tespit edildi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2 : PCR ürünlerinin % 8 (29:1) poliakrilamid jelde gösterilmesi.

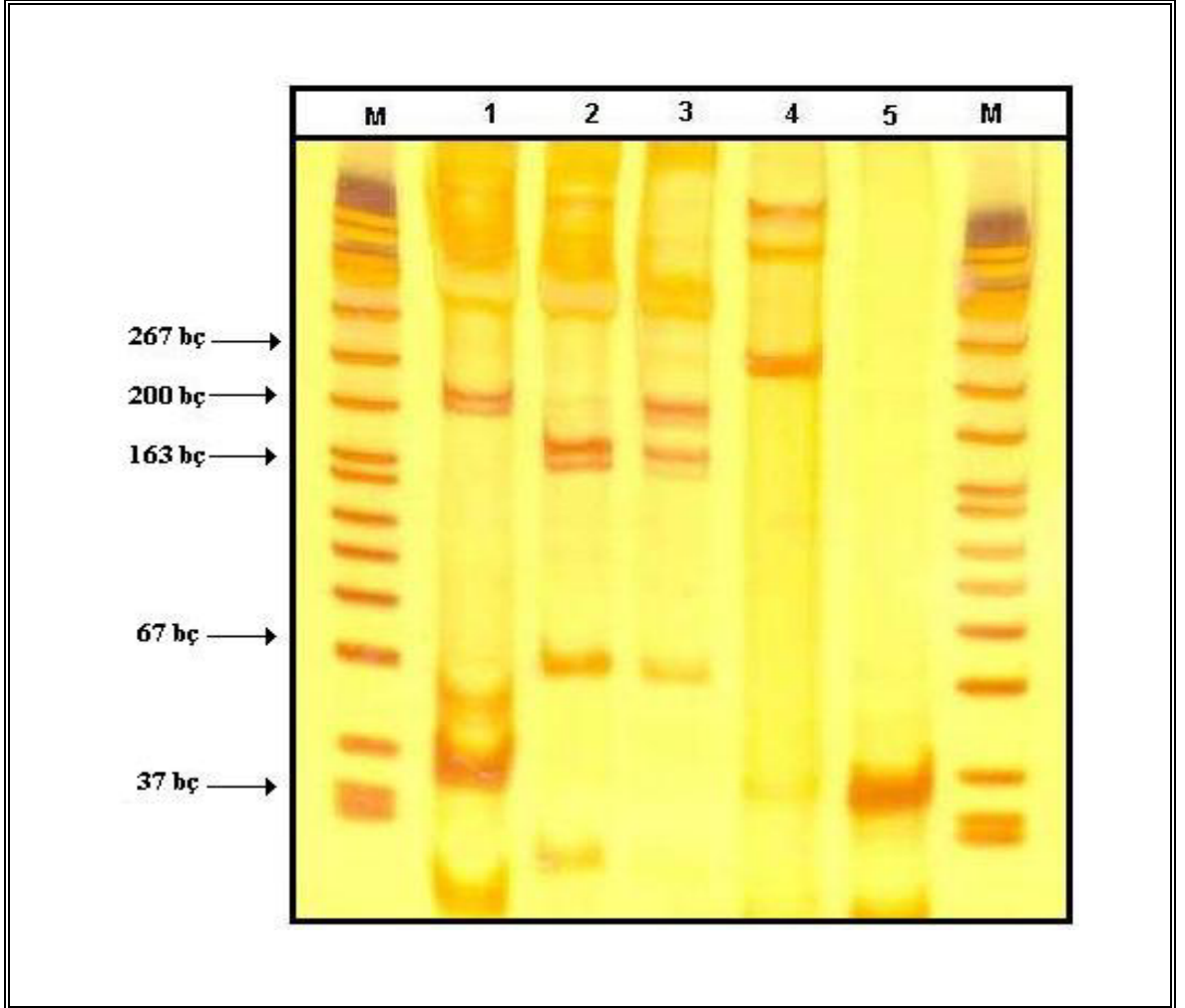
- M : Markır(ΦHinfI DNA markır)
 1 : Faktör V Leiden mutasyonunun gen bölgesine ait PCR ürünü [267 bç].
 2 : MTHFR677C>T mutasyonunun gen bölgesine ait PCR ürünü [198 bç].
 3 : MTHFR1298A>C mutasyonunun gen bölgesine ait PCR ürünü [163 bç].
 4 : Protrombin20210G>A mutasyonunun gen bölgesine ait PCR ürünü [345 bç].

4.2.5.2. Restriksiyon Enzim Analizi Bulguları

Faktör V Leiden mutasyonu, faktör V gen bölgesi üzerinde *MnII* restriksiyon enzimi için kesim bölgesinin ortadan kalkmasına neden olan bir nokta mutasyondur. 267 bç'lik faktör V gen bölgesi PCR ürününün *MnII* restriksiyon enzimi ile kesiminden sonra, her iki alleli için normal olan bireyde (GG); PCR kesim ürünlerinin 163, 67 ve 37 bç, sadece bir allelinde mutasyonu taşıyan bireyde (GA); 200, 163, 67 ve 37 bç ve her iki allelinde mutasyonu taşıyan bireyde (AA) ise; 200 ve 67 bç uzunluğunda oldukları belirlendi [74].

Faktör V Leiden mutasyonu için tüm hasta ve kontrol gruplarında homozigot normal (N/N), heterozigot mutant (MT/N) ve homozigot mutant (MT/MT) genotiplere sahip bireyler tespit edildi. İncelenen bireyler arasından farklı genotiplere sahip olan 3 birey seçildi. Bant büyüklüğü bilinen bir DNA markırı ile birlikte bu bireylerin PCR ve kesim ürünlerine ait bant büyüklüklerinin belirlendiği jel görüntüsü Şekil 4.3'de gösterilmektedir.

Şekil 4.3'de 1 numaralı hatta homozigot mutant (AA) genotipe sahip olan bireyin ilgili gen bölgesi için; 200 ve 67 bç, 2 numaralı hatta homozigot normal (GG) genotipe sahip olan bir bireyin ilgili gen bölgesi için; 163, 67 ve 37 bç, 3 numaralı hatta heterozigot mutant (GA) genotipe sahip olan bir bireyin; 200, 163, 67 ve 37 bç, 4 numaralı hatta PCR sonrası *MnII* restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmayan faktör V Leiden mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ürününün 345 bç uzunluğunda PCR bantları verdikleri ve 5 numara ile işaretlenen hatta ise DNA içermeyen PCR ürününün herhangi bir bant vermediği gösterildi. Jelin yükleme yapılan ilk ve son kuyularına bant büyüklükleri bilinen bir DNA markırı yüklendi.



Şekil 4.3 : Faktör V Leiden mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ve kesim ürünlerinin % 12 (29:1)'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri.

- M : Markır (ΦHinfI DNA markır)
 1 : Homozigot mutant örnek (MT/MT) [200+67 bç.]
 2 : Homozigot normal örnek (N/N) [163+67+37 bç.]
 3 : Heterozigot mutant örnek (MT/N) [200+163+67+63 bç.]
 4 : Kesilmemiş PCR örneği
 5 : DNA içermeyen PCR örneği

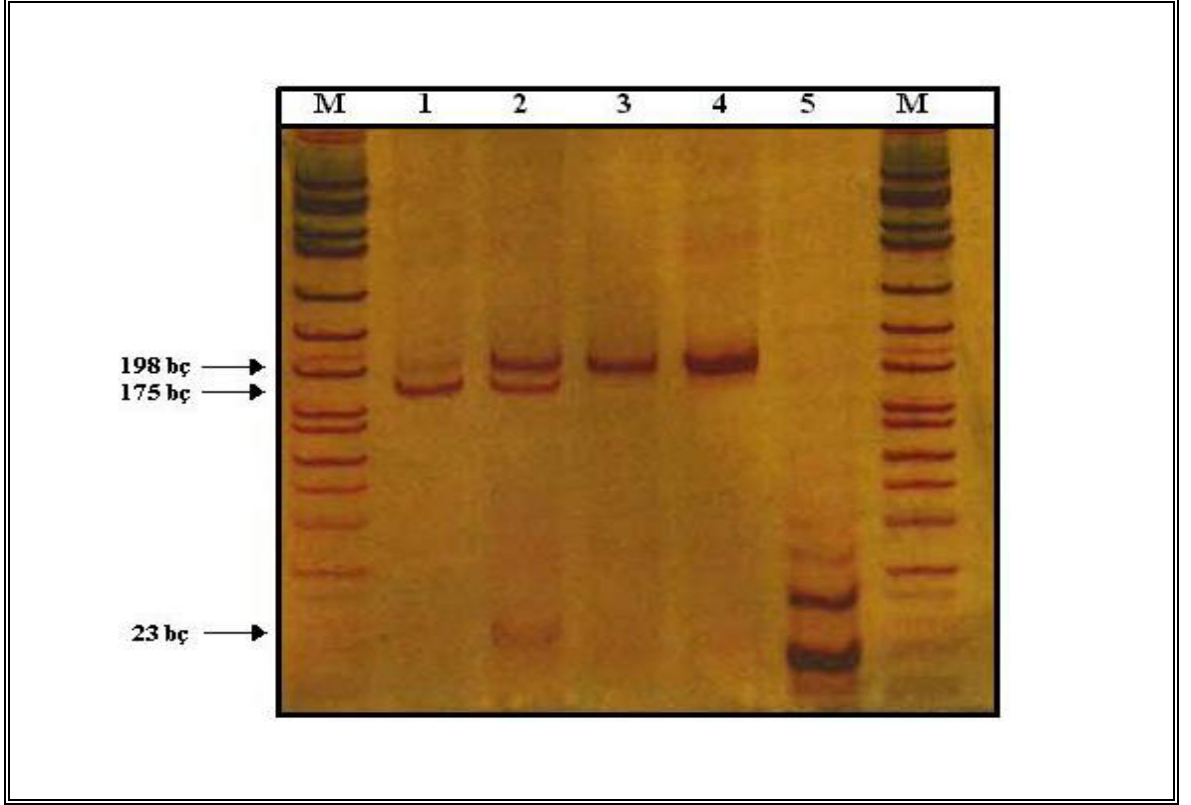
MTHFR677C>T mutasyonu, MTHFR gen bölgesi üzerinde *HinfI* restriksiyon enzimi için kesim bölgesi yaratan, alaninin valine dönüşümüne neden olan bir nokta mutasyonudur. 198 bç'lik MTHFR gen bölgesi PCR ürününün *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesiminden sonra her iki alleli için normal olan bireyde (CC); PCR kesim ürünlerinin 198 bç, sadece bir allelinde mutasyonu taşıyan bireyde (CT); 198, 175 ve 23 bç ve her iki allelinde mutasyonu taşıyan bireyde (TT) ise; 175 ve 23 bç uzunluğunda oldukları belirlendi

MTHFR677C>T mutasyonu tüm hasta ve kontrol gruplarında taranarak homozigot normal (N/N), heterozigot mutant (MT/N) ve homozigot mutant (MT/MT) genotiplere sahip bireyler belirlendi. Bu bireylerden örnek olarak seçilen farklı genotiplere sahip 3 bireyin PCR ve kesim ürünlerine ait bant büyüklükleri Şekil 4.4'deki jel ile gösterilmektedir.

Şekil 4.4'de 1 numaralı hatta homozigot mutant (TT) genotipe sahip olan bireyin ilgili gen bölgesi için; 175 ve 23 bç, 2 numaralı hatta heterozigot mutant (CT) genotipe sahip olan bir bireyin; 198, 175 ve 23 bç, 3 numaralı hatta homozigot normal (CC) genotipe sahip olan bir bireyin ilgili gen bölgesi için; 198 bç, 4 numaralı hatta PCR sonrası *HinfI* restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmayan MTHFR677C>T mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ürününün 198 bç uzunluğunda PCR bantları verdikleri ve 5 numara ile işaretlenen hatta ise DNA içermeyen PCR ürününün herhangi bir bant vermediği gösterildi [75]. Jelin yükleme yapılan ilk ve son kuyularına bant büyüklükleri bilinen bir DNA markırı yüklendi.

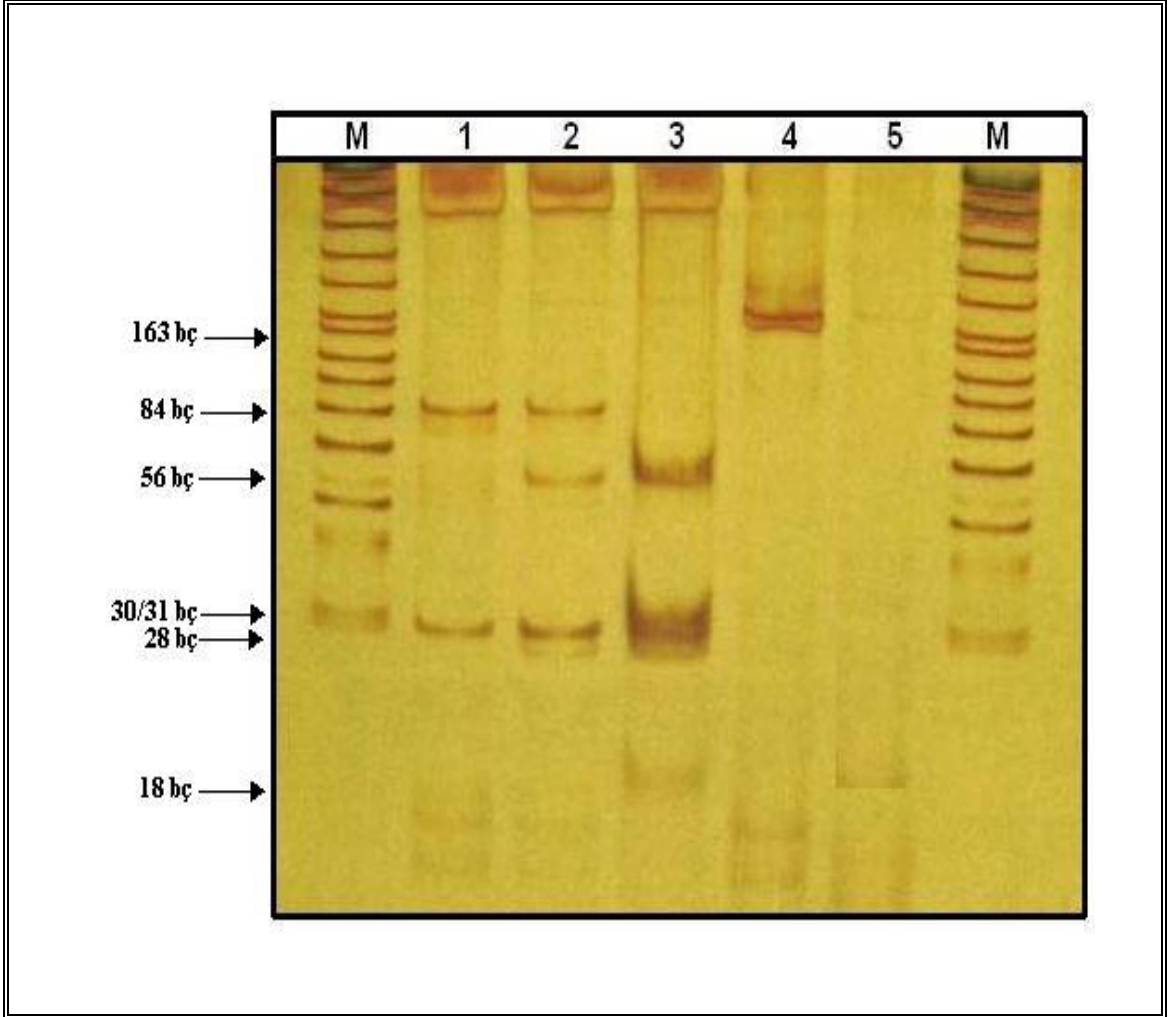
MTHFR1298A>C mutasyonu, MTHFR gen bölgesi üzerinde *MboII* restriksiyon enzimi için kesim bölgesini ortadan kaldırarak glutamin amino asidinin alanin amino asidine dönüşümüne neden olan bir nokta mutasyonudur. 163 bç'lik MTHFR gen bölgesi PCR ürününün *MboII* restriksiyon enzimi ile kesiminden sonra, her iki alleli için normal olan bireyde (AA); PCR kesim ürünlerinin 56, 31, 30, 28 ve 18 bç, sadece bir allelinde mutasyonu taşıyan bireyde (AC); 84, 56, 31, 30, 28 ve 18 bç ve her iki allelinde mutasyonu taşıyan bireyde (CC) ise; 84, 30, 31 ve 18 bç uzunluğunda oldukları belirlendi [76].

Tüm hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin MTHFR1298A>C mutasyonunu için genotipleri belirlendi. İncelenen bireyler arasından seçilen farklı genotiplerdeki 3 bireye ait PCR ve restriksiyon enzim analizi ürünlerinin % 12 (19:1)'lik poliakrilamid jeldeki görüntüsü Şekil 4.5'te verilmektedir.



Şekil 4.4 : MTHFR677C>T mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ve kesim ürünlerinin % 12 (29:1)'lik poliakrilamid jeldeki görünümüleri.

- M : Markır (ΦHinfI DNA markır)
 1 : Homozigot mutant örnek (MT/M) [175+23 bç.]
 2 : Heterozigot mutant örnek (N/N) [198+175+23 bç.]
 3 : Homozigot normal örnek (MT/N) [198 bç.]
 4 : Kesilmemiş PCR örneği
 5 : DNA içermeyen PCR örneği



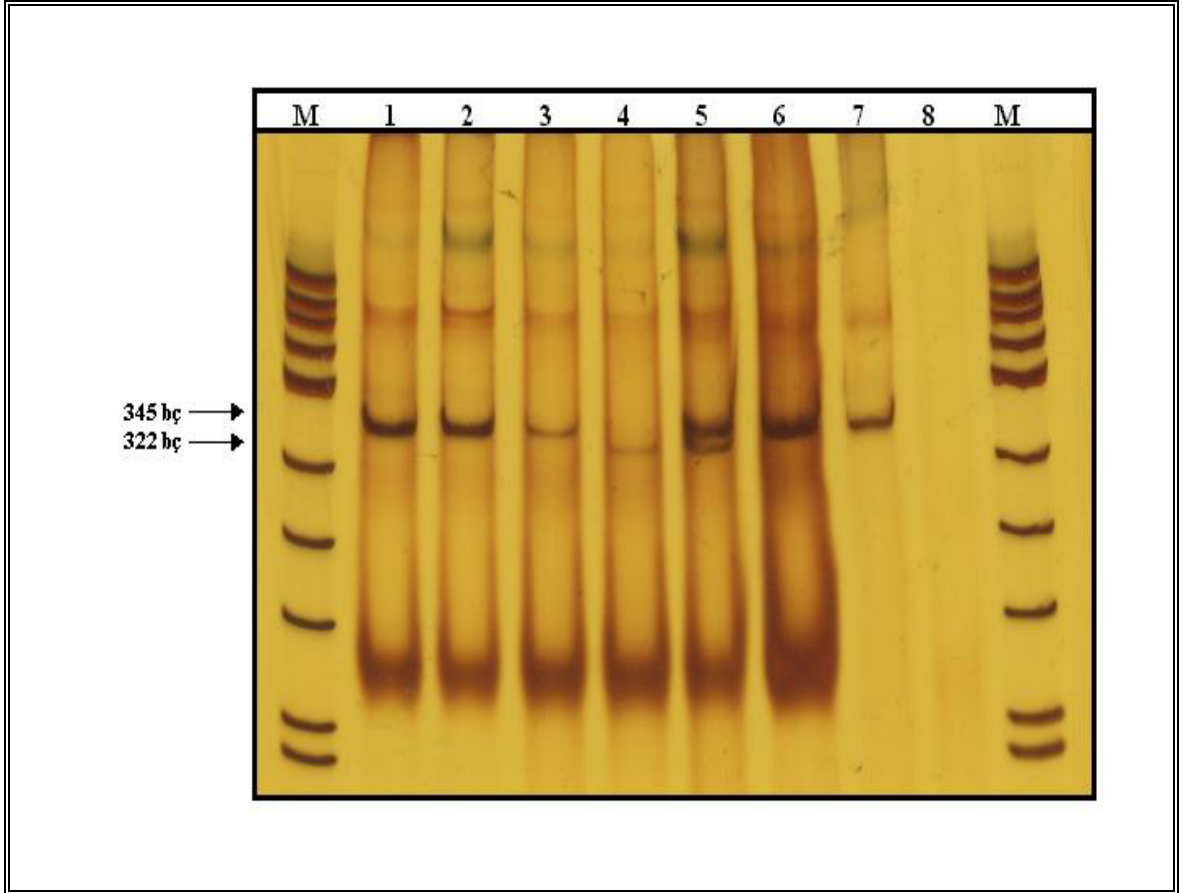
Şekil 4.5 : MTHFR1298A>C mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ve kesim ürünlerinin % 12 (19:1)'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri.

- M : Markır (ΦHinfI DNA markır)
 1 : Homozigot mutant örnek (MT/MT)[84+ 31+ 30+18 bç.]
 2 : Heterozigot mutant örnek (N/N) [84+56+31+30+28+18 bç.]
 3 : Homozigot normal örnek (MT/N) [56+ 31+ 30 +28+18 bç.]
 4 : Kesilmemiş PCR örneği
 5 : DNA içermeyen PCR örneği

Şekil 4.5.'de 1 numaralı hatta homozigot mutant (CC) genotipe sahip olan bireyin ilgili gen bölgesi için; 84, 30, 31 ve 18 bç, 2 numaralı hatta heterozigot mutant (AC) genotipe sahip olan bir bireyin; 84, 56, 30, 31, 28 ve 18 bç, 3 numaralı hatta homozigot normal (AA) genotipe sahip olan bir bireyin ilgili gen bölgesi için; 56, 31, 30, 28 ve 18 bç, 4 numaralı hatta PCR sonrası *MboII* restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmayan MTHFR1298A>C mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ürününün 163 bç uzunluğunda PCR bantları verdikleri ve 5 numara ile işaretlenen hatta ise DNA içermeyen PCR ürününün herhangi bir bant vermediği gösterildi. Jelin yükleme yapılan ilk ve son kuyularına bant büyüklükleri bilinen bir DNA markırı yüklendi.

Protrombin20210G>A mutasyonu, protrombin gen bölgesi üzerinde *HindIII* restriksiyon enzimi için kesim bölgesini ortadan kaldıran, guanin bazının adenin bazına dönüşümüne neden olan bir substitüsyondur. 345 bç'lik protrombin gen bölgesi PCR ürününün *HindIII* restriksiyon enzimi ile kesiminden sonra, her iki alleli için normal olan bireyde (GG); PCR kesim ürünlerinin 345 bç, sadece bir allelinde mutasyonu taşıyan bireyde (GA); 345, 322 ve 23 bç, her iki allelinde mutasyonu taşıyan bireyde (AA) ise; 322 ve 23 bç uzunluğunda oldukları belirlendi [77]. İncelenen hasta ve kontrol grupları arasından seçilen 7 bireye ait protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ve restriksiyon enzim analizi ürünleri % 6 (19:1)'lik poliakrilamit jelde, 150 V 60 dakika yürütüldü. Elektroforezin bitimini takiben, jel gümüş boyama tekniği ile boyanarak fotoğrafları çekildi. Bant büyüklüğü bilinen bir DNA markır kullanılarak PCR ve kesim ürünlerine ait bant büyüklükleri belirlenen örneklerin jel görüntüsü Şekil 4.6'da verilmektedir.

Şekil 4.6'da 1-3, 6 numaralı hatta homozigot normal (GG) genotipe sahip olan bireylerin ilgili gen bölgesi için; 345 bç, 4 numaralı hatta homozigot mutant (AA) genotipe sahip olan bir bireyin ilgili gen bölgesi için; 322 ve 23 bç, 5 numaralı hatta heterozigot mutant (GA) genotipe sahip olan bir bireyin; 345, 322 ve 23 bç, 7 numaralı hatta PCR sonrası *HindIII* restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmayan protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ürününün 345 bç uzunluğunda PCR bantları verdikleri ve 8 numara ile işaretlenen hatta ise DNA içermeyen PCR ürününün herhangi bir bant vermediği gösterildi. Jelin yükleme yapılan ilk ve son kuyucuklara bant büyüklükleri bilinen bir DNA markırı yüklendi.



Şekil 4.6 : Protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran gen bölgesi PCR ve kesim ürünlerinin % 6 (19:1)'lık poliakrilamid jeldeki görünüşleri.

- M : Markır (ΦHinfI DNA markır)
 1-3, 6 : Homozigot normal örnek (N/N)
 4 : Homozigot mutant örnek (MT/MT)
 5 : Heterozigot mutant örnek (MT/N)
 7 : Kesilmemiş PCR ürünü
 8 : DNA içermeyen PCR ürünü

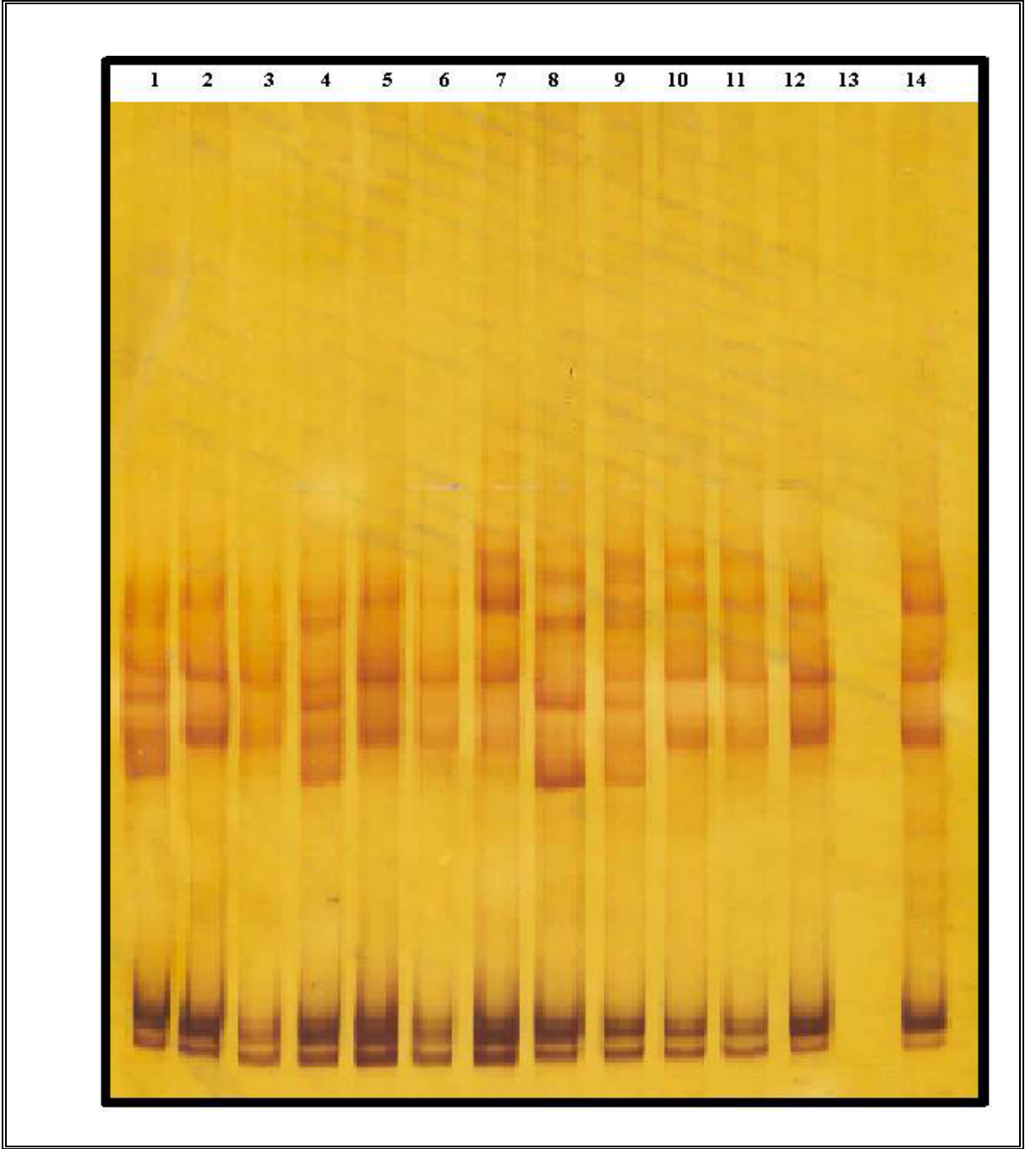
4.2.5.3. Tek Zincir Konformasyon Analizi (SSCA) Bulguları

Faktör V Leiden mutasyonu gen bölgesinde farklı bir mutasyon/polimorfizmin var olup olmadığını belirlemek amacı ile SSCA tekniğinden yararlanıldı. SSCA tekniği, klinik olarak tromboemboli ön tanısı konmuş 270 kişilik hasta grubu için uygulandı. Bu amaçla, faktör V Leiden mutasyonunu barındıran gen bölgesi için Malzeme ve Yöntem Bölümü, Tablo 3.3'de belirtilen koşullarda PCR yapıldı. PCR ürünleri, DNA çift sarmallarını tek zincir haline getirmek için denatüre edilerek, formamid içeren SSCA yükleme solüsyonu ile belli oranlarda karıştırıldı ve denatüre olmayan % 8 (37.5:1)'lik SSCA jeline yüklenerek; 200 V'ta, 4°C'de gece boyu 21 saat elektroforez tekniği ile analiz edildi.

Şekil 4.7’de faktör V Leiden mutasyonunu barındıran ve genin 10. eksonuna ait örnek olarak seçilmiş 14 farklı PCR ürününün verdiği SSCA modelleri gösterilmektedir. REA tekniği ile homozigot normal/homozigot mutant genotip gösteren DNA’lara ait PCR ürünleri, SSCA jelinde farklı sayıda bantlar halinde farklı bölgelerde gözlenirken, heterozigot mutant genotipe sahip DNA’ların PCR ürünleri hem homozigot normal hem de homozigot mutant örneklerin verdiği bantları gösterdi. Şekil 4.7’de 2, 3, 5, 6, 10, 11 ve 14 numaraları ile belirtilen kuyucuklarda homozigot normal PCR ürünlerinin SSCA modelleri, 1, 4 ve 9 numaraları ile işaretlenen kuyucuklarda heterozigot mutant PCR ürünlerinin SSCA modelleri ve 8 numarası ile belirtilen kuyucukta homozigot mutant PCR ürününün SSCA modeli gösterilmektedir.

MTHFR667C>T mutasyonuna ait gen bölgesi SSCA çalışması için, en iyi rezolüsyonu verecek jel koşullarını belirlemek amacı ile % 30 (29:1) ve % 40 (37.5:1) poliakrilamid jel stoklarından % 8, 10 ve 12’lik olmak üzere farklı konsantrasyonlarda jeller hazırlandı. Bu jellere, farklı miktarlarda PCR ürünü yüklenerek, farklı elektroforetik koşullar altında (100 V, 200 V ve 8-12 W vb.) analiz edildi. Ancak MTHFR667C>T mutasyonunun yer aldığı, ilgili gen bölgesine ait yapılan SSCA çalışmalarında, muhtemelen mutasyonun var olduğu bölgenin tek zincirlerin rezolüsyonunu olumsuz yönde etkilemesinden dolayı, diğer gen bölgelerinin verdiği gibi net bantlar ve jel görüntüleri elde edilemedi. Bununla birlikte, MTHFR667C>T mutasyonunun yer aldığı gen bölgesinin farklı bir noktasında meydana gelen ender bir mutasyon olan MTHFR1298A>C mutasyonu REA ile incelendi ve SSCA modeli belirlendi.

MTHFR1298A>C mutasyonu gen bölgesinde SSCA modelini belirlemek amacı ile SSCA tekniğinden yararlanıldı. MTHFR1298A>C mutasyonunu barındıran gen bölgesi için Malzeme ve Yöntem Bölümü, Tablo 3.5’de belirtilen koşullarda PCR yapıldı. PCR ürünleri, DNA çift sarmallarını tek zincir haline getirmek için denatüre edilerek, formamid içeren SSCA yükleme solüsyonu ile belli oranlarda karıştırıldı. Örnekler denatüre olmayan % 10 (37.5:1)’lik SSCA jeline yüklenerek; 8 W’ta, 4⁰C’de 9 saat gün boyu elektroforez tekniği ile analiz edildi.



Şekil 4.7 : Faktör V Leiden mutasyonunu barındıran ilgili gen bölgesi PCR ürünlerine ait SSCA çalışması.

1-14 numaraları PCR ürünlerinin yüklemesinin yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

2, 3, 5, 6, 7, 10, 11- 14: Homozigot normal (N/N)
1, 4, 9 : Heterozigot mutant (MT/N)
8 : Homozigot mutant (MT/MT)

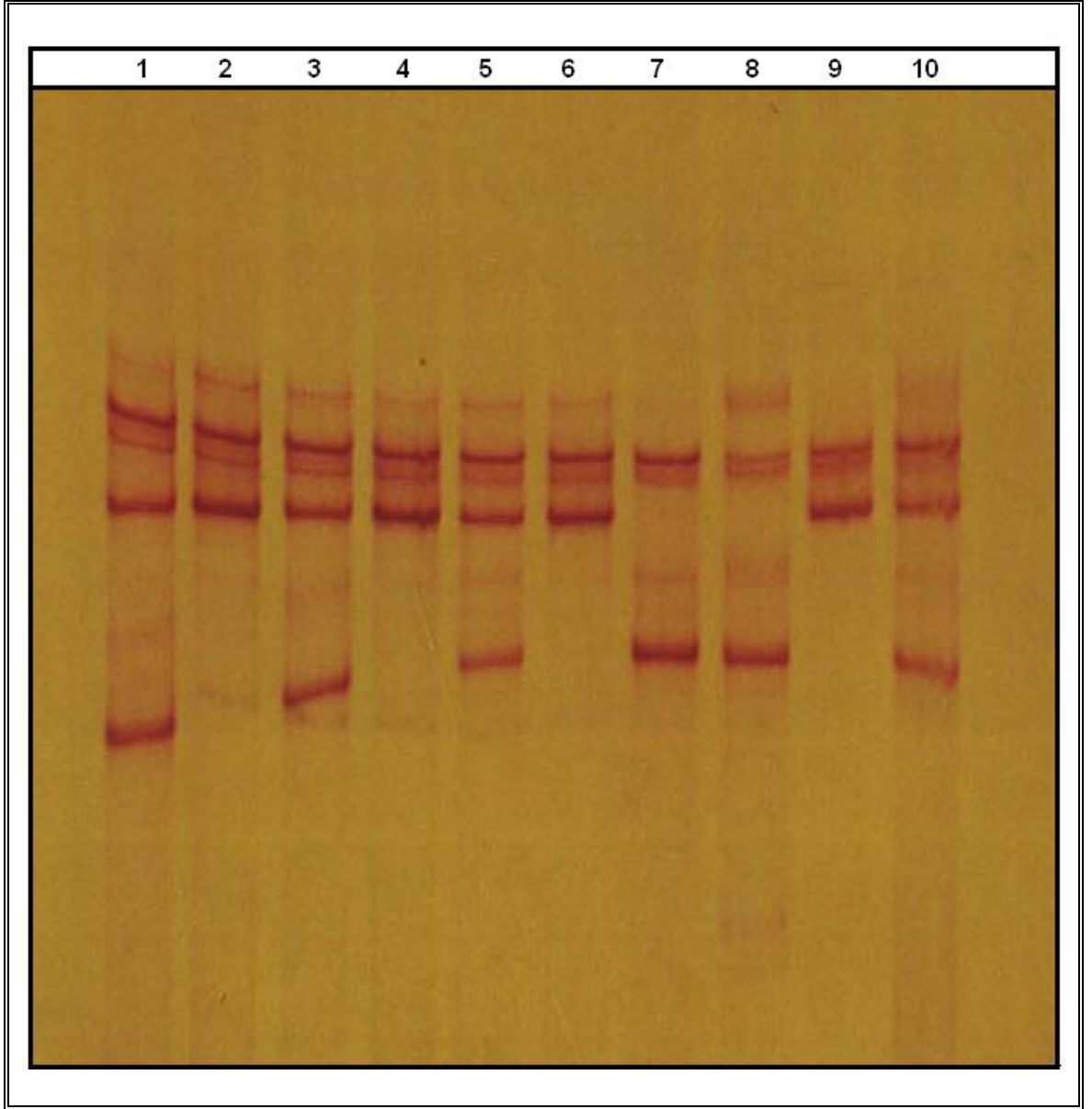
Şekil 4.8’de MTHFR1298A>C mutasyonunu barındıran ve genin 7. eksonuna ait örnek olarak seçilen 10 farklı PCR ürününün verdiği SSCA modelleri gösterilmektedir. Restriksiyon enzim analizi tekniği ile homozigot normal/homozigot mutant genotip gösteren DNA’lara ait PCR ürünleri, bir bantları ortak olmak üzere birbirinden farklı 2 bant verirken, heterozigot mutant genotipe sahip bireylerin ilgili gen bölgesi PCR ürünleri için 3 farklı bant olarak jelde gözlemlendi.

Protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran gen bölgesinde farklı bir mutasyon/polimorfizmin varolup olmadığını belirlemek amacı ile SSCA tekniği uygulandı. SSCA tekniği, klinik olarak tromboemboli ön tanısı almış 270 kişilik hasta grubu için uygulandı. Bu amaçla, protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran gen bölgesi için Malzeme ve Yöntem Bölümü, Tablo 3.6’de belirtilen koşullarda PCR yapıldı. PCR ürünleri, DNA çift sarmallarını tek zincir haline getirmek için denatüre edilerek, formamid içeren SSCA yükleme solüsyonu ile belli oranlarda karıştırıldı. Hazırlanan karışım denatüre olmayan % 10 (37.5:1)’lik SSCA jeline yüklenerek; 18 saat, 200 V’ta, 4°C’de gece boyu elektroforez tekniği ile analiz edildi.

Şekil 4.9’da protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran ve genin 3’ transasyonu yapılmayan bölgesine ait örnek olarak belirlenen 5 farklı PCR ürününün verdiği SSCA modelleri gösterilmektedir. Restriksiyon enzim analizi tekniği ile homozigot normal/homozigot mutant genotip gösteren DNA’lara ait PCR ürünleri, SSCA jelinde 5’er bant halinde gözlenirken, heterozigot mutant genotipe sahip DNA’ların PCR ürünleri hem homozigot normal hem de homozigot mutant örneklerin verdiği tüm bantları göstermektedir. Şekil 4.9’da 3 genotipe ait bantlar net olarak ayrılmaktadır.

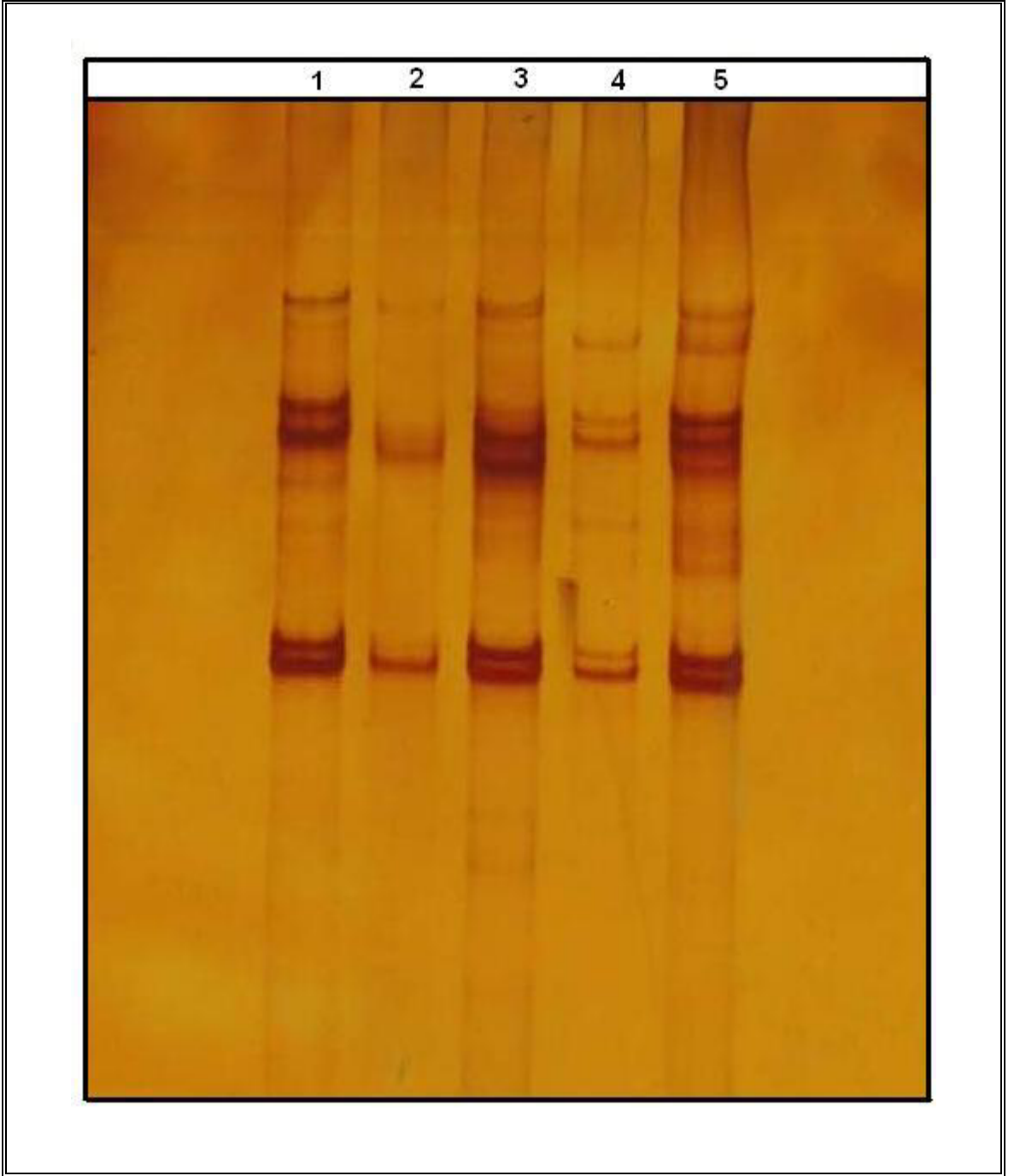
Protrombin20210G>A mutasyonu gen bölgesi PCR ürünlerine ait SSCA analizleri sırasında, daha önce REA tekniği ile homozigot normal genotip olarak belirlenen 5 hastanın PCR ürünlerine ait SSCA modeli, incelenen gen bölgesi için belirlenen SSCA modeline uyumlu değildir. Bununla birlikte yine restriksiyon enzim analiz tekniği ile heterozigot mutant olarak belirlenen 1 hastaya ait SSCA modeli daha önce belirlenmiş olan heterozigot mutant SSCA modeli ile uyuşmamaktadır.

Şekil 4.10'da protrombin20210G>A mutasyonu gen bölgesine ait 15 PCR ürününün SSCA jeli verilmektedir. Jelde 2, 5 ve 12 numaraları ile gösterilen kuyucuklardaki örneklerin daha önceden belirlenmiş homozigot normal/mutant veya heterozigot mutant SSCA bant paternlerine uymadıkları tespit edildi. SSCA jellerinde farklı modeller gösteren bu PCR ürünleri DNA dizi analizi tekniği ile doğrulandı.



Şekil 4.8 : MTHFR1298A>C mutasyonunu barındıran ilgili gen bölgesi PCR ürünlerine ait SSCA çalışması.

- 1-10 numaraları PCR ürünlerinin yüklemesinin yapıldığı kuyucukları göstermektedir.
2, 4, 6, 9 : Homozigot normal (N/N)
1, 3, 5, 10: Heterozigot mutant (MT/N)
7, 8 : Homozigot mutant (MT/MT)



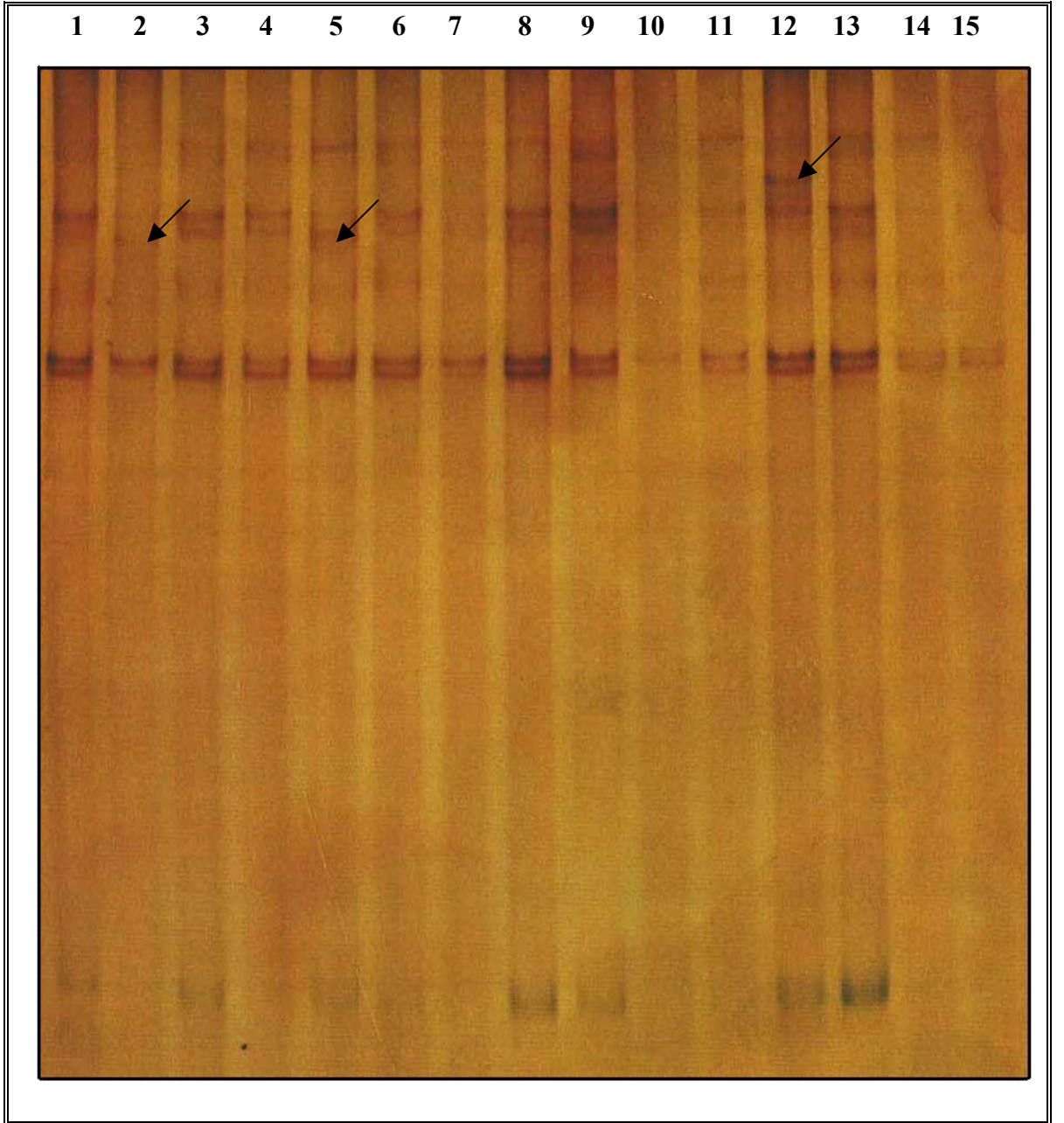
Şekil 4.9 : Protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran ilgili gen bölgesi PCR ürünlerine ait SSCA çalışması.

1-5 numaraları PCR ürünlerinin yüklemesinin yapıldığı kuyucukları göstermektedir.

1-3: Homozigot normal (N/N)

5 : Heterozigot mutant (MT/N)

4 : Homozigot mutant (MT/MT)



Şekil 4.10 : Protrombin20210G>A mutasyonunu barındıran ilgili gen bölgesi SSCA çalışmalarında saptanan farklı SSCA modellerinin gösterilmesi.

1-15 numaraları PCR örneklerinin yüklendiği kuyucukları göstermektedir. 2, 5 ve 12 numaraları ile gösterilen kuyucuklardaki örneklerde daha önce belirlenen SSCA modelinden sapma durumları ok işareti ile gösterilmektedir.
1-15: Homozigot normal (N/N)

4.2.5.4. İstatistiksel Hesaplama Sonuçları

270 tromboemboli ön tanısı almış hasta grubu ile 67 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda, faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları tarandı. Ayrıca genel hasta grubu içersinden seçilen 46 birey DVT ve 60 birey gebelik komplikasyonları olmak üzere 2 alt grup oluşturuldu. Adı geçen mutasyonların 3 hasta grubu ve kontrol gruplarındaki homozigot normal (N/N), heterozigot mutant (MT/N) ve homozigot mutant (MT/MT) durumları tespit edildi. Elde edilen sayısal değerler, Türkiye toplumundaki tromboemboli, DVT ve gebelik komplikasyonları hasta gruplarındaki faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarının sıklıkları belirlenmek üzere birbirinden bağımsız olarak değerlendirildi.

İstatistiksel analizler yapılırken, öncelikle herbir hasta grubu ve kontrol grubu için incelenen mutasyon açısından bireylerin genotipleri belirlendi. Fischer kesin testi p değeri ile genotiplerin bu gruplardaki çıkma olasılıkları değerlendirildi. Daha sonra herbir mutasyon için ilgili hasta ve kontrol gruplarında genotip yüzdeleri ve allel frekansları belirlendi. Hasta ve kontrol gruplarının birbirine oranı olarak adlandırılan OR değerleri hesaplandı. Son olarak, incelenen 4 faktörün ilgili hasta grubunda risk faktörü olup olmadığı χ^2 analizinden elde edilen sonuçlar ile değerlendirildi.

Genel Tromboemboli Grubu :

Genel tromboemboli hasta ve kontrol gruplarında faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları açısından tüm bireylerin genotipleri ve bu genotipleri ile ilgili olarak elde edilen Fischer kesin testi p değeri hesaplandı. İncelenen tüm mutasyonlar için hasta ve kontrol gruplara ait genotip bilgileri ve kesin p değeri Tablo 4.1’de verilmektedir.

Bütün mutasyonlar için genel tromboemboli hasta grubundaki genotip yüzdelerinin kontrol grubuna oranı ile belirlenen OR değerleri Tablo 4.2’de verilmektedir.

Genel tromboemboli hasta grubu üzerinde faktör V Leiden mutasyonunu barındırmayan allel frekansı % 84.6 ve mutasyonu barındıran allel frekansı ise % 14.6;

MTHFR677C>T mutasyonunu barındırmayan allel ait frekansı % 71.85 ve mutasyonu barındıran allel frekansı ise % 28.15; MTHFR1298A>C mutasyonunu barındırmayan allel frekansı % 64 ve mutasyonu barındıran allel frekansı ise % 36 ; protrombin20210G>A mutasyonunu barındırmayan allel frekansı % 95.18 ve mutasyonu barındıran allel frekansı ise % 4.82 olarak belirlendi.

Tablo 4.1 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubu bireylerinin faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarına ilişkin genotipleri.

	MUTASYONLAR							
	Faktör V Leiden		MTHFR677C>T		MTHFR1298A>C		Protrombin20210G>A	
Genotip	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
NN	194	65	138	42	100	25	247	60
MT/N	69	2	112	23	146	35	20	1
MT/MT	7	0	20	2	24	7	3	0
Fischer kesin testi	0,0000007		0,026		0,012		0,026	
NN : Homozigot normal , MT/N : Heterozigot mutant , MT/MT : Homozigot mutant .								

Tablo 4.2 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubunda, Faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları için elde edilen ham olasılık değerleri (OR).

Mutasyonlar	Genotip	Vaka Sayısı	Vaka Yüzdesi (%)	Kontrol Sayısı	Kontrol Yüzdesi(%)	Ham Olasılık
Faktör V Leiden	N/N	194	71,85	65	97	0,00
	MT/N veya MT/MT	76	28,15	1	3	1,00
MTHFR677C>T	N/N	138	51,11	42	62,7	0,00
	MT/N veya MT/MT	132	48,89	25	37,3	1,00
MTHFR1298A>C	N/N	100	37,04	25	62,7	0,00
	MT/N veya MT/MT	170	62,96	42	37,3	1,00
Protrombin20210G>A	N/N	247	91,40	66	98,5	0,00
	MT/N veya MT/MT	23	8,60	1	1,5	9,00

N/N : Homozigot normal , MT/N : Heterozigot mutant , MT/MT : Homozigot mutant .

DVT Grubu:

DVT hasta ve kontrol gruplarında faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları için tüm bireylerin genotipleri ve Fischer kesin testi p değeri belirlendi. İncelenen tüm mutasyonlar için hasta ve kontrol gruplara ait genotip bilgileri ve kesin p değeri Tablo 4.3'de verilmektedir.

Bütün mutasyonlar için DVT hasta grubundaki genotip yüzdelerinin kontrol grubuna oranı ile belirlenen OR değerleri Tablo 4.2'de verilmektedir.

DVT hasta grubu üzerinde faktör V Leiden mutasyonunu barındırmayan ve barındıran allele ait frekansları, sırası ile, % 77 ve % 23; MTHFR677C>T mutasyonunu barındırmayan ve barındıran allel frekansları, sırası ile, % 69.5 , % 30.5; MTHFR1298A>C mutasyonunu barındırmayan ve barındıran allel frekansları, sırası ile, % 59.7 ve % 40.3; protrombin20210G>A mutasyonunu taşımayan ve taşıyan allel frekanslarının sırası ile % 94.5 ve % 5.5 olarak belirlendi.

Tablo 4.3 : DVT hasta ve kontrol grubu bireylerinin faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarına ilişkin genotipleri.

	MUTASYONLAR							
	Faktör V Leiden		MTHFR677C>T		MTHFR1298A>C		Protrombin20210G>A	
Genotip	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	27	65	23	42	17	25	42	60
MT/N	17	2	18	23	21	35	3	1
MT/MT	2	0	5	2	8	7	1	0
Fischer kesin testi	0,0000002		0,063		0,157		0,078	
N/N : Homozigot normal , MT/N : Heterozigot mutant , MT/MT : Homozigot mutant .								

Tablo 4.4 : DVT hasta ve kontrol grubunda, faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları için elde edilen ham olasılık değerleri (OR).

Mutasyonlar	Genotip	Vaka Sayısı	Vaka Yüzdesi (%)	Kontrol Sayısı	Kontrol Yüzdesi(%)	Ham Olasılık
Faktör V Leiden	N/N	27	58,70	65	97	0,28
	MT/N veya MT/MT	19	41,30	2	3	22,22
MTHFR677C>T	N/N	23	50,00	42	62,6	0,80
	MT/N veya MT/MT	23	50,00	25	37,4	1,34
MTHFR1298A>C	N/N	17	36,95	25	37,4	1,00
	MT/N veya MT/MT	29	63,05	42	62,6	0,97
Protrombin20210G>A	N/N	42	91,30	66	98,5	0,93
	MT/N veya MT/MT	4	8,70	1	1,5	8,33

N/N : Homozigot normal , MT/N : Heterozigot mutant , MT/MT : Homozigot mutant .

Gebelik komplikasyonları:

Gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol gruplarında faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları açısından tüm bireylerin genotipleri ve Fischer kesin testi p değerleri tespit edildi. İncelenen tüm mutasyonlar için hasta ve kontrol gruplara ait genotip bilgileri ve kesin p değerleri Tablo 4.5’de verilmektedir.

Bütün mutasyonlar için gebelik komplikasyonları hasta grubundaki genotip yüzdelerinin kontrol grubuna oranı ile belirlenen OR değerleri Tablo 4.6’da verilmektedir.

Gebelik komplikasyonları hasta grubu üzerinde faktör V Leiden mutasyonunu barındırmayan allel frekansı % 90 ve mutasyonu barındıran allel frekansı ise % 10; MTHFR677C>T mutasyonunu taşımayan ve taşıyan allel frekansları sırası ile % 72.5, % 27.5; MTHFR1298A>C mutasyonunu barındırmayan allel frekansı % 67.5 ve mutasyonu barındıran allel frekansı % 32.5; protrombin20210G>A mutasyonunu taşımayan ve taşıyan allel frekanslarının % 98.3 ve % 1.7 olarak tespit edildi.

	MUTASYONLAR							
	Faktör V Leiden		MTHFR677C>T		MTHFR1298A>C		Protrombin20210G>A	
Genotip	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	47	33	29	21	23	12	57	33
MT/N	12	0	29	11	32	16	2	0
MT/MT	1	0	2	1	5	5	1	0
Fischer kesin testi	0,002		0,065		0,174		0,264	

N/N : Homozigot normal , MT/N : Heterozigot mutant , MT/MT : Homozigot mutant .

Tablo 4.5 : Gebelik komplikasyonları grubu bireylerinin faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonlarına ilişkin genotipleri.

Mutasyonlar	Genotip	Vaka Sayısı	Vaka Yüzdesi (%)	Kontrol Sayısı	Kontrol Yüzdesi(%)
Faktör V Leiden	N/N	47	78,33	33	100
	MT/N veya MT/MT	13	21,67	0	0
MTHFR677C>T	N/N	29	48,33	21	63,6
	MT/N veya MT/MT	31	51,67	12	36,4
MTHFR1298A>C	N/N	23	38,33	12	36,4
	MT/N veya MT/MT	37	61,67	21	63,6
Protrombin20210G>A	N/N	57	91,30	33	100
	MT/N veya MT/MT	3	5,00	0	0

tablo 4.6 : Gebelik komplikasyonları grubunda, faktör V Leiden, MTHFR677C>T, MTHFR1298A>C ve protrombin20210G>A mutasyonları için elde edilen ham olasılık değerleri (OR).

Hasta ve kontrol gruplarında incelenen tüm mutasyonlar ile ilgili olarak belirlenen genotiplerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Kikare (χ^2) analizinden yararlanıldı.

Genel Tromboemboli Grubu :

Tablo 4.7 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubu arasında, faktör V Leiden mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	194	65	207.5	51.5	0.88	3.54
MT/N	69	2	56.9	14.1	2.57	10.38
MT/MT	7	0	5.6	1.4	0.35	1.4

Genel $\chi^2=19.12$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2

χ^2 tablosunda 2 serbestlik derecesine bakılarak 0.05 olasılık düzeyine göre kikare tablo değeri (χ^2_t) bulundu [Tablo 4.19.]. $\chi^2_t = 5.99$

Genel tromboemboli hasta ve kontrol grupları arasında, faktör V Leiden mutasyonu için hesaplanan kikare değerinin (19.12) tablo kikare değerinden (5.99) büyük olduğu görüldü.

$\chi^2 \geq \chi^2_t$ ise farklılık önemlidir.

Tablo 4.8 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubu arasında MTR677C>T mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	138	42	144.2	35.8	0.27	1.07
MT/N	112	23	108.1	26.9	0.14	0.57
MT/MT	20	2	17.6	4.4	0.33	1.31

Genel $\chi^2 = 3.69$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2

2 serbestlik derecesine ve 0.05 olasılık düzeyine göre kıkare tablo değeri (χ^2_t) belirlendi. $\chi^2_t = 5.99$

MTHFR677C>T mutasyonu, genel tromboemboli hasta ve kontrol grupları arasında hesaplanan kıkare değeri (3.69) tablo kıkare değerinden (5.99) küçüktür.

$\chi^2 < \chi^2_t$ ise farklılık önemsizdir.

Tablo 4.9 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR1298A>C mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	100	25	100.1	24.9	0.0001	0.0004
MT/N	146	35	144.9	36	0.008	0.028
MT/MT	24	7	24.8	6.17	0.03	0.11

Genel $\chi^2 = 0.1765$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2 serbestlik derecesi ve 0.05 olasılık düzeyine bakılarak kıkare tablo değeri (χ^2_t) elde edildi. $\chi^2_t = 5.99$

MTHFR1298A>C mutasyonunun, genel tromboemboli hasta ve kontrol grupları hesaplanan kıkare değerinin (0.1765) tablo kıkare değerinden (5.99) küçük olduğu görülmektedir.

$\chi^2 < \chi^2_t$ ise farklılık önemsizdir.

Tablo 4.10 : Genel tromboemboli hasta ve kontrol grubu arasında protrombin 20210G>A mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	247	66	250.7	62.3	0.05	0.22
MT/N	20	1	16.8	4.2	0.61	2.44
MT/MT	3	0	2.4	0.6	0.5	0.6

Genel $\chi^2 = 4.07$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2

2 serbestlik derecesi ve 0.05 olasılık düzeyine göre χ^2 tablosuna bakılarak kıkare tablo değeri $\chi^2_t = 5.99$ olarak belirlendi.

Protrombin20210G>A mutasyonunun, genel tromboemboli hasta ve kontrol grupları arasında hesaplanan kıkare değeri (4.07) tablo kıkare değerinden (5.99) küçüktür.

$$\chi^2 < \chi^2_t \text{ ise farklılık önemsizdir.}$$

DVT grubu:

Tablo 4.11 : DVT hasta ve kontrol grubu arasında, faktör V Leiden mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	27	65	37.7	54.3	3.04	2.11
MT/N	17	2	7.8	11.2	10.85	7.56
MT/MT	2	0	0.82	1.2	1.69	1.2

Genel $\chi^2=26.45$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2 serbestlik derecesine göre χ^2 tablosuna bakılarak 0.05 olasılık düzeyine göre kıkare tablo değeri (χ^2_t) belirlendi. $\chi^2_t = 5.99$

Faktör V Leiden mutasyonunun, DVT hasta ve kontrol grupları arasında hesaplanan kıkare değeri (26.45) tablo kıkare değerinden (5.99) dikkate değer ölçüde büyüktür.

$$\chi^2 \geq \chi^2_t \text{ ise farklılık önemlidir.}$$

Tablo 4.12 : DVT hasta ve kontrol grubu arasında, MTFR677C>T mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	23	42	26.7	38.4	0.51	0.34
MT/N	18	23	16.8	24.2	0.09	0.06
MT/MT	5	2	2.9	4.1	1.52	1.08

Genel $\chi^2 = 3.6$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2

2 serbestlik derecesine χ^2 tablosundan bakılarak 0.05 olasılık düzeyine göre kıkare tablo değeri (χ^2_t) bulundu. $\chi^2_t = 5.99$

MTHFR677C>T mutasyonunun, DVT hasta ve kontrol grupları arasında hesaplanan kıkare değerinin (3.6) tablo kıkare değerinden (5.99) küçük olduğu tespit edildi.

$\chi^2 < \chi^2_t$ ise farklılık önemsizdir.

Tablo 4.13 : DVT hasta ve kontrol grubu arasında, MTHFR1298A>C mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	17	25	17.2	24.8	0.002	0.002
MT/N	21	35	22.9	33	0.16	0.12
MT/MT	8	7	6.2	8.9	0.52	0.41

Genel $\chi^2 = 1.21$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2 serbestlik derecesine bakılarak χ^2 tablosundan 0.05 olasılık düzeyine göre kıkare tablo değeri (χ^2_t) bulundu ($\chi^2_t = 5.99$).

MTHFR1298A>C mutasyonunun, DVT hasta ve kontrol grupları arasında hesaplanan kıkare değeri (1.21) tablo kıkare değerinden (5.99) küçüktür.

$\chi^2 < \chi^2_t$ ise farklılık önemsizdir.

Tablo 4.14 : DVT hasta ve kontrol grubu arasında, protrombin20210G>A mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	42	66	44.3	63.7	0.12	0.08
MT/N	3	1	1.6	2.4	1.23	0.82
MT/MT	1	0	0.4	0.6	0.9	0.6

Genel $\chi^2 = 3.75$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2

χ^2 tablosunda 2 serbestlik derecesine bakılarak 0.05 olasılık düzeyine göre kıkare tablo değeri (χ^2_t) belirlendi ($\chi^2_t = 5.99$).

Protrombin20210G>A mutasyonunun, DVT hasta ve kontrol grupları arasında hesaplanan kıkare değeri (3.75) tablo kıkare değerinden (5.99) küçüktür.

$$\chi^2 < \chi^2_t \text{ ise farklılık önemsizdir.}$$

Gebelik komplikasyonları:

Tablo 4.15 : Gebelik komplikasyonları hasta grubu ve kontrol grubunda faktör V' in χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	47	33	52	28	0.48	0.89
MT/N	12	0	7.8	4.2	2.26	4.2
MT/MT	71	0	0.65	0.35	0.19	0.35

Genel $\chi^2=8.37$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2 serbestlik derecesine ve 0.05 olasılık düzeyine göre kıkare tablo değeri (χ^2_t) bulundu ($\chi^2_t = 5.99$).

Faktör V Leiden mutasyonunun, gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol grupları arasında hesaplanan kıkare değerinin (8.37) tablo kıkare değerinden (5.99) büyük olduğu görülmektedir.

$$\chi^2_t \geq \chi^2 \text{ ise farklılık önemlidir.}$$

Tablo 4.16 : Gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol grubu arasında MTFR677C>T mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	29	21	32.5	17.5	0.38	0.7
MT/N	29	11	26	14	0.35	0.64
MT/MT	2	1	1.95	1.05	0.001	0.002

Genel $\chi^2 = 2.07$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2 serbestlik derecesine ile 0.05 olasılık düzeyine göre kıkare tablo değeri (χ^2_t) belirlendi ($\chi^2_t = 5.99$).

MTHFR677C>T mutasyonunun, gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol grupları arasında hesaplanan kıkare değerinin (2.07) tablo kıkare değerinden (5.99) küçük olduğu belirlendi.

$\chi^2 < \chi^2_t$ ise farklılık önemsizdir.

Tablo 4.17 : Gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol grubu arasında, MTHFR1298A>C mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	23	12	22.75	12.25	0.03	0.005
MT/N	32	16	31.2	16.8	0.02	0.04
MT/MT	5	5	6.5	3.5	0.35	0.64

Genel $\chi^2 = 1.06$

Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2

χ^2 tablosu 2 serbestlik derecesine bakılarak 0.05 olasılık düzeyine göre kıkare tablo değeri (χ^2_t) tespit edildi. $\chi^2_t = 5.99$

Gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol grupları arasında, MTHFR1298A>C mutasyonunun hesaplanan kıkare değeri (1.06) tablo kıkare değerinden (5.99) küçüktür.

$\chi^2 < \chi^2_t$ ise farklılık önemsizdir.

Tablo 4.18 : Gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol grubu arasında, protrombin20210G>A mutasyonuna ait χ^2 değerler tablosu.

Genotip	Gözlenen		Beklenen		Fark ² /Beklenen= χ^2	
	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
N/N	57	33	58.5	31.5	0.04	0.07
MT/N	2	0	1.3	0.7	0.38	0.7
MT/MT	1	0	0.65	0.35	0.19	0.35

Genel $\chi^2 = 1.73$

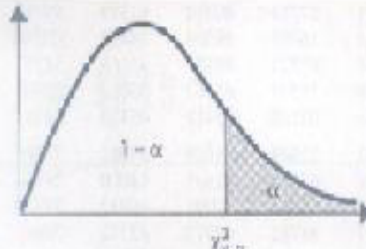
Serbestlik derecesi = (sıra-1)*(sütun-1) = 2

2 serbestlik derecesine göre χ^2 tablosuna bakılarak 0.05 olasılık düzeyine göre kıkare tablo değeri (χ^2_t) bulunur. $\chi^2_t = 5.99$

Protrombin20210G>A mutasyonunun, gebelik komplikasyonları hasta ve kontrol grupları arasında hesaplanan kıkare değeri (1.73) tablo kıkare değerinden küçüktür.

$\chi^2 < \chi^2_t$ ise farklılık önemsizdir.

Tablo 4.19 : χ^2 dağılım fonksiyonunun eşik değerleri tablosu [83].



Bu çizelge, seçilmiş olasılıklar için, $\alpha = P(\chi^2_v > \chi^2_{v,\alpha})$ eşitliğini sağlayan $\chi^2_{v,\alpha}$ değerlerini gösterir. Burada χ^2_v , serbestlik derecesi v olan ki-kare rasal değişkenidir. Şöçelimi 10 serbestlik dereceli bir-ki-kare rasal değişkeninin 15.99'dan büyük olma olasılığı 0.100'dür.

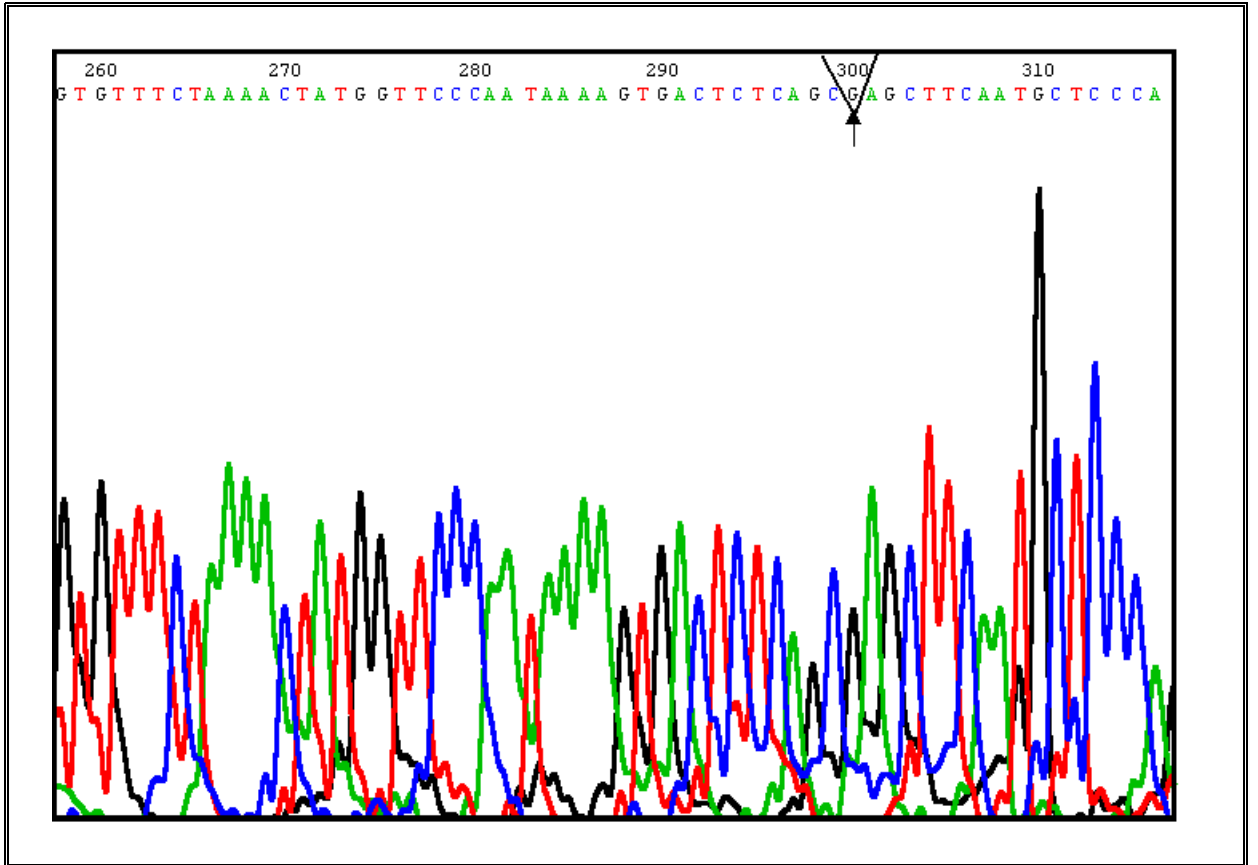
v	α									
	.995	.990	.975	.950	.900	.100	.050	.025	.010	.005
1	0.00393	0.0157	0.00982	0.01393	0.0198	2.71	3.84	5.02	6.63	7.88
2	0.0100	0.0201	0.0206	0.103	1.211	4.61	5.99	7.38	9.21	10.60
3	0.072	0.112	0.216	0.252	0.584	6.25	7.81	9.35	11.34	12.84
4	0.209	0.289	0.484	0.711	1.064	7.78	9.49	11.14	13.28	14.86
5	0.412	0.534	0.831	1.145	1.51	9.24	11.09	12.83	15.09	16.75
6	0.676	0.872	1.24	1.64	2.20	10.64	12.59	14.45	16.81	18.55
7	0.989	1.24	1.69	2.17	2.83	12.02	14.07	16.01	18.48	20.28
8	1.34	1.65	2.18	2.73	3.49	13.36	15.51	17.53	20.09	21.96
9	1.73	2.09	2.70	3.33	4.17	14.68	16.92	19.02	21.67	23.59
10	2.16	2.56	3.25	3.84	4.87	15.99	18.31	20.48	23.21	25.19
11	2.60	3.05	3.78	4.37	5.58	17.28	19.68	21.92	24.73	26.76
12	3.07	3.57	4.40	5.03	6.30	18.55	21.03	23.34	26.22	28.30
13	3.57	4.11	5.01	5.69	7.04	19.81	22.35	24.74	27.69	29.82
14	4.07	4.66	5.63	6.37	7.79	21.06	23.68	26.12	29.14	31.32
15	4.60	5.22	6.26	7.06	8.55	22.31	25.00	27.49	30.58	32.80
16	5.14	5.81	6.91	7.76	9.31	23.54	26.33	28.85	32.00	34.27
17	5.70	6.41	7.58	8.47	10.09	24.77	27.59	29.19	33.41	35.72
18	6.26	7.01	8.23	9.19	10.86	25.99	28.87	31.53	34.81	37.16
19	6.84	7.63	8.91	9.92	11.63	27.20	30.14	32.85	36.19	38.58
20	7.43	8.26	9.59	10.65	12.44	28.41	31.44	34.17	37.57	40.00
21	8.03	8.90	10.28	11.39	13.24	29.62	32.67	35.48	38.93	41.40
22	8.64	9.54	10.98	12.14	14.04	30.81	33.92	36.78	40.29	42.80
23	9.26	10.20	11.69	12.89	14.85	32.01	35.17	38.08	41.64	44.18
24	9.89	10.86	12.40	13.65	15.66	33.20	36.42	39.36	42.91	45.56
25	10.53	11.52	13.12	14.41	16.47	34.38	37.65	40.65	44.31	46.93
26	11.16	12.20	13.84	15.18	17.29	35.56	38.89	41.92	45.64	48.29
27	11.81	12.88	14.57	15.95	18.11	36.74	40.14	43.19	46.93	49.64
28	12.46	13.56	15.31	16.72	18.94	37.92	41.34	44.46	48.28	50.99
29	13.12	14.26	16.05	17.51	19.77	39.09	42.55	45.72	49.59	52.34
30	13.79	14.95	16.79	18.29	20.60	40.26	43.77	46.98	50.89	53.67
40	20.71	22.16	24.45	26.51	29.03	51.81	55.75	59.34	65.65	66.77
50	27.99	29.71	32.36	34.76	37.69	63.17	67.50	71.42	76.15	79.49
60	35.53	37.48	40.48	43.19	46.46	74.40	79.08	83.50	88.38	91.95
80	43.28	45.99	48.76	51.14	55.33	85.53	90.53	93.02	100.4	104.2
100	51.17	53.54	57.15	60.29	64.28	96.58	101.9	106.6	112.3	116.3
50	59.20	61.75	65.65	69.13	73.29	107.5	113.1	118.1	124.1	128.3
100	67.53	70.46	74.22	77.93	82.36	118.3	124.3	129.6	135.8	140.2

4.2.5.5.DNA Dizi Analiz Bulguları

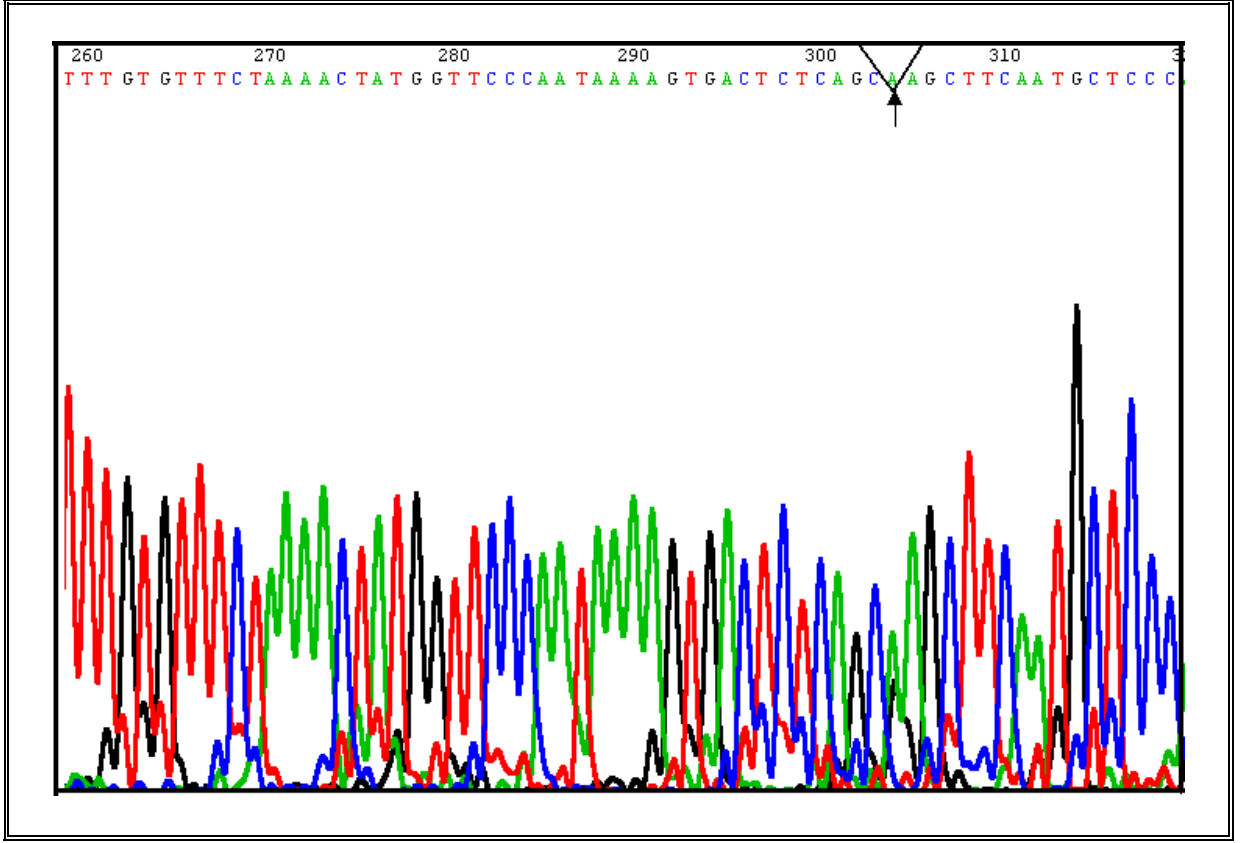
Protrombin20210G>A mutasyonu gen bölgesi yapılan SSCA çalışmaları sonucunda; bu gen bölgesi ile ilgili olarak homozigot normal, homozigot mutant ve heterozigot mutant genotiplere ait SSCA modelleri belirlendi. Bu modellerden değişiklik gösteren 8 hastaya ait PCR örneği tespit edildi. Bu PCR örneklerinde, bilinmeyen bir mutasyon ya da polimorfizmin varlığının belirlenmesi için PCR ürünlerinin ait olduğu hasta DNA'ları tespit edildi. İncelenecek DNA'ların protrombin20210G>A mutasyonunun belirlenmesi için yapılan ve tezin Malzeme ve Yöntem Bölümü'nde belirtilen PCR koşullarına uygun olarak PCR'ları yapıldı. Daha sonra elde edilen PCR'lar agaroz jelde incelendi ve yoğun bantlar halinde gözlemlendi. PCR örneklerinin, ABI firmasına ait hazır kitlerden elde edilen ve floresan ile PCR ürünlerini işaretlemesini hedefleyen DNA dizi analizi PCR'ı yapıldı. PCR örnekleri PCR ABI-3100 Avant otomatize DNA dizi analizi aletinde bulunan traylere yüklendi ve yine kitin içinde bulunan POP-6 DNA dizi analizi jelinde yaklaşık 1 saat yürütüldü. Elektroforez işleminin başlamasını takiben geçen süre sonunda sisteme bağlı bir bilgisayarda dizilere ait pikler belirdi. Protrombin20210G>A mutasyonuna ait gen bölgesi için yapılan DNA dizi analizi çalışmaları sonuçları protrombin gen bölgesine ait dizi bilgisi ile karşılaştırılarak kontrol edildi [Şekil 4.11]. Sonuçlara göre, ilgili gen bölgesine yönelik yapılan SSCA çalışmasında farklılık tespit edilen örneklerde herhangi bir mutasyon ya da varyasyon tespit edilmedi. DNA dizi analizi çalışmaları sırasında kontrol DNA olarak homozigot normal ve heterozigot mutant genotipte bireylere ait DNA'lar kullanıldı [Şekil 4.12, 4.13].

5'...TCTAGAAACAGTTGCCTGGCAGGGGAATACTGATGTGACCTTGAACCTG
 ACTCTATTGGAAACCTCATCTTTCTTCTTCAGAGCCCCTTTAACAACCGCTG
 GTATCAAATGGGCATCGTCTCATGGGGTGAAGGCTGTGACCGGGATGGGAA
 ATATGGCTTCTACACACATGTGTTCCGCCTGAAGAAGTGGATACAGAAGGT
 CATTGATCAGTTTGGAGAGTAGGGGGCCACTCATATTCTGGGCTCCTGGAAC
 CAATCCCGTGAAAGAATTATTTTTGTGTTTCTAAAACCTATGGTTCCCAATAA
 AAGTGACTCTCAGC**G**AGCCTCAATGCTCCCAGTGCTAT...3'

Şekil 4.11 : Protrombin20210G>A mutasyonu gen bölgesi [84].



Şekil 4.12 : Protrombin20210G>A mutasyonu için homozigot normal genotipi olan PCR örneğinin gen dizisinin DNA dizi analizi tekniği ile gösterimi.



Şekil 4.133 : Protrombin20210G>A mutasyonu için heterozigot mutant genotipi olan PCR örneğinin gen dizisinin DNA dizi analizi tekniği ile gösterimi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

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 düşünülen kalıtsal pıhtılaşma bozuklukları ile ilgili moleküler tanı çalışmaları önem kazanmaktadır. Bu doğrultuda kanın pıhtılaşmasında görev alan çeşitli proteinlerin genlerinde meydana gelen mutasyonlar incelenmektedir.

Otozomal dominant kalıtım gösteren faktör V Leiden mutasyonu APC'ye direnç gösteren bir nokta mutasyonudur [20]. Faktör V Leiden mutasyonunun tromboz riskini, heterozigot ve homozigot mutant bireylerde sırası ile yaklaşık 8 ve 80 kat arttırdığı bilinmektedir [23, 24]. Ayrıca faktör V Leiden mutasyonunu taşıyan kadınların gebelikleri süresince tromboz, tekrarlı düşük ve preeklampsi gibi gebelik sorunları ile karşılaştıkları bildirilmektedir [33]. Total homosistein seviyelerinde artışın da hem arteriyel hem de venöz tromboz için yaygın bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Homosistein metabolizmasında bozukluğa neden olan ve en iyi bilinen mutasyonlar MTHFR gen bölgesindeki MTHFR677C>T ve MTHFR1298A>C nokta mutasyonlarıdır [44]. Ayrıca, protrombin geninin translasyonu yapılmayan 3' ucundaki 20210. nükleotidindeki guanin bazının adenin bazına dönüşümüne neden olan mutasyon, VTE için önemli bir risk faktörüdür [59].

Bu çalışmada ilk olarak, venöz ve arteriyel tromboz ile ilişkili olduğu düşünülen faktör V Leiden, protrombin20210G>A, MTHFR677C>T ve MTHFR1298A>C mutasyonlarının Türkiye tromboemboli hasta ve kontrol gruplarında görülme sıklıklarının belirlenmesi hedeflendi. Ayrıca, DVT ve gebelik komplikasyonları alt gruplarında adı geçen mutasyonlar incelenerek, elde edilen veriler genotip-fenotip ilişkisi çerçevesinde değerlendirildi. İlgili mutasyonlara ait gen bölgeleri üzerinde yeni mutasyon veya varyasyonların varlığını belirlemek amacı ile SSCA ve DNA dizi analizi tekniklerinden yararlanıldı.

Bu tez çalışmasında, 270 kişilik genel hasta grubunda ve genel hasta grubundan meydana getirilen 46 ve 60 kişilik, sırası ile, DVT ve gebelik komplikasyonları alt gruplarında trombofilik faktörler açısından DNA analizi yapıldı. Kontrol grubu ise

birbirleri ile akrabalık ilişkisi olmayan ve tromboz hikayesi bulunmayan bireylerden seçildi. Genel kontrol grubu 67 kişiden, gebelik komplikasyonları kontrol grubu ise gebelik sürecini problemsiz tamamlamış 33 kadından oluşturuldu.

Genel tromboemboli grubunda, faktör V Leiden mutasyonu hasta grubunda toplam 76 (% 28.15) bireyde belirlendi. Genel kontrol grubunda ise 2 (%3) birey mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı belirlenirken, bu grupta homozigot mutant birey tespit edilmedi. Faktör V Leiden mutasyonu otozomal dominant kalıtım göstermekte ve homozigot mutant genotipin meydana getirdiği tromboz riski heterozigot genotipe kıyas ile çok daha fazla olmaktadır. Bu nedenle kontrol grupta adı geçen mutasyon için homozigot mutant bireyin bulunmaması beklenen bir durumdur. Faktör V Leiden mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kıkare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=19.12$, $p=0.0000007$, $OR=12.73$). Bu verilere göre, faktör V Leiden mutasyonu tromboz için dikkate değer bir risk faktörü olarak belirlendi.

Genel tromboemboli grubunda, MTHFR677C>T mutasyonu hasta grubunda 132 (% 48.89) bireyde tespit edildi. Genel kontrol grubunda ise 23 (% 34.3) birey mutasyonu heterozigot ve 2 (% 3) birey ise homozigot mutant olarak taşımaktadır. MTHFR677C>T mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kıkare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=3.69$, $p=0.026$, $OR=1.606$). Bu verilere göre, MTHFR677C>T mutasyonunun hem hasta hem de kontrol gruplarında eş dağılım gösterdiği için Türkiye tromboemboli hastalarında risk faktörü olmadığı görülmektedir.

MTHFR1298A>C mutasyonu, genel tromboemboli hasta grubunda 170 (% 62.96) bireyde görüldü. Genel kontrol grubunda ise 35 (% 52.2) birey mutasyonu heterozigot ve 7 (% 10.5) birey ise homozigot mutant olarak tespit edildi. MTHFR1298A>C mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kıkare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=0.1765$, $p=0.112$, $OR=1.012$). İstatistiki sonuçlar, MTHFR1298A>C mutasyonunun tromboemboli hastalarında risk faktörü olmadığını göstermektedir.

Protrombin20210G>A mutasyonu, genel tromboemboli hasta grubunda 23 (% 8.52) bireyde tespit edildi. Genel kontrol grubunda ise 1 (% 1.5) birey mutasyonu heterozigot olarak taşımaktadır. Kontrol grubunda homozigot mutant birey tespit edilmedi. Protrombin20210G>A mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kikare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=4.07$, $p=0.026$, $OR=9.2$). Bu çalışma kapsamında, protrombin20210G>A mutasyonunun Türkiye tromboemboli hastalarında önemli bir risk faktörü olmadığı belirlendi. İlgili mutasyon için hasta grubunda elde edilen mutasyon yüzdesi kontrol gruba oran ile farklılık göstermektedir. Protrombin20210G>A ilerde daha geniş serileri kontrol gruplarında incelenmesinin sonuçlar açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

Dünyanın farklı bölgelerinde, tromboza yol açan genetik risk faktörlerinin yayılımı hem hasta hem de genel popülasyonunda değişiklik göstermektedir. Faktör V Leiden ve protrombin mutasyonları tromboza yol açan en yaygın risk faktörleri olarak bilinmektedir. Türkiyedeki trombozlu hastalarda yapılan bir çalışmada, 146 trombozlu hastanın 45'inde (% 30.8) faktör V Leiden mutasyonu tespit edilmiştir. Faktör V Leiden mutasyonlu vakaların, 7'si (% 4.8) homozigot mutant ve 38'i (% 26) heterozigot mutant olarak belirtilmiştir. Protrombin20210G>A mutasyonu, 146 trombozlu hastanın 10'unda (% 6.8) bulunmuştur. 6 hastada ise her iki mutasyonun birlikte bulunduğu bildirilmektedir [85]. Bu bulgular ile benzer olarak, bu tez çalışması kapsamında faktör V Leiden mutasyonunun Türkiye popülasyonunda tromboz patofizyolojisinde etkili olduğunu ortaya konmaktadır.

Meksika popülasyonuna ait 37 trombofilik vaka ve 50 sağlıklı kontrol birey üzerinde yapılan bir çalışmada, faktör V Leiden mutasyonu hasta grubunda 4 bireyde heterozigot, protrombin20210G>A mutasyonu 5 bireyde heterozigot ve MTFR677C>T mutasyonu ise 16 hasta bireyde heterozigot ve 6 bireyde homozigot mutant olarak belirtilmektedir. Bu çalışmanın bulgularına göre faktör V Leiden mutasyonu (%10.8) protrombin20210G>A mutasyonuna (%13.5) göre trombofilik hastalarda daha az yaygın olarak bildirilmektedir [86]. Bu araştırma tez çalışmasının bulguları ile zıtlık göstermektedir. Bu durum protrombin20210G>A mutasyonunun ilgili coğrafik alanda yayılımının daha fazla olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Ancak aynı

çalışmada [86] MTHFR677C>T mutasyonu ilgili populasyonda hem sağlıklı kontroller hem de hasta grubunda yüksek dağılım göstermekte ve tromboz için bir risk faktörü olarak kabul edilmemektedir. Bu sonuç tez çalışmasının bulguları ile benzerdir .

DVT grubunda, faktör V Leiden mutasyonunu 46 kişiden oluşan hasta grubunda 19 (% 41.4) bireyde tespit edildi. Genel kontrol grubunda ise 2 (%3) birey mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı belirlenirken, bu grupta homozigot mutant birey belirlenmedi. Faktör V Leiden mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kikare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=26.45$, $p=0.0000002$, $OR=22.87$). Bu verilere göre, faktör V Leiden mutasyonu DVT tanılı vakalarda önemli derecede etkin bir risk faktörü olarak görülmektedir.

DVT grubunda, MTHFR677C>T mutasyonunu hasta grubunda 23 (% 50) bireyde tespit edildi. Genel kontrol grubunda ise 23 (% 34.3) birey mutasyonu heterozigot ve 2 (% 3) birey ise homozigot mutant olarak taşımaktadır. MTHFR677C>T mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kikare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=3.6$, $p=0.063$, $OR=1.68$). Buna göre, MTHFR677C>T mutasyonu Türkiye DVT hasta grubu için risk faktörü olarak görülmemektedir.

MTHFR1298A>C mutasyonu, DVT hasta grubunda 29 (% 63.05) bireyde görüldü. Genel kontrol grubunda ise 35 (% 52.2) birey mutasyonu heterozigot ve 7 (% 10.4) birey ise homozigot mutant olarak tespit edildi. MTHFR1298A>C mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kikare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=1.21$, $p=0.157$, $OR=0.93$). Bu verilere göre, MTHFR1298A>C mutasyonunun Türkiye DVT hastalarında bir risk faktörü olmadığı görülmektedir.

Protrombin20210G>A mutasyonu, DVT hasta grubunda 4 (% 9) bireyde belirlendi. Genel kontrol grubunda ise 1 (% 1.5) birey mutasyonu heterozigot olarak kalıtmaktadır. Kontrol grubunda homozigot mutant birey tespit edilmedi. Protrombin20210G>A mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's

kesin p testi ve kıkare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=3.75$, $p=0.078$, $OR=8.6$). Bu tez çalışması kapsamında, protrombin20210G>A mutasyonu Türkiye DVT hastaları için önemli bir risk faktörü olarak belirlenmemiş olup, daha geniş kontrol serili çalışmaların yapılması uygun grlmektedir.

Arjantin populusyonunda VTE tanılı hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda faktör V Leiden mutasyonu % 10.4 oranında bulundu [87]. Bizim alışma bulgularımız ile bu değer karşılaştırıldığında Türkiye DVT hasta grubunda adı geçen mutasyon için frekansın çok daha yüksek olduğu grlmektedir. Hasta ve kontrol grupları istatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında, aralarında önemli derecede fark gözlenmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda, kontrol grup birey sayısının arttırılmasının istatistiki anlamda yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın bulgularına zıt olarak, Grossman ve diğ. 300 DVT tanılı hasta ve 410 sağlıklı bireylerde yaptıkları çalışmada, faktör V Leiden mutasyonun hasta ve kontrol gruplarında eş oranda görüldüğü bildirmektedirler [56]. Bu bulgu, araştırmanın sonuçları ile tamamen zıtlık içermektedir. Faktör V Leiden mutasyonu hem bu çalışmada hem de diğer populusyonlarda yapılan çok sayıdaki çalışmalarda tromboz açısından önemli bir risk faktörü olarak bulunmuştur. İlgili çalışmanın [56] hasta ve kontrol birey sayılarının da istatistiki açıdan yeterli sayıda olması, faktör V Leiden mutasyonunun o coğarafik bölgedeki populusyonda yayılımın fazla olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Tez çalışmasının sonuçları ile benzer olarak, Yanhui Lu. ve diğ. [88] 2002'de in populusyonunda yaptıkları bir çalışmada, faktör V geni Leiden (1691 G>A) mutasyonu ve protrombin20210 G>A mutasyonunun çok az sıklıkta görüldüğünü, bunun aksine MTHFR677C>T mutasyonunun in toplumu üzerinde çok yaygın olduğunu gösterdiler. Bu alışma kapsamında protrombin20210G>A mutasyonu genel tromboemboli ve DVT hasta gruplarında kontrol gruplara oran ile yüksek frekanlarda bulundu. Ancak yapılan istatistiksel analizler sonucunda büyük olasılık ile kontrol grubu birey sayısına bağlı olarak adı geçen mutasyonun tromboz açısından önemli bir risk faktörü olmadığı saptandı. Bauder ve ark 103 kişiden oluşan DVT tanılı hasta grubu üzerinde protrombin20210G>A mutasyonunun % 4.8 oranında tespit ettiklerini bildirdiler. Bu

değerlerin risk faktörü olduğu belirtilmekte ve bizim sonuçlarımız ile çelişmektedir [89].

Gebelik komplikasyonları grubunda, faktör V Leiden mutasyonunu hasta grubunda 13 (% 21.67) bireyde tespit edildi. Gebelik komplikasyonları kontrol grubunda ise adı geçen mutasyon için pozitif birey görülmedi. Faktör V Leiden mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kıkare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=8.37$, $p=0.002$, $OR=0$). Bu verilere göre, faktör V Leiden mutasyonu kadınlarda gebelik süresince pıhtı oluşumuna bağlı tekrarlayan düşüklükler, ölü doğum vb. gebelik komplikasyonları ile ilişkilendirildi.

Gebelik komplikasyonları grubunda, MTHFR677C>T mutasyonunu hasta grubunda 31 (% 51.7) bireyde tespit edildi. Bu vakaların, 29'u (% 48.3) mutasyonu heterozigot ve 2'si (% 3.4) ise homozigot mutant olarak taşımaktadır. Gebelik komplikasyonları kontrol grubunda, 11 (% 33.3) birey mutasyonu heterozigot ve 1 (% 3.1) birey ise homozigot mutant olarak tespit edildi. MTHFR677C>T mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kıkare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=2.07$, $p=0.065$, $OR=1.871$). MTHFR677C>T mutasyonu kadınlarda gebelikleri süresince risk faktörü olarak görülmemektedir.

MTHFR1298A>C mutasyonu, gebelik komplikasyonları hasta grubunda 37 (% 61.7) bireyde tespit edildi. Gebelik komplikasyonları kontrol grubunda ise 16 (% 48.5) birey mutasyonu heterozigot ve 5 (% 15.1) birey ise homozigot mutant olarak tespit edildi. MTHFR1298A>C mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kıkare analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=1.06$, $p=0.174$, $OR=0.919$). Bu verilere göre, MTHFR1298A>C mutasyonunun gebelik döneminde bir risk faktörü olmadığı saptandı.

Protrombin20210G>A mutasyonu, gebelik komplikasyonları hasta grubunda 3 (% 5) bireyde tespit edildi. Gebelik komplikasyonları kontrol grubunda ise adı geçen mutasyon için mutant birey tespit edilmedi. Protrombin20210G>A mutasyonu için hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerin genotipleri, Fischer's kesin p testi ve kıkare

analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($\chi^2=1.73$, $p=0.264$, $OR=0$). Bu tez çalışması kapsamında, protrombin20210G>A mutasyonu kadınlarda gebelik döneminde önemli bir risk faktörü olarak bulunmadı.

Martinelli ve diğ. [90] yaptıkları retrospektif bir çalışmada, faktör V Leiden mutasyonunu homozigot mutant olarak kalıtan 55 kadın ve faktör V Leiden ile protrombin20210G>A mutasyonunu aynı anda kalıtan 39 kadının gebelik süreçlerini 182 normal kadın ile karşılaştırdılar. Gebeliğin 3. döneminde tromboz meydana gelme yayılımı faktör V Leiden homozigotlarında % 15.8 ($OR:41.3$), çifte heterozigotlarda % 4 ($OR:0.2$) ve normal kadınlarda % 0.05 olarak belirtildi. Faktör V Leiden ve protrombin20210G>A mutasyonlarının venöz tromboz için önemli risk faktörü olduğunu bildirmek ile birlikte homozigot mutasyon için gebelik süresince tedavi önerilmektedir [90]. Faktör V Leiden mutasyonu ile ilgili veriler araştırmanın sonuçlarını desteklerken, protrombin mutasyonu için sonuçlar kontrol grup sayısına bağlı olarak veya popülasyona bağlı olarak değişebildiğini göstermektedir.

Bokerawa ve diğerlerinin, gebelik süresince tromboz geçiren 70 kadın üzerinde yaptıkları bir çalışmada mutasyon analizi sonuçları faktör V Leiden mutasyonunun inceledikleri hasta grubu içinde % 46 oranında bulmuşlardır. İlk gebeliklerinde ($OR:3.41$) ve tekrarlayan gebeliklerinde ($OR:3.86$) kontrol grubuna göre adı geçen mutasyonun tromboz riskini arttırdığını belirtmişlerdir [91]. Bu sonuçlar bizim çalışma bulgularımızı desteklemektedir.

Maternal venöz tromboz geçirmiş 50 kadın hastada, faktör V Leiden ($OR:4.5$) ve protrombin20210G>A ($OR:4.4$) mutasyonlarının yaygın olarak bulunduğu, ancak MTHFR677C>T ($OR:0.45$) mutasyonunun hasta ve kontrol gruplar arasında farklılık göstermediği bildirilmektedir [92]. Bu bulgu, ilgili trombofilik faktörlerin yayılımı açısından diğer çalışmaların verdiği genel fikir ile uyumluluk göstermektedir.

Yapılan çok sayıdaki çalışmada, total homosistein seviyesindeki (tHcy) artışın kalp damar hastalıkları ile ilişkisi ortaya konmaktadır. Hiperhomosisteinemi olarak tanımlanan bu hadise, homosistein metabolizması ile ilgili besinsel veya genetik kusurlardan oluşmaktadır. MTHFR gen bölgesi üzerinde meydana gelen

MTHFR677C>T ve MTHFR1298A>C mutasyonlarının homosistein metabolizmasını etkilediği bilinmektedir [44].

Bu çalışmada, trombofili hasta grubu içerisinde yer alan bazı bireylerin tHcyleri tarafımıza bildirildi, genotip-fenotip korelasyonunun kurulabilmesi amacı ile bu hastaların tHcy değerleri ve MTHFR gen bölgesi ile ilgili olarak genotipleri karşılaştırılarak incelendi. THcy seviyelerini belirlemek için uygulanan analizde referans aralığı 0-12 Umol/L olarak belirtildi. MTHFR gen bölgesi üzerinde MTHFR677C>T mutasyonunu homozigot mutant olarak taşıyan ve genotipi MTHFR677C>T/ 677C>T olan bireylere ait tHcy seviyeleri 15.5 ile 20.5 Umol/L idi. İlgili gen bölgesi için MTHFR1298A>C/1298A>C genotipi olan bireylerin tHcy seviyeleri 14.9-20.4 Umol/L arasında idi. MTHFR677C>T/1298A>C mutasyonlarını kompant heterozigot olarak taşıyan bireylere ait tHcy seviyeleri ise 12.6-28.8 Umol/L olarak bildirildi. Bu sonuçlara göre literatür bilgilerini doğrular nitelikte olup, MTHFR gen bölgesi üzerinde meydana gelen genetik kusurların homosistein seviyesinde artışa neden olabileceği düşünülmektedir. Ancak MTHFR mutasyonunun hem trombofili hasta grubu hemde kontrol grubunda yaygın olarak görülmesi, MTHFR açısından pozitif genotipi olan bireylerin tümünün taranması ve/veya prospektif bir çalışma olarak, homosistein seviyesi yüksek bulunan hastalarda MTHFR gen bölgesi mutasyonlarının taranmasının daha doğru olacağını göstermektedir.

Türkiye toplumunun genetik heterojen yapısı göz önünde bulundurularak, kalıtsal trombofili ile bağlantılı olabilecek yeni varyasyonların tanımlanması ve etkilerinin araştırılması önemlidir. Ancak bu şekilde, klinik teşhisin doğrulanmasına, genetik risk faktörlerinin belirlenmesine ve dolayısı ile kişiye bağlı risk faktörlerinin (sigara kullanımı, şişmanlık, stres, doğum kontrol hapı kullanımı v.s.) azaltılması veya mümkünse yok edilmesine yardımcı olunmasında hızlı adımlar atılabilir. Bu bağlamda, konunun detaylı olarak ele alınarak gen bölgelerinin araştırılması ve bulunan sonuçların, fenotip-genotip ilişkisi çerçevesinde değerlendirilerek bilimsel çevrelerce paylaşılması, bu hastalığın teşhis ve tedavisinde büyük önem taşıyacaktır.

Bu araştırmanın bulguları, faktör V Leiden mutasyonunu kalıtsal bireylerin hayatlarının belli dönemlerinde tromboz geçirebileceklerini ortaya koymaktadır. Bu sebep ile

ailelerinde ve kendilerinde tromboz hikayesi bulunan bireylerin özellikle gebeliklerinin erken dönemlerinde, doğum kontrol hapı kullanımı, hormon tedavisi uygulaması ve ameliyat öncesinde ilgili trombofilik faktör açısından DNA mutasyon taraması yaptırılmaları önerilmektedir.

Bu çalışma, daha önce yapılan bazı çalışmaların bulgularına benzer olarak, MTHFR gen bölgesi üzerinde bulunan hem MHTFR677C>T hemde MTHFR1298A>C mutasyonlarının kontrol ve hasta gruplarında eş dağılımda olduklarını göstermektedir. Bu bulgu adı geçen iki mutasyonun sadece polimorfizm olabileceğini düşündürmek ile birlikte bu mutasyonların homozigot mutant ve “compound” heterozigot mutant formlarının homosistein seviyesini artırma yönünde etkili oldukları çelişki yaratmaktadır. Bu durum, MTHFR mutasyonlarının diğer trombofilik faktörler ve homosistein metabolizmasında rol alan diğer enzim mutasyonları ile etkileşimleri sonucu tromboz patogenezinde rol aldıklarını düşündürmektedir.

Bu tezde çalışma grupları oluşturulurken, hasta ve ailesinin bilgilerinin titizlik ile ele alınması, kontrol bireylerin sağlıklı olarak seçilmesi ile ailelerinde kalp damar hastalıkları hikayesi bulunmayan bireylerden oluşturulması, hem hasta hem de kontrol gruplarda yer alan bireylerin birbirleri ile akrabalık ilişkilerinin bulunmaması gibi çok fazla kriter göz önüne alınmıştır.

Tez çalışmalarında, mutasyon analizi için kullanılacak jel ve elektroforez koşulları çok sayıdaki denemeler sonucunda optimize edilmiştir. Literatür bilgilerinde sıklıkla uygulanan agaroz jel uygulamaları yerini bu çalışmada poliakrilamit jel almış olup bu uygulama, DNA bantlarının değerlendirilmesinde görüntü netliği sayesinde kolaylık sağlamıştır. Ayrıca, DNA mutasyon analiz uygulamaları için kullanılan REA koşulları titizlikle denenerek belirlenmiştir. Böylece, aynı gün içersinde yapılan PCR'ın ürünlerinin kesimi kısa sürelerde tamamlanıp, erken sonuç alınması sağlanmıştır. Buna ek olarak, uygun SSCA jelleri ve elektroforez koşulları çok uzun çalışmalar sonucu elde edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, uzun süreli optimizasyon çalışmaları sonucu, uygulanan teknikler için belirlenen koşulların bundan sonra ilgili bölgelerde yapılacak diğer çalışmalar için kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. **HANDIN, RI.**, 2001, Bleeding and Thrombosis, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Company, New York, 15th Ed. (1): 339-45.
2. **LANE, D.**, GRANT, P., 2000, Role of hemostatic gene polymorphism in venous and arterial thrombotic disease, *Blood*, 95 (5): 1517-32.
3. **SYMONS, B.P.**, Wesaway, M., 2001, Virchow's trial and spinal manipulative therapy of the cervical spine, *J Can Chiropr Assoc.*, 45(4): 225-31.
4. **TOLLEFEN, D.**, 2003, Blood Coagulation (online), St Louis, Washington University, <http://tolefsen.wustl.edu/projects/coagulation/coagulation.html> [Ziyaret Tarihi: 08.07.2003].
5. **BERG, M.J.**, TYMOCZKO, L.J., STRYER, L., 2001, Biochemistry, *Freeman*, 5th Ed., pg. 285.
6. **MEADE T.W.**, 1994, Epidemiology of Thrombosis. *In: Thrombosis and Hemorrhage*, Loscalzo J, Schafer AI (Eds) Blackwell Scientific Publications, Boston, MA. pg. 791-804.
7. **MEADE T.W**, MILLER G.J, ROSENBERG R.D., 1992, Characteristics Associated with the Risk of Arterial Thrombosis and the Prethrombotic State. *In: Thrombosis in Cardiovascular Disorders*, Fuster V, Verstraete M (Eds.) W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA. pg. 79-95.
8. **VANCOTT E.M**, LAPOSATA M., 1998, Laboratory evaluations of hypercoagulable states. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 12:1141-1166.
9. **GERHARDT, A.**, SCHARF, R.E., BECKMAN, M.W., STRYVE, S., BENDER, H.G., PILLNY, M., et al., 2000, Prothrombin and factor V mutations in women with history of thrombosis during pregnancy and the puerperium, *N Engl J Med*, 342: 374-80.
10. **MARTINELLI, I.**, 2001, Risk factors in venous thromboembolism, *Thromb Haemost*, 86: 395-403.
11. **KIRKHAM, F.J.**, 1999, Stroke in childhood, *Arch Dis Child.*, 81: 85-9.
12. **JUNKER, R.**, KOCH, H.G., AUBERGER, K., MUNCHOW, N., EHRENFORTH, S., NOWAK-GOTTL, U., 1999, ProthrombinG20210A gene mutation and further prothrombotic risk factors in childhood thrombophilia, *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.*, 9: 2568-72.

- 13. GUNTHER, G.,** JUNKER, R., STRATER, R., SCHOBESS, R., KURNIK, K., KOSCH, A., et al., 2000, Symptomatic ischemic stroke in full-term neonates role of acquired and genetic risk factors, *Stroke*, 31: 2437-41.
- 14. TAN, J.,** 2002, Thrombophilia in pregnancy (review article), *Ann Acad Med. Singapore*, 31: 328-34.
- 15. PRICE, D.T.,** RIDKER, P.M., 1997, Factor V Leiden mutation and risks for thromboembolic disease: a clinical perspective, *Ann Med*, 127: 895-903.
- 16. ZOLLER, B.,** SVENSSON, P., HE, X., DAHLBACK, B., 1994, Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C, *J Clin Invest.*, 94: 2521.
- 17. MCALPINE, P.J.,** COOPLAND, G., GUY, C., JAMES, S., KOMARNICKI, L., MACDONALD, et al., 1989, Mapping the genes for erythrocytic alpha-spectrin 1 (SPTA1) and coagulation factor V (F5), *Cytogenet Cell Genet.*, 51: 1042.
- 18. JENNY, R.,** PITMAN, D., TOOLE J., KRIZ, R.W., ALDAPE, R.A., HEWICK, R.,M, et al., 1987, Complete cDNA and derived aminoacid sequence of human FV., *Proc Natl Acad Sci.*, 84: 4846-50.
- 19. LOCKWOOD, C.J.,** BACH, R., CUHA, A., ZHOU, X.D., MILLER, W.A., NEMESON, Y., 1991, Amniotic fluid contains tissue factor, a potent initiator of coagulation, *Am J Obstet Gynecol.*, 165: 1335-41.
- 20. MANN, K.,** NESHEIM, M., CHURCH, W., HALEY, P., KRISHNASWAMY, S., 1990, Surface dependent reactions of the vitaminoK-dependent enzyme complexes, *Blood*, 76: 1-16.
- 21. KOSTER, T.,** ROSENDAAL, F.R., DE RONDE, H., BRIËT, E., VANDENBROUCKE, J.P., BERTINA, R.M., 1993, Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study, *Lancet*, 342: 1503.
- 22. GRIP, O.,** SVENSSON, P.J., LINGREN, S., 2000, Inflammatory bowel disease promotes venous thrombosis earlier in life, *Scand J Gastroenterol*, 35: 619-23.
- 23. 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: 31869-80.

- 24. APARICIO, C., DAHLBÄCK, 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.
- 25. ROSENDAAL, F.R.,** 1999, Venous thrombosis: A multicausal disease, *Lancet*, 353: 1167-73.
- 26. 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.
- 27. TIRADO, I., MATEO, J., SORIA, J.M., OLIVER, A., BORELL, M., COLL., et al.,** 2001, Contribution of prothrombin 20210A allele and factor V Leiden mutation to thrombosis risk in thrombophilic families with other hemostatic deficiencies, *Haematologica*, 86: 1200-8.
- 28. SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D.,** 2001, *The metabolic & molecular bases of inherited disease*, The McGraw-Hill Company, New York, 8th Ed., pg. 4329.
- 29. EMMERICH, J., ROSENDAAL, F.R., CATTANEO, M., MARGAGLIONE, M., DE STEFANO, V., CUMMING, T., et al.,** 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: 809-16.
- 30. GRADY, D., WENGER, N.K., HERRINGTON, D., KHANS, S., FURBERG, C., HUNNINGHAKE, D., et al.,** 2000, Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic disease, The Heart and Estrogen progestin replacement study, *Ann Intern Med.*, 132: 689-96.
- 31. 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.
- 32. ROSENDAAL, F.R., VESSEY, M., RUMLEY, A., DALY, E., WOODWARD, M., HELMERHORST, F.M., et al.,** 2000, Hormonal replacement therapy prothrombotic mutations and the risk of venous thrombosis, *Br J Haematol.*, 116: 851-4.
- 33. 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.
- 34. MURPHY, R.P., DONOGHUE, C., NALLEN, R.J., MELLO, M., REGAN, C., WHITEHEAD, A.S., et al,** 2000, Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile metylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in pregnancy, *Arteroscler Thromb Vasc Biol*, 20: 266-70.

- 35. ALFIREVIC, Z.,** MOUSA, H.A., MARTLEW, V., BRISCOE, L., PEREZ-CASAL, M., TOH, C.H., 2001, Postnatal screening for thrombophilia women with severe pregnancy complications, *Obstet Gynecol*, 97: 753-9.
- 36. CHAN, W.P.,** LEE, C.K., KWONG, Y.L., LAM, C.K., LIANG, R., 1998, A novel mutation of arg 306 of factor V gene in Hong Kong Chinese, *Blood*, 91: 1135-9.
- 37. WILLIAMSON, D.,** BROWN, K., LUDDINGTON, R., BAGLIN, C., BAGLIN, T., 1998, Factor V Cambridge: a new mutation (arg 306-to-thr) associated with resistance to activated protein C, *Blood*, 91: 1140-44.
- 38. GUASH, J.F.,** CANNEGIETER, S., REITSMA, P.H., VANT VEER KORTHOF, E.T., BERTINA, R.M., 1998, Severe coagulation factor V deficiency caused by a 4 bp deletion in the factor V gene, *Brit J Haemat.*, 101: 32-9.
- 39. ZENDER, J.L.,** HIRAKI, D.D., JANES, C.D., CROSS, N., GRUMET, F.C., 1999, Familial coagulation factor V deficiency caused by a novel 4 base pair insertion in the factor V gene: factor V Stanford, *Thromb Haemost.*, 82: 1097-99.
- 40. RAI, R.,** BACKOS, M., ELGADDAL, S., SHLEBAK, A., REGAN, L., 2002, Factor V Leiden and recurrent miscarriage prospective outcome of untreated pregnancies, *Hum Reprod*, 17: 442-5.
- 41. ORITA, M.,** IWAHANA, H., KANAZAWA, H., SEKIYA, T., 1989, Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism, *Proc Natl Acad Sci.*, 86: 2766-70.
- 42. PROSKA, W.,** MANNEBACH, H., SCHMIDT, M., GLEICHMANN, U., KLEESIEK, K., 1995, Evidence against heterozygous coagulation factor V 1691 G to a mutation with resistance to activated protein C being a risk factor for coronary artery disease and myocardial infarction, *J Mol Med.*, 73: 521-4.
- 43. MITTERER, M.,** LANTHALER, A.J., MAIR, W., GIAEOMUZZI, K., COSER, P., 1999, Simultaneous detection of FV Q506 and prothrombin 20210A variation by allele-specific PCR, *Haematologica*, 84: 204-7.
- 44. GOYETTE, P.,** PAI, A., MILOS, R., FROSST, P., TRAN, P., CHEN, Z., et al., 1998, Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), *Mamm Genome*, 9: 652-6.
- 45. KEIJZER, M.B.,** DEN HEIJER, M., BLOM, H.J., BOS, G.M., WILLEMS, H.P., GERRITS, W.B., et al., 2002, Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis, *Thromb Haemost.*, 88: 723-28.

- 46. SKIBOLA, C.F., SMITH, M.T., KANE, E., ROMAN, E., ROLLINSON, S., CARTWRIGHT, R.A., et al., 1999, Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults, *PNAS*, 96: 12810–15.**
- 47. FROSST, P., BLOM, H.J., MIOLS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C.A., MATTHEWS, R.G., et al., 1995, A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in MTHFR (letter), *Nat Genet.*, 10: 111-3.**
- 48. VANDERPUT, N.M., GABREELS, F., STEVENS, E.M., 1998, A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: an additional risk factor for neural tube defects?, *Am J Hum Genet.*, 62: 1044-51.**
- 49. DEB HEIJER, M., KOSTER, T., BLOM, H.J., BOS, G.M.J., BRIET, E., REITSMA, P.H., et al., 1996, Hyperhomocystinemia as a risk factor for deep vein thrombosis, *N Engl J Med.*, 934: 759-62.**
- 50. TSAI, J.C., PERRELLA, M.A., YOSHIZUMI, M., HSIEH, C.M., HABER, E., SCHLEGEL, R., et al., 1994, Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine, A link to atherosclerosis, *Proc Nat Acad Sci.*, 91: 6369-73.**
- 51. PUCA, E.K., 2002, *Laboratory evaluation of thrombophilia in recurrent pregnancy loss*, Transfusion Medicine Update, The Institute for Transfusion Medicine, <http://itxm.org/TMU2002/Issue 1.htm>, [Ziyaret Tarihi: 13.12.2002].**
- 52. SADEWA, A.H., SUMOTO, R., ISIJADJID, M., NISHIYAMA, K., SHIRAKAWA, T., MATSUO, M., et al., 2004, C677T mutation in the MTHFR gene was not found in patients with frontoethmoidal encephalocele in East Java, Indonesia, *Pediatr Int*, 46(4):409-14.**
- 53. 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-methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects, *Br J Nutr*, 83: 593-6.**
- 54. WEISBERG, I., TRAN, P., CHRISTENSEN, B., SIBANI, S., ROZEN, R., 1998, A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity, *Mol Genet Metab.*, 64: 169-72.**
- 55. FROSST, P., BLOM, H.J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C.A., MATTHEWS, R.G., et al., 1995, A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in MTHFR, *Nature Genet.*, 10: 111-3.**
- 56. GROSSMAN, R., SCHWENDER, S., GEISEN, U., SCHMABECK, C., MERATI, G., WALTER, U., 2002, CBS 844ins68, MTHFR TT667 and EPCR 4031ins23 genotypes in patients with deep-vein thrombosis, *Thromb Res*, 107: 13-5.**
- 57. DEGEN, S.J.F., DAVIE, E.W., 1987, Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin, *Biochemistry*, 26: 6165-77.**

- 58. 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: 3698-703.
- 59. ZIVELIN, A., ROSENBERG, N., FAIER, S., 1998,** A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene, *Blood*, 92: 1119-24.
- 60. DILLEY, A., AUSTIN, H., HOOPER, W.C., 1998,** Prevalence of the prothrombin 20210G-to-A variant in blacks:infants, patients with venous thrombosis, patients with myocardial infarction and control subjects, *J Lab Clin Med.*, 132: 452-5.
- 61. RONALD, C., MCGLENNEN, M.D., NIGEL, S., KEY, M.B., 2002,** Clinical and laboratory management of the prothrombin G20210A mutation, *Arch Pathol Lab Med*, 126: 1319-25.
- 62. 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: 2780-5.
- 63. BUTENASS, S., VAN'T VEER, C., MANN, K.G., 1999,** Normal thrombin generation, *Blood*, 94: 2169-78.
- 64. SMIRNOV, M.D., SAFA, O., ESMON, C.T., 1999,** Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin, *Blood*, 94: 3839-46.
- 65. 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: 205-10.
- 66. RIDKER, P.M., HENNEKENS, C.H., MILETICH, J.P., 1999,** G20210A mutation in prothrombin gene risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men, *Circulation*, 99: 999-1004.
- 67. BOVILL, E.G., HASSTEDT, S.J., CALLAS, P.W., 2000,** The G20210A prothrombin polymorphism is not associated with increased thromboembolic risk in a large protein C deficient kindred, *Thromb Haemost.*, 86: 366-70.
- 68. VANDERBROUCKE, J.P., ROSING, J., BLOEMENKAMP, K.W., 2001,** Oral contraceptives and the risk of venous thrombosis, *N Engl J Med.*, 344: 1527-35.
- 69. MARTINELLI, I., SACCHI, E., LANDI, G., TAIOLI, E., DUCA, F., MANUCCI, P.M., 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: 1840-1.

- 70. LEYTE, A., SMITS, P.H., VANSTRAALEN, J.P., DOORN, L.J., QUINT, W.G.,** 2000, Automated, simultaneous detection of factor V Leiden and prothrombin G20210A variants using multiplex PCR and a line probe assay, *Thromb Haemost.*, 83: 354-5.
- 71. MILLER, M., DYKES, D.D., POLESKY, H.F.,** 1988, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleate cells, *Nuc Acids Res*, 16:1215.
- 72. HAYASHI, K.,** 1993, A simple and sensitive method for the detection of mutations in the genomic DNA, *PCR methods and amplification*, 1: 34-8.
- 73. QIU-QIONG, C., TOUITOU, I.,** 1993, Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency, *NAR*, 21: 3909-10.
- 74. BEAUCHAMP, N.J., DALY, M.E., HAMPTON, K.K., COOPER, P.C., PRESTON, E., PEAKE, I.R.,** 1994, High prevalence of a mutation in the factor V gene within the U.K. population: relationship to activated protein C resistance and familial thrombosis, *Brit J Haemat*, 88: 219-22.
- 75. KLUIJTMANS, L.A., DEN HEIJER, M., REITSMA, P.H,** 1998, Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of deep-vein thrombosis, *Thromb Haemost*, 79:254-58.
- 76. MAKRIS, M., PRESTON, F.E., BEAUCHAMP, N.J.,** 1997, Co-inheritance of the 20210A allele of the prothrombin gene increases the risk of thrombosis in subjects with familial thrombophilia. *Thromb Haemost*, 78:1426-29.
- 77. CHUN, K., WANG, L., LIANG, K., JIUAN, M.,** 2001, Genotyping 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase for patients with coronary artery disease in Southern, *J Food and Drug Anal*, 3:173-77.
- 78. KEEN, J., LESTER, D., INGLEHEARN, C., CURTIS, A., HATTACHARYA, S.,** 1991, Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on hydrolink gels, *Trends Genet*, 7:5.
- 79. NEILAN B.A., LEIGH D.A., RAPLEY E., MCDONALD B.L.,** 1994, Microsatellite genome screening: rapid non-denaturing, non-isotopic dinucleotide repeat analysis, *Biotechnology*, 17(4): 708-12.
- 80. MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J.,** 1982, *Molecular cloning: a laboratory model*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Newyork , USA.
- 81. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T.,** 1989, *Appendixes molecular cloning model book*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 3th Ed.
- 82. NEBCUTTER VERSION2.0 (ONLINE),** <http://neb.com/neb/products/res-enzymes/re-update-frame.html>, New England Biolabs Inc., [Ziyaret Tarihi: 10.09.2003].

- 83. ŞENESEN, Ü.**, 2000, *İşletme ve iktisat için istatistik, Literatür yayınları*, 1th Ed. pg. 940.
- 84. ENSEMBL GENOME BROWSER (ONLINE)**, European Bioinformatics Institute-European Molecular Biology Laboratory and Sanger Institute, <http://ensembl.org>, [Ziyaret Tarihi: 15.09.2003].
- 85. GÜRGEY, A.**, HAZNEDAROĞLU, I.C., EGESEL, T., BUYUKASIK, Y., OZCEBE, O.I., SAYINALP, N., DUNDAR, S.V., et al., 2001, Two common genetic thrombotic risk factors: factor V Leiden and prothrombin G20210A in adult Turkey patients with thrombosis, *Am J Hematol.*, 67 (2): 107-11.
- 86. RUIZ-ARGUELLES, G.J.**, GARCES-EISELE, J., REYES-NUNEZ, V., RAMIREZ-CISME, F.J., 2001, Primary thrombophilia in Mexico II. Factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A, and metylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism thrombophilic Mexican mestizos, *Am J Hematol.*, 66(1): 28-31.
- 87. VARELA, M.L.**, ADAMCZUK, Y.P., FORASTIERO, R.R., MARTINUZO, M.E., CERRATO, G.S., POMBO, G., CARRERAS, L.O., 2001, Major and potential prothrombotic genotypes in a cohort of patient with venous thromboembolism, *Thromb Res.*, 1:104, 317-24.
- 88. LU, Y.**, ZHAO, Y., LIU, G., WANG, X., LIU, Z., CHEN, B., HUI, R., 2002, factor V gene G1691A mutation prothrombin gene G20210A mutation and MTHFR gene C677T mutation are not risk factors for pulmonary thromboembolism in Chinese population, *Thromb Res*, 106: 7-12.
- 89. BAUDER, F.**, DUCOUT, L., FREYBURGER, G., 2003, Assesment of the 20210GA prothrombin variant in a sample of patients from the french Basque country with various thrombophilic conditions, *Ann Hemaotol.*, Abstract.
- 90. MARTINELLI, I.**, LEGNANI, C., BUCCIARELLI, P., GRANDONE, E., DE STEFANO, V., MANNUCCI, P.M., 1999, Risk of pregnancy related venous thrombosis in carriers of severe inherited thrombophilia, *Thromb Haemost*, 8: 532-7.
- 91. BOKAREWA, M.I.**, BREME, K., BLOMBACK, M., 1997, Arg506-gln mutation in factor V and risk for thrombosis during pregnancy, *Thromb Haemost*, 78: 1183-8.
- 92. MCCOLL, M.D.**, ELLISON, J., REID, F., TAIT, R.C., WALKER, I.D., GREER, I.A., 2000, Prothrombin 20210G>A, MTHFR 677C>T mutations in women with venous thromboembolism associated with pregnancy, *BJOG*, 107: 565-9.

7. EKLER

Ek A: Genel tromboemboli, DVT ve Gebelik Komplikasyonları hasta grubu bireyelerine ait DNA'ların spektrofotometrik ölçüm değerleri ve konsantrasyonları.

	A260	A280	A260/A280	C (ng/ml)
1	0,08	0,05	1,64	205
2	0,12	0,07	1,71	265
3	0,13	0,08	1,68	332,5
4	0,11	0,07	1,74	282,5
5	0,06	0,04	1,65	157,5
6	0,05	0,03	1,67	135
7	0,06	0,04	1,7	157,5
8	0,09	0,06	1,62	235
9	0,07	0,04	1,79	180
10	0,06	0,03	1,68	142,5
11	0,04	0,02	1,75	97,5
12	0,06	0,03	1,65	140
13	0,07	0,05	1,43	172,5
14	0,02	0,01	1,75	60
15	0,06	0,03	1,77	137,5
16	0,06	0,03	1,77	137,5
17	0,09	0,05	1,78	217,5
18	0,08	0,05	1,72	207,5
19	0,07	0,04	1,74	182,5
20	0,02	0,01	1,69	55
21	0,10	0,06	1,75	277,5
22	0,12	0,07	1,73	297,5
23	0,07	0,04	1,69	177,5
24	0,08	0,06	1,79	210
25	0,07	0,04	1,7	177,5
26	0,08	0,05	1,77	210
27	0,07	0,04	1,7	165
28	0,06	0,04	1,71	165
29	0,04	0,02	1,72	115
30	0,13	0,08	1,72	282,5
31	0,03	0,02	1,66	82,5
32	0,05	0,03	1,7	115
33	0,04	0,02	1,62	97,5
34	0,04	0,03	1,46	95
35	0,1	0,07	1,32	242,5
36	0,11	0,07	1,64	275
37	0,05	0,03	1,62	110
38	0,04	0,02	1,68	107,5
39	0,07	0,04	1,69	165

	A260	A280	A260/A280	C (ng/ml)
40	0,09	0,05	1,75	232,5
41	0,12	0,07	1,68	255
42	0,04	0,02	1,76	92,5
43	0,04	0,02	1,66	100
44	0,07	0,04	1,62	162,5
45	0,05	0,03	1,67	110
46	0,09	0,06	1,62	222,5
47	0,11	0,06	1,65	270
48	0,04	0,02	1,78	77,5
49	0,06	0,03	1,66	137,5
50	0,09	0,05	1,76	227,5
51	0,05	0,03	1,75	122,5
52	0,06	0,04	1,65	145
53	0,03	0,01	1,78	62,5
54	0,06	0,04	1,62	142,5
55	0,04	0,02	1,62	92,5
56	0,06	0,03	1,72	137,5
57	0,09	0,06	1,62	225
58	0,06	0,03	1,76	150
59	0,06	0,04	1,7	157,5
60	0,08	0,05	1,64	205
61	0,07	0,04	1,74	182,5
62	0,1	0,07	1,32	242,5
63	0,05	0,03	1,62	110
64	0,05	0,03	1,67	135
65	0,07	0,05	1,43	172,5
66	0,07	0,05	1,43	172,5
67	0,06	0,03	1,77	137,5
68	0,11	0,07	1,74	282,5
69	0,07	0,04	1,74	182,5
70	0,07	0,04	1,7	165
71	0,06	0,04	1,65	145
72	0,06	0,04	1,73	155
73	0,06	0,04	1,77	160
74	0,06	0,04	1,76	154
75	0,07	0,04	1,75	163
76	0,05	0,03	1,71	120
77	0,08	0,04	1,73	189
78	0,06	0,04	1,77	160
79	0,06	0,04	1,7	157,5
80	0,1	0,07	1,32	242,5
81	0,07	0,05	1,43	172,5
82	0,06	0,04	1,65	145
83	0,08	0,05	1,64	205
84	0,06	0,03	1,66	137,5
85	0,07	0,04	1,78	180
86	0,06	0,04	1,73	155
87	0,06	0,03	1,72	144
88	0,06	0,04	1,75	158
89	0,06	0,04	1,78	157
90	0,08	0,06	1,79	210
91	0,05	0,03	1,75	122,5

	A260	A280	A260/A280	C (ng/ml)
92	0,08	0,05	1,74	200
93	0,07	0,04	1,79	166
94	0,06	0,03	1,76	152
95	0,06	0,03	1,72	144
96	0,07	0,05	1,43	172,5
97	0,07	0,04	1,79	166
98	0,06	0,04	1,78	156,5
99	0,06	0,03	1,77	151,3
100	0,07	0,04	1,75	163
101	0,07	0,04	1,74	182,5
102	0,11	0,07	1,74	282,5
103	0,07	0,04	1,78	180
104	0,06	0,04	1,76	154
105	0,06	0,04	1,78	157
106	0,06	0,04	1,77	160
107	0,06	0,03	1,77	137,5
108	0,08	0,05	1,64	205
109	0,05	0,03	1,67	135
110	0,06	0,04	1,77	160
111	0,06	0,04	1,76	154
112	0,1	0,07	1,32	242,5
113	0,07	0,04	1,78	180
114	0,08	0,06	1,79	210
115	0,06	0,04	1,62	142,5
116	0,08	0,05	1,74	200
117	0,05	0,03	1,67	135
118	0,05	0,03	1,71	120
119	0,06	0,03	1,77	137,5
120	0,07	0,04	1,78	180
121	0,07	0,05	1,43	172,5
122	0,07	0,05	1,43	172,5
123	0,06	0,04	1,78	157
124	0,06	0,04	1,73	155
125	0,07	0,04	1,78	180
126	0,06	0,04	1,65	145
127	0,11	0,07	1,74	282,5
128	0,06	0,04	1,73	155
129	0,07	0,04	1,74	182,5
130	0,06	0,04	1,78	157
131	0,06	0,04	1,78	156,5
132	0,04	0,02	1,62	97,5
133	0,07	0,04	1,75	163
134	0,06	0,03	1,76	152
135	0,07	0,04	1,75	163
136	0,05	0,03	1,71	120
137	0,06	0,03	1,76	152
138	0,07	0,04	1,79	166
139	0,08	0,05	1,74	200
140	0,06	0,04	1,76	154
141	0,07	0,04	1,78	180
142	0,06	0,03	1,72	144
143	0,07	0,05	1,43	172,5

	A260	A280	A260/A280	C (ng/ml)
144	0,05	0,03	1,75	122,5
145	0,05	0,03	1,75	122,5
146	0,06	0,04	1,78	156,5
147	0,08	0,04	1,73	189
148	0,07	0,04	1,74	182,5
149	0,06	0,03	1,76	152
150	0,07	0,05	1,43	172,5
151	0,08	0,05	1,64	205
152	0,07	0,04	1,79	166
153	0,05	0,03	1,62	110
154	0,08	0,05	1,74	200
155	0,07	0,04	1,7	165
156	0,07	0,04	1,75	163
157	0,06	0,04	1,62	142,5
158	0,06	0,04	1,75	158
159	0,07	0,04	1,78	180
160	0,06	0,04	1,76	154
161	0,08	0,05	1,64	205
162	0,11	0,07	1,74	282,5
163	0,08	0,05	1,64	205
164	0,07	0,04	1,7	165
165	0,07	0,04	1,74	182,5
166	0,06	0,04	1,77	160
167	0,06	0,04	1,65	145
168	0,07	0,04	1,75	163
169	0,06	0,04	1,76	154
170	0,08	0,04	1,73	189
171	0,06	0,04	1,75	158
172	0,06	0,04	1,78	157
173	0,05	0,03	1,75	122,5
174	0,07	0,04	1,79	166
175	0,08	0,05	1,74	200
176	0,06	0,04	1,76	154
177	0,08	0,05	1,64	205
178	0,06	0,04	1,77	160
179	0,1	0,07	1,32	242,5
180	0,11	0,07	1,74	282,5
181	0,06	0,04	1,65	145
182	0,06	0,04	1,7	157,5
183	0,07	0,04	1,75	163
184	0,06	0,04	1,73	150
185	0,06	0,03	1,72	144
186	0,04	0,02	1,62	97,5
187	0,06	0,04	1,75	158
188	0,07	0,04	1,78	180
189	0,08	0,06	1,79	210
190	0,06	0,03	1,77	137,5
191	0,07	0,04	1,75	163
192	0,07	0,04	1,78	180
193	0,06	0,04	1,73	150
194	0,07	0,05	1,43	172,5
195	0,07	0,04	1,75	163

	A260	A280	A260/A280	C (ng/ml)
196	0,05	0,03	1,71	120
197	0,06	0,04	1,76	154
198	0,08	0,05	1,74	200
199	0,07	0,04	1,78	180
200	0,05	0,03	1,62	110
201	0,05	0,03	1,75	122,5
202	0,07	0,04	1,79	166
203	0,08	0,05	1,74	200
204	0,08	0,04	1,73	189
205	0,1	0,07	1,32	242,5
206	0,07	0,04	1,75	163
207	0,04	0,02	1,62	97,5
208	0,07	0,05	1,43	172,5
209	0,06	0,04	1,62	142,5
210	0,06	0,04	1,78	156,5
211	0,06	0,04	1,76	154
212	0,05	0,03	1,75	122,5
213	0,05	0,03	1,71	120
214	0,06	0,04	1,76	154
215	0,07	0,04	1,75	163
216	0,11	0,07	1,74	282,5
217	0,07	0,05	1,43	172,5
218	0,07	0,04	1,74	182,5
219	0,06	0,04	1,77	160
220	0,07	0,04	1,75	163
221	0,08	0,05	1,64	205
222	0,05	0,03	1,71	120
223	0,06	0,04	1,78	156,5
224	0,04	0,02	1,62	97,5
225	0,06	0,04	1,73	150
226	0,08	0,05	1,74	200
227	0,05	0,03	1,75	122,5
228	0,06	0,04	1,75	158
229	0,06	0,04	1,76	154
230	0,06	0,04	1,78	157
231	0,07	0,04	1,78	180
232	0,05	0,03	1,62	110
233	0,06	0,04	1,77	160
234	0,06	0,04	1,65	145
235	0,07	0,05	1,43	172,5
236	0,06	0,04	1,73	150
237	0,05	0,03	1,62	110
238	0,06	0,04	1,76	154
239	0,06	0,03	1,77	137,5
240	0,08	0,04	1,73	189
241	0,08	0,05	1,74	200
242	0,1	0,07	1,32	242,5
243	0,08	0,05	1,74	200
244	0,07	0,04	1,75	163
245	0,05	0,03	1,71	120
246	0,06	0,04	1,65	145
247	0,07	0,04	1,79	166

	A260	A280	A260/A280	C (ng/ml)
248	0,06	0,04	1,62	142,5
249	0,04	0,02	1,62	97,5
250	0,07	0,04	1,78	180
251	0,08	0,06	1,79	210
252	0,07	0,04	1,75	163
253	0,08	0,05	1,64	205
254	0,11	0,07	1,74	282,5
255	0,06	0,03	1,72	144
256	0,06	0,04	1,77	160
257	0,08	0,04	1,73	189
258	0,07	0,04	1,78	180
259	0,06	0,04	1,76	154
260	0,06	0,04	1,78	156,5
261	0,06	0,04	1,75	158
262	0,06	0,04	1,78	157
263	0,06	0,04	1,76	154
264	0,06	0,04	1,73	150
265	0,06	0,04	1,65	145
266	0,05	0,03	1,67	135
267	0,07	0,05	1,43	172,5
268	0,08	0,05	1,64	205
269	0,06	0,04	1,7	157,5
270	0,06	0,03	1,77	137,5

Ek B: Genel tromboemboli ve DVT kontrol grubu bireylerine ait DNA'ların spektrofotometrik ölçüm değerleri ve konsantrasyonları.

	A260	A280	A260/A280	C (ng/ml)
1	0,08	0,05	1,64	205
2	0,06	0,04	1,7	157,5
3	0,1	0,07	1,32	242,5
4	0,11	0,07	1,74	282,5
5	0,07	0,05	1,43	172,5
6	0,06	0,03	1,66	137,5
7	0,06	0,04	1,78	157
8	0,07	0,04	1,75	163
9	0,07	0,04	1,78	180
10	0,05	0,03	1,71	120
11	0,1	0,07	1,32	242,5
12	0,07	0,05	1,43	172,5
13	0,07	0,04	1,79	166
14	0,06	0,04	1,75	158
15	0,06	0,03	1,76	152
16	0,07	0,04	1,7	165
17	0,08	0,04	1,73	189
18	0,06	0,04	1,76	154
19	0,06	0,04	1,73	150
20	0,05	0,03	1,67	135
21	0,08	0,05	1,64	210
22	0,06	0,03	1,76	152
23	0,06	0,04	1,78	156,5
24	0,06	0,04	1,77	160
25	0,06	0,03	1,65	140
26	0,08	0,05	1,64	205
27	0,04	0,02	1,72	115
28	0,11	0,07	1,74	282,5
29	0,06	0,03	1,76	152
30	0,07	0,05	1,43	172,5
31	0,06	0,04	1,76	154
32	0,08	0,04	1,73	189
33	0,07	0,04	1,7	165
34	0,06	0,04	1,73	150
35	0,04	0,02	1,62	97,5
36	0,06	0,04	1,77	160
37	0,07	0,04	1,79	166
38	0,07	0,04	1,78	180
39	0,07	0,04	1,78	180
40	0,07	0,05	1,43	172,5
41	0,05	0,03	1,71	120
42	0,06	0,04	1,75	158
43	0,06	0,04	1,78	157
44	0,06	0,03	1,76	152
45	0,06	0,04	1,76	154
46	0,05	0,03	1,67	135
47	0,07	0,04	1,7	165
48	0,06	0,04	1,77	160

	A260	A280	A260/A280	C (ng/ml)
49	0,05	0,03	1,75	122,5
50	0,06	0,04	1,78	156,5
51	0,07	0,04	1,79	166
52	0,06	0,03	1,76	152
53	0,06	0,04	1,73	150
54	0,08	0,05	1,64	205
55	0,07	0,04	1,7	165
56	0,05	0,03	1,67	135
57	0,06	0,04	1,76	154
58	0,06	0,04	1,75	158
59	0,08	0,04	1,73	189
60	0,07	0,04	1,7	165
61	0,06	0,04	1,75	158
62	0,07	0,04	1,78	180
63	0,07	0,04	1,79	166
64	0,07	0,05	1,43	172,5
65	0,05	0,03	1,71	120
66	0,1	0,07	1,32	242,5
67	0,06	0,04	1,78	157

Ek C: Gebelik Komplikasyonları kontrol grubu bireyelerine ait DNA'ların spektrofotometrik ölçüm değerleri ve konsantrasyonları.

	A260	A280	A260/A280	C (ng/ml)
1	0,06	0,04	1,65	145
2	0,09	0,05	1,75	232,5
3	0,07	0,04	1,74	170
4	0,07	0,04	1,75	168
5	0,06	0,04	1,77	159
6	0,07	0,04	1,76	162
7	0,06	0,04	1,72	155
8	0,06	0,03	1,79	147
9	0,07	0,04	1,75	184
10	0,06	0,04	1,71	160
11	0,07	0,04	1,78	170
12	0,13	0,07	1,75	325
13	0,07	0,04	1,74	170
14	0,09	0,06	1,62	222,5
15	0,06	0,04	1,72	155
16	0,05	0,03	1,67	135
17	0,06	0,04	1,78	157
18	0,06	0,03	1,65	140
19	0,05	0,03	1,7	115
20	0,06	0,04	1,7	158,5
21	0,08	0,04	1,77	192
22	0,06	0,03	1,75	152
23	0,04	0,02	1,68	107,5
24	0,06	0,04	1,71	165
25	0,08	0,05	1,64	205
26	0,07	0,05	1,43	172,5
27	0,05	0,03	1,67	135
28	0,11	0,07	1,64	275
29	0,06	0,04	1,65	145
30	0,06	0,03	1,65	140
31	0,04	0,02	1,66	100
32	0,06	0,04	1,71	160
33	0,06	0,04	1,72	155

8. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

<u>Adı,Soyadı</u>	Bilgen DÖLEK
<u>Doğum Tarihi</u>	26/04/1978
<u>Uyruğu</u>	T.C.
<u>Adres</u>	II.Taş ocağı caddesi, Dr.Orhan Birman Köşkü, No:8/ Mecidiyeköy-İstanbul.
<u>Telefon</u>	(0212) 272 48 00/ Dahili:24
<u>E-mail</u>	bilgen@duzen.com.tr

EĞİTİM

<u>Şubat 2001-</u>	Doktora , İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D.
<u>Ekim 1998-Ocak 2001</u>	Yüksek Lisans , İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D.
<u>Ekim 1994- Haziran 1998</u>	Lisans , İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Biyoteknoloji Kümesi).

DENEYİM**Ocak 2002-**

Düzen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi,
Moleküler Genetik Laboratuvarı.

Haziran 2000- Ocak 2002

TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji
Araştırma Enstitüsü, Bitki Biyoteknolojisi
Laboratuvarı.

ARAŞTIRMA PROJELERİ**Temmuz 2002-**

Proje Adı : “Kalıtsal Trombofili’nin
Moleküler Analizi”

Proje No : T-29/23072002

*Bu proje, İstanbul Üniversitesi T.C. İstanbul
Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma
Projeleri Yürütücülüğü tarafından desteklenmiştir.

Eylül 2000-Haziran 2001

Proje Adı : “Tuz Stresinin *Phaseolus vulgaris*
L.’nin Çimlenme ve Gelişmesi Üzerine Etkileri”.

Proje No : T-916/06112000

*Bu proje, İstanbul Üniversitesi T.C. İstanbul
Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma
Projeleri Yürütücülüğü tarafından desteklenmiştir.

YAYINLAR VE KONGRE KATILIMLARI

B. Dölek, K. Bajrovic, and N.Gözükırmızı “Salinity Effects on Plant Tissue
Culture of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)”, *Biol.&Biotechnology
Equipment*, 15/ 2001/2, Supplement.

B.Baksu, İ.Davas, B.Kesim, **B.Dölek**, A.Akyol, S.Çınar, “Derin Ven Trombozu ve Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Faktör V Leiden ve Metilentetrahidrofolat redüktaz C677T Mutasyonları: İki olgu sunumu”, *Perinatoloji Dergisi*, Cilt 12, Sayı 1,2004.

B.Kesim, B.Baksu, **B.Dölek**, S.Çınar, İ.Davas “Derin Ven Trombozu Olan 35 Haftalık Gebede Faktör V Leiden ve Metilentetrahidrofolat redüktaz C677T Mutasyonlarının Saptanması: Bir olgu sunumu”, *Kadın Doğum Dergisi*, 2(2):117-119, 2003.

B.Dölek, S.Eraslan, S.Eroğlu, B.Kesim, Y.Laleli, N.Gözükırmızı “FVL, PT20210G>A ve MTHFR677C>T Mutasyonlarının Kalıtsal Trombofili ve Gebelikteki Önemi”, *VI. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi*, 21-24 Nisan 2004, Belek/ Antalya.

B.Dölek, K.Bajrovic, Z.İpekçi, N.Gözükırmızı “*Phaseolus vulgaris* L. Doku Kültüründe NaCl'nin Etkileri”, *XII. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, 17-21 Eylül 2001, Ayvalık/Balıkesir.

K.Bajrovic, Z.İpekçi, T.Oğraş, N.Öztürk, **B.Dölek**, N.Gözükırmızı “Melez Kavak (*Populus deltooides*x*Populus deltooides*) ve Titrek Kavak (*Populus tremula*) Klonlarında Transformasyon Çalışmaları”, *XII. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, 17-21 Eylül 2001, Ayvalık/Balıkesir.

21-24 Nisan 2004

“VI.Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi”, Belek/ Antalya.

19-22 Şubat 2001

“The International Theoretical Course on Genetics and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants”, COMSTECH, IDB and TÜBİTAK-MRC-RİGEB, Gebze/Kocaeli.