

T.C.  
Marmara Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biyokimya Anabilim Dalı

19080

# ASİT SIVISINDAN PROTROMBİNİN SAFLAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Biyokimya Uzmanı  
Fikriye Uras

**Y. G.**  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

Danışman  
Prof. Dr. Turay Yardımcı  
M.Ü. Ecz. Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

İstanbul- 1991

# İÇİNDEKİLER

<b>1 GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2 GENEL BİLGİ</b>	<b>2</b>
2.1 PROTROMBİN (FAKTÖR II)	4
2.1.1 PROTROMBİNİN YAPISI	4
2.1.2 PROTROMBİNİN FİZYOLOJİK AKTİVASYONU	5
2.2 PIVKA-II	6
2.3 K VİTAMİNİNE BAĞIMLI REAKSİYON	8
2.3.1 K VİTAMİNİ	8
2.3.2 K VİTAMİNİNE BAĞIMLI KARBOKSİL AZ ENZİMİ	9
2.3.3 K VİTAMİNİNE BAĞIMLI REAKSİYONUN MEKANİZMASI	10
2.3.4 KARACİĞERDE K VİTAMİNİ METABOLİZMASI	11
2.3.5 WARFARİNİN ETKİ BÖLGESİ	13
2.4 KARACİĞER HASTALIKLARINDA HEMOSTATİK ANOMALİLER	14
2.4.1 KRONİK KARACİĞER HASTALIKLARINDA GÖRÜLEN HEMOSTATİK ANOMALİLER	14
2.4.1.1 TROMBOSİTOPENİ	14
2.4.1.2 TROMBOSİT FONKSİYON BOZUKLUĞU	15
2.4.1.3 DIC	15
2.4.1.4 ANORMAL FİBRİNOLİZİS	16
2.4.1.5 PIHTILAŞMA FAKTÖR ANOMALİLERİ	16
2.4.2 KARACİĞER HASTALIKLARINDA HEMOSTAZİSİN LABORATUVAR DEĞERLENDİRİLMESİ	17
<b>3 ARAÇ GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>19</b>
3.1 ARAÇ VE GEREÇLER	19
3.1.1 KİMYASAL MADDELER	19
3.1.2 CİHAZLAR VE DİĞER GEREÇLER	19
3.1.3 NORMAL PLAZMA HAVUZU	20
3.1.4 ASİD SIVISI	20
3.2 YÖNTEMLER	20
3.2.1 NORMAL PLAZMA HAVUZUNDAN PROTROMBİNİN SAFLAŞTIRILMASI	21
3.2.1.1 PROTROMBİN KOMPLEKSİNİN ELDE EDİLMESİ	21
3.2.1.2 NORMAL PROTROMBİN KOMPLEKSİNİN DEAE SEPHADEX A-50 KOLON KROMATOĞRAFİSİ	21
3.2.2 ASİT SIVISINDAN PROTROMBİN SAFLAŞTIRILMASI	22
3.2.2.1 PROTROMBİN KOMPLEKSİNİN ELDE EDİLMESİ	22
3.2.2.2 DEAE SEPHACEL KOLON KROMATOĞRAFİSİ	22
3.2.2.3 HEPARİN SEPHAROSE CL-6B KOLON KROMATOĞRAFİSİ	23
3.2.3 ADSORBE EDİLMİŞ ASİTTEN PROTROMBİNİN SAFLAŞTIRILMASI	23
3.2.3.1 DEAE SEPHACEL KOLON KROMATOĞRAFİSİ	23
3.2.3.2 HEPARİN-SEPHAROSE CL-6B KOLON KROMATOĞRAFİSİ	24
3.2.4 SDS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE)	24
3.2.5 "CROSS" İMMÜNELEKTROFOREZ	25
3.2.6 OUCHTERLONY ÇİFT İMMÜNDİFÜZYON YÖNTEMİ	26
3.2.7 İMMÜNELEKTROFOREZ	26
3.2.8 SELÜLOZ ASETAT PROTEİN ELEKTROFOREZİ	26
3.2.9 PROTEİN TAYİNİ	26
3.2.10 PROTROMBİN EKSİK PLAZMA İLE PROTROMBİN AKTİVİTESİ TAYİNİ	26
3.2.11 STAFİLOKOAGÜLAZ İLE PROTROMBİN TAYİNİ	27
<b>4 BULGULAR</b>	<b>28</b>
4.1 NORMAL PLAZMA HAVUZUNDAN PROTROMBİNİN SAFLAŞTIRILMASI	28
4.2 SİROZLU OLGUYA AİT ASİT SIVISINDAN PROTROMBİNİN SAFLAŞTIRILMASI	33
4.3 ASİT SIVISINDAN BARYUM SİTRATA ADSORBE OLMAYAN PROTROMBİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI	39
<b>5 TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>43</b>
<b>6 ÖZET</b>	<b>46</b>
<b>7 SUMMARY</b>	<b>48</b>
<b>8 KISALTMALAR</b>	<b>49</b>
<b>9 KAYNAKLAR</b>	<b>51</b>

## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasına fırsat verdiği ve değerli katkıları için danışmanım Prof.Dr. Turay Yardımcı' ya, beni bu konuya yönelten ve tamamlamamdaki değerli katkıları için Prof.Dr. Orhan Ulutin'e teşekkürü borç bilirim.

Teknik konulardaki yardımları, yapıcı eleştiri ve katkıları için eşim Dr. Ahmet Rıza Uras'a, normal donörlerin kan örneklerini sağlayan Dr. Özcan Nazlıcan'a, fikirlerinden faydalandığım Prof. Dr. Kaya Emerk'e, Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye ve Doç. Dr. Nurdan Tözün'e çok teşekkür ederim.

Haseki Hastanesindeki görevime ek olarak doktora programına katılmama izin verdikleri için eski başhekimim Prof. Dr. Aleaddin Yavaşca ile başhekimim Doç Dr. Ahmet Çetinsaya' ya, teknik yardımlarından dolayı Biokimya Uz. Emel Dirican'a , Asistan Dr. Didem Önel'a ve teknisyen Tansel Akar'a, grafik çizimlerindeki yardımları için Mimar Ruşen Yamaçlı' ya teşekkür ederim.

Ayrıca yoğun rutin çalışma şartları içinde yürütülen bu araştırmanın sıkıntılarını doğrudan veya dolaylı olarak paylaşan Haseki Hastanesi Biyokimya Laboratuvarının bütün elemanlarına teşekkür ederim.

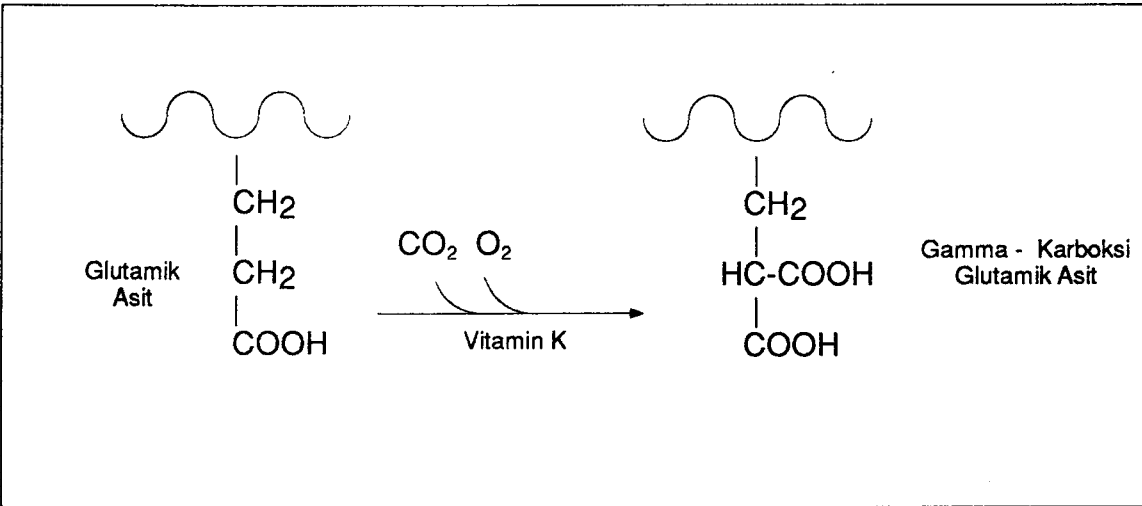
# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir çok karaciğer hastalığında protrombin zamanı uzamış olarak bulunur. K vitaminine bağımlı faktörlerin fonksiyonları hakkında kabaca fikir veren bu testin uzaması bazı durumlarda K vitamininin emilim bozukluğu yüzündendir. Bu durumda K vitamini verilmesi ile protrombin zamanı normale döndüğü halde siroz olgularında protrombin zamanı normale döndürülemez. Bunun sebebi K vitaminine bağımlı proteinlerin sentezindeki bir azalma mıdır, yoksa bunların ön maddelerinin sentezi normalken sadece glutamik asitlerin gamma karboksilasyonu mu bozuktur? Ya da her ikisi birlikte mi olmaktadır? Bu sorulara cevap arayışı günümüzde sürüp gitmektedir.

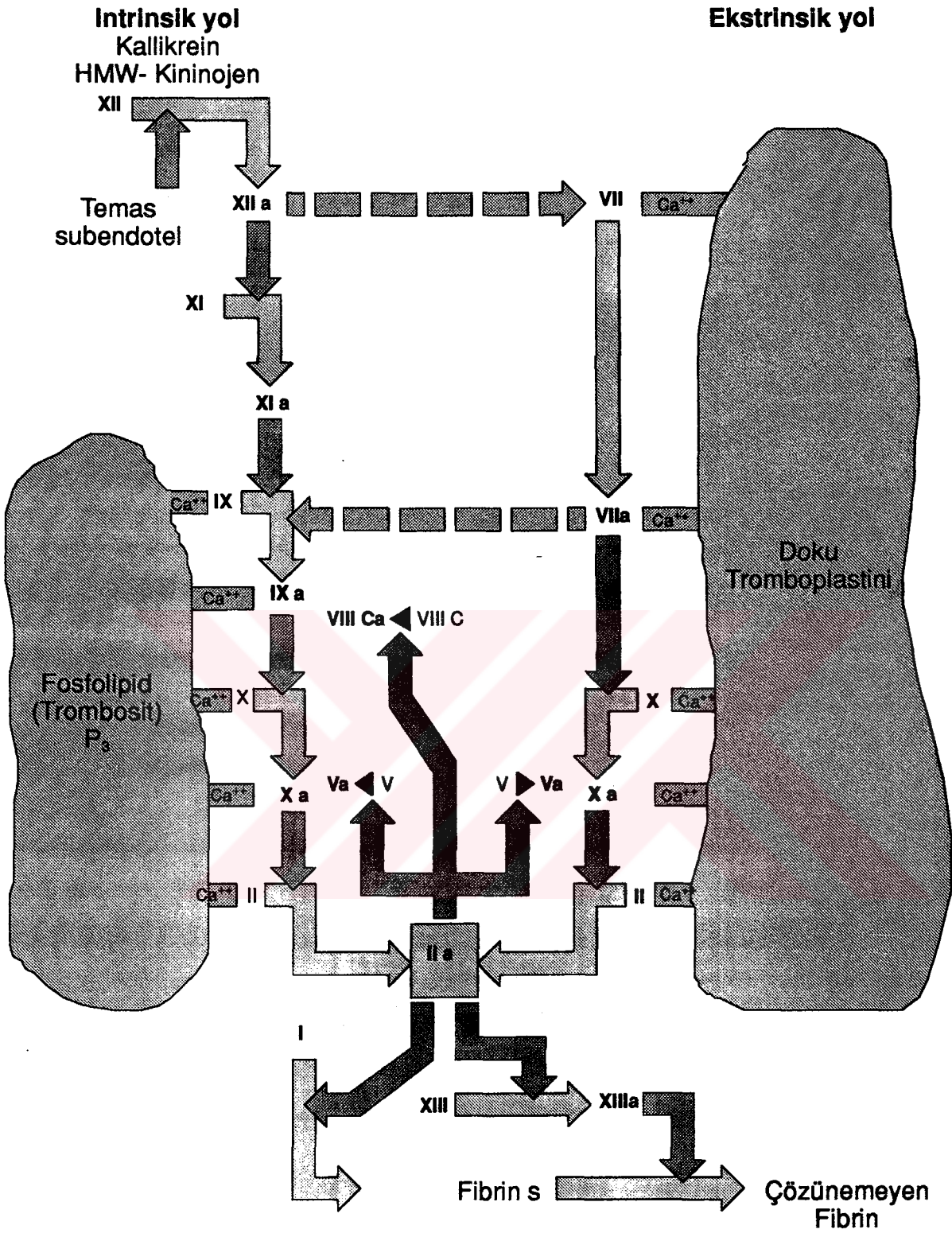
K vitaminine bağımlı proteinler arasında plazmada miktarı en yüksek olanı protrombindir. Normal insan protrombin molekülünün yapısal özellikleri kapsamlı bir şekilde bilinmektedir. Siroz olgularındaki protrombin molekülünün özelliklerini araştırabilmek için önce bunun saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Tek bir siroz olgusundan saflaştırmaya yetecek kadar plazma elde edilemeyeceğinden, bu çalışmada sirozlu bir hastaya ait asit sıvısından protrombinin saflaştırılması amaçlandı. Ayrıca daha ilerdeki çalışmalarda normal ve sirozlu olguya ait protrombinin karşılaştırılması için sağlıklı kişilere ait plazma havuzundan normal protrombinin de elde edilmesi planlandı.

## 2. GENEL BİLGİ

Protrombin (Faktör II), Faktör VII, IX, X, protein C ve protein S karaciğerde sentezi yapılan K vitaminine bağımlı plazma proteinleridir. Bu proteinlerin en önemli moleküler özelliği diğer proteinlerde bulunmayan gamma-karboksi glutamik asit (Gla) kalıntılarını ihtiva etmeleridir (1). Molekülün amino terminal bölgesinde yer alan ve sayıları 10-14 kadar olan Gla kalıntıları, bu proteinlerin ön maddelerindeki glutamik asitlerin karboksilasyonu ile meydana gelir (şekil 1). Bu reaksiyon sırasında K vitaminine gereksinim vardır. Sahip oldukları Gla kalıntıları sayesinde kalsiyuma bağımlı bir mekanizma ile fosfolipitlere bağlanma özelliği kazanırlar ve fizyolojik aktivitelerini göstermeleri için bu posttranslasyonel modifikasyon mutlaka gereklidir. K vitaminine bağımlı proteinlerin pıhtılaşma mekanizmasındaki fonksiyonları şekil 2’ de gösterilmiştir.



Şekil 1:K vitaminine bağımlı proteinlerdeki glutamik asitlerin gamma karboksilasyon reaksiyonu



Şekil 2:K vitaminine bağımlı proteinlerin pıhtılaşma mekanizmasına katılmaları



Protrombin, Faktör VII, IX ve X pıhtılaşmanın klasik proteinleri olarak işlev görürken, protein C (2-10) ve protein S (11,12) ise doğal inhibitörler olarak pıhtılaşmayı engellemeye çalışırlar. Protein Z ve M' de Gla ihtiva ederler, ama henüz fonksiyonları bilinmemektedir (1). Protein C trombin tarafından aktifleştirilen bir zimojendir ve fizyolojik aktivasyonu için endotel hücre yüzeyinde yer alan bir reseptöre ihtiyaç duyar. Protein S ile birlikte protein C, faktör V ve VIII' in aktif şekillerini inhibe eder (13,14).

Warfarin, Dicoumarol gibi ilaçlarla oral antikoagülant tedavisi uygulanan kişilerde sadece protrombin, faktör VII, IX ve X gibi pıhtılaşma faktörlerinin sentezi inhibe olmakla kalmaz, aynı zamanda protein C ve protein S' in de sentezi engellendiğinden, doğal inhibitör yolu inhibisyona uğrar. Protein C' nin yarılanma ömrü çok kısa olduğu için plazma doğal antikoagülant yolu, prokoagülant yolundan daha önce inhibe olur. Bu yüzden tedavinin başlangıcında pıhtılaşmaya eğilimin artması sürpriz değildir (15).

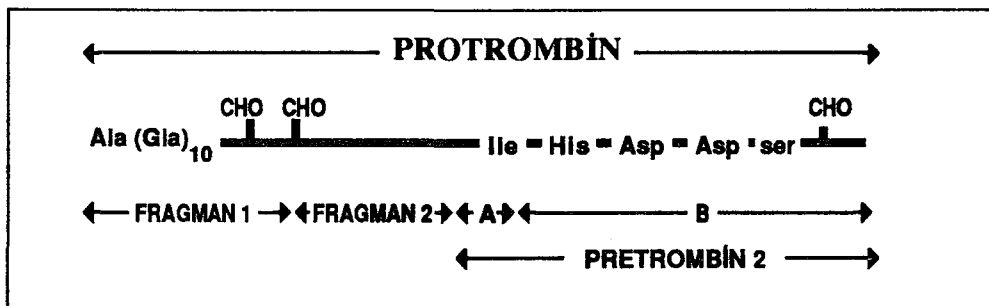
K vitaminine bağımlı proteinlerin sentezi yalnız karaciğerde yapılmaz, fonksiyonları başka olan diğer K vitaminine bağımlı proteinler, çeşitli dokularda üretilmektedir. Bunlar içinde en iyi bilinen kemik Gla proteini (BGP) ya da diğer adıyla osteokalsindir(16). Gla sentezi için gerek duyulan enzimler, karaciğer dışında kemik, böbrek, akciğerler ve testislerde anlamlı seviyede, diğer birçok dokuda ise daha düşük seviyelerde tesbit edilmiştir (1).

## 2.1. PROTROMBİN (FAKTÖR II)

Protrombin, plazma konsantrasyonu en yüksek olan K vitaminine bağımlı proteindir. Plazmada yarılanma ömrü 72-96 saat olan bir glukoproteindir ve yapısında gamma-karboksiglutamik asit taşır.

### 2.1.1. PROTROMBİNİN YAPISI

Protrombin yapısal olarak başlıca 2 bölgeye ayrılabilir. Bir tanesi Gla taşıyan "pro" kısmı, diğeri ise "trombine dönüşen kısım" dır (şekil 3). Pro kısmı 274 amino asitten meydana gelmiştir ve molekül ağırlığı 35000 dir. 77 ve 101 numaralı asparajine bağlı olarak 2 oligosakkarit zinciri taşır. Pro kısmında yapısal olarak birbirine benzeyen, fakat fonksiyonel olarak farklı olan 2 bölge vardır; protrombin fragman 1 ve 2.



Şekil 3: Protrombinin yapısı

Fragman 1, 1-156. amino asitler arasındaki bölge, fragman 2 ise 157-274. amino asitler arasındaki bölgedir. Bu 2 bölge birbirine çok benzer şekilde üçlü disülfid bağları taşır, her biri ilmiğe benzediği için, bu bölgeye "krinkle" adı verilmiştir. Burada ilginç olan taraf her iki bölgenin tersiyer yapılarının bir birine benzer olmasına rağmen, primer yapılarındaki amino asit dizilerinin çok farklı olmasıdır. Protrombinin pro kısmındaki bölgelerin yapısal bağımsızlığı ispatlanmıştır (17).

Fragman 1' in NH<sub>2</sub>-terminal ucundaki 40 amino asitlik dizi ayrı bir bölge oluşturur. Buna Gla bölgesi denir. Bu bölge 10 tane Gla ihtiva eder ve bunların 6 tanesi çift olarak yerleşmiştir. Bu şekilde yerleşim diğer K vitaminine bağımlı proteinlerde de, görülmektedir (18).

Park ve arkadaşları 1986' da Gla ihtiva eden protrombin fragman 1' i kristalize halde elde ettiler (19). X-ışınları kristallografi yöntemi ile "krigle" bölgesinin 3 boyutlu yapısını ortaya çıkardılar. Gla ihtiva eden NH<sub>2</sub>-terminal bölgede kristal yapısının düzensiz olduğunu gördüler. Bunu, membran bağlama görevini yaparken daha esnek bir yapıya sahip olma ihtiyacına bağladılar. Normal protrombin molekülü, kalsiyum iyonları varlığında konformasyon değişikliğine uğrar ve membranlardaki lipitlere kendiliğinden bağlanma özelliği kazanır (20,21).

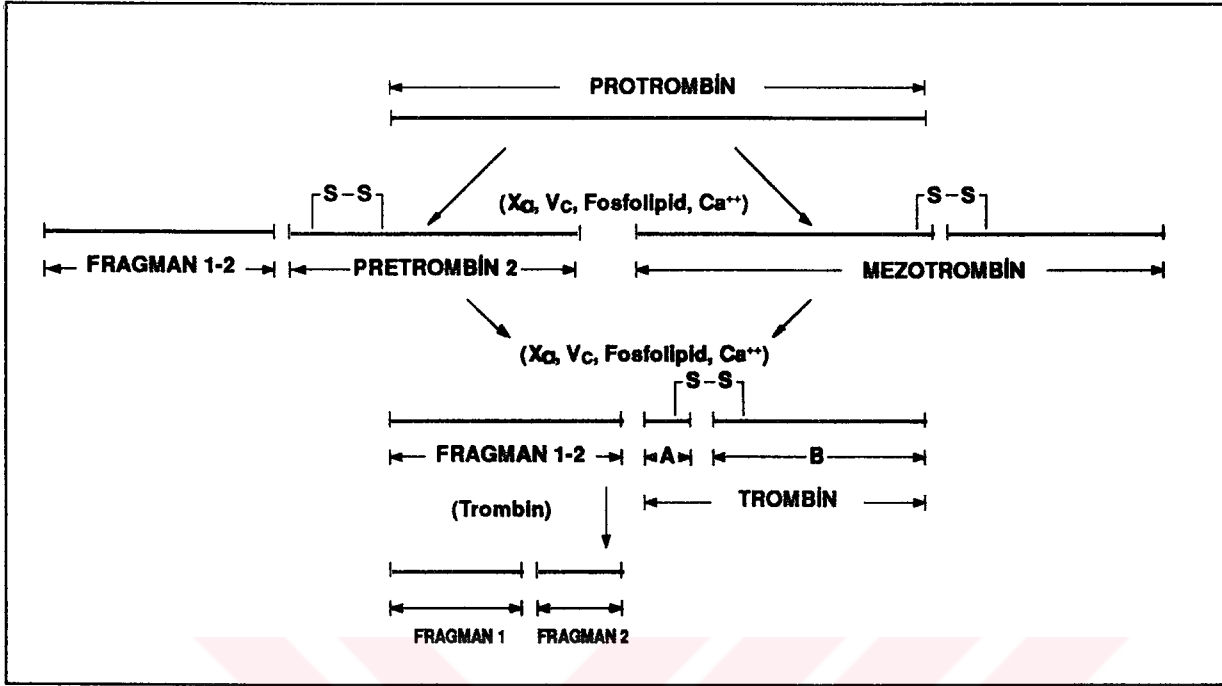
Protrombinin trombine dönüşen kısmına "pretrombin 2" denir. Bu bölgedeki amino asitlerin net yükü hafif (+) iken, "pro" bölgesindeki amino asitlerin net yükü (-) dir. Pretrombin 2, 308 amino asitten meydana gelmiştir. 376. asparajine bağlı olarak tek bir oligosakkarit zinciri taşır. Oligosakkarit zinciri trombinde 102. asparajine bağlıdır. Trombin hidrolitik aktivitesini, tripsin ve kimotripsine benzeyen bir yük-iletim sistemi sağlayan bir grup amino asit sayesinde göstermektedir. Bunlar trombindeki 92. serin, 248. aspartik asit ve 254. serindir. Trombin 22. ve 168. amino asitler arasında bir disülfid bağı taşır ve çift zincirlidir. Protrombinin aktif şekli olan bu molekül, proteolitik aktiviteye sahiptir. Ancak, hiç Gla taşımadığından K vitaminine bağımlı proteinlere benzer özelliği kalmamıştır. Artık fosfolipit yüzeylere bağlanamaz ve faktör Xa' nın bir substratı değildir (18).

## 2.1.2. PROTROMBİNİN FİZYOLOJİK AKTİVASYONU

Protrombin fizyolojik olarak faktör Xa ve Va tarafından yıkılarak trombin ve fragman 1 ve 2' yi verir (şekil 4). Trombinin aktif bölgesi B zincirindedir. Tripsin ve kimotripsin ile karşılaştırıldığında, evrime uğrayarak son şeklini aldığı fikri kuvvet kazanmaktadır. Trombinin bilgisayar yardımı ile çıkarılan 3 boyutlu yapısında, moleküle sonradan ilave oldukları sanılan bölgeler, molekülün dış kısmında yer almaktadır. Bu bölgeler moleküle yüksek bir substrat spesifikliğı kazandırmaktadır. Oligosakkarit zincirinin rolü henüz kesin olarak bilinmemektedir. Bu zincirin yapısı hem insanda hem de sığırdada aydınlatılmıştır. Terminal sialik asitler uzaklaştırıldığında diğer sialoglukoproteinlerde



olduğu gibi, plazmadan uzaklaştırılmaları çok hızlanmaktadır (22).



Şekil 4 : Protrombinin faktör Xa ile parçalanması ve trombin oluşumu.

## 2.2. PIVKA-II

Normal protrombindeki Gla kalıntılarında hiç sahip olmayan veya daha az sayıda sahip olan anormal protrombin molekülüne PIVKA-II denir. K vitamini eksikliğinde ya da warfarin gibi K vitamini antagonistlerinin varlığında protrombinin ön maddesinin postribozomal modifikasyonu yapılamaz. Yani glutamik asit kalıntıları gamma pozisyonunda karboksillenip Gla şekline dönemez. Bunlar normal protrombinle benzer immüno-lojik özelliğe sahiptir ama fizyolojik şartlarda fonksiyonel değildirler. Böyle bir protei-nin varlığı ilk defa 1963 yılında Hemker tarafından, dolaylı olarak, oral antikoagülant tedavisindeki kişilerin plazmasında tespit edildi(23). Daha sonra antijenik özellikleri protrombine benzeyen ama biyolojik aktivite göstermeyen bu protein bir çok araştırmacı tarafından plazmada bulundu. Bazıları buna PIVKA-II adını verirken, literatürde anor-mal protrombin, des-gamma-karboksi protrombin gibi isimlerle de karşımıza çıkmakta-dır. Sığırdan yapılan geniş ölçüdeki çalışmalar sonucunda PIVKA-II' nin çözünemeyen baryum tuzlarına adsorbe olmadığı ve çözeltilerdeki kalsiyum iyonlarına bağlanmadığı ortaya çıktı (24-27). Halbuki normal protrombin hem kalsiyum iyonlarını bağlayabilir hem de baryum tuzlarına adsorbe olabilir. PIVKA-II' nin normalden farklı olan bu özel-likleri fizyolojik şartlarda faktör Xa tarafından aktivasyonunu önlemektedir. Çünkü bili-yoruz ki protrombin ancak kalsiyuma bağımlı bir şekilde fosfolipit yüzeylere tutunup

aktifleşebilir (24). Malhotra bazı anormal protrombin tiplerinin de baryum tuzlarına adsorbe olabileceğini gösterdi (28). Vermeer ve arkadaşları oral antikoagülant verilen ineklerden 7 kademeli bir yöntemle anormal protrombini saf olarak elde ettiler (29). Bunun az da olsa fizyolojik aktiviteye sahip olduğunu ve bu aktivitenin normal protrombin kontaminasyonundan kaynaklanmadığını gösterdiler. Liebman, hepatomalı bir hastanın asid sıvısından affinite kromatografisi ile anormal protrombini saflaştırdı. Normal insan plazmasından elde ettiği protrombin ile anormal protrombinin özelliklerini karşılaştırdığı zaman normal, 10 Gla ihtiva ederken anormalin sadece 2 Gla ihtiva ettiğini belirledi (30).

Protrombin fizyolojik şartlar dışında bazı yılan zehirleri tarafından da aktive edilebilir. Bunlardan bir tanesi echis carinatus olup hem normal protrombini hem de anormali aktive edebilir (31-33). Stafilokoagülaz adı verilen ve staphylococcus aureus' un sekrete ettiği bir protein de hem normal (34) hem anormal (35,36) protrombinle kompleks teşkil ederek trombine benzeyen bir aktivite oluşturur. İnsanda meydana gelen kompleks trombin aktivitesine sahipken sığır protrombini ile oluşan kompleks bu aktiviteye sahip değildir. Stafilokoagülaz protrombindeki peptit bağlarını koparmadan trombine benzer aktiviteyi meydana getirdiği halde E. Carinatus bir peptit bağını, faktör Xa ise 2 peptit bağını kopararak trombin aktivitesini oluşturur (18).

PIVKA-II, kalsiyum bağlanmadığı için kalsiyum iyonları varlığında gerçekleştirilen elektroforezde katoda daha hızlı göç eder. Bu özelliğinden faydalanılarak "cross" immünelektroforez ile varlığı gösterilebilir (37).

PIVKA-II' nin yukarıda bahsedilen normalden farklı özellikleri göz önünde tutularak klinik amaçlar için kullanılmak üzere tayin metodları geliştirilmektedir. Bu amaçla kullanılan metodlardan bir tanesi immünokimyasal yolla hem normal hem de anormali birlikte ölçerek total protrombin tayin eder ve sonra fizyolojik aktivitesini ölçerek koagülant/antijen oranını hesaplar (38). Totali ölçmek için immünolojik metod yerine echis carinatus ile aktivasyon da kullanılabilir (33). Bu durumda da fizyolojik aktivasyonla bulunan koagülantın totale oranı anormal protrombin için bir kriter oluşturur.

Bir başka tayin metodunda ise normal protrombin önce alüminyum hidroksit (35,36), baryum sülfat (39) ya da baryum sitrat (40) jeline adsorbe ettirilir, daha sonra geride kalan PIVKA-II immünolojik yöntem ya da echis carinatus aktivasyonu ile ölçülür.

Kullanılan diğer bir teknik ise yarı kantitatif bir yöntemdir, PIVKA-II' nin varlığını veya yokluğunu belirtir. Amaç kalsiyum iyonları varlığında normal ve anormali agar gel elektroforezi ile ayırmak ve sonra protrombin antiserumu varlığında diğer yöne doğru tekrar elektroforeze tabi tutarak pikleri görmektir (37,41,42).

Bunların dışında direkt olarak PIVKA-II yi ölçen metodlar da geliştirilmiştir. Blanchard ve arkadaşları Warfarin ile tedavi edilmekte olan bir hastanın plazmasından anormal protrombini saflaştırdılar. Buna karşı elde edilen antiserum yardımı ile bir RIA

metodu geliştirdiler (43) ve çeşitli karaciğer hastalıklarında anormal protrombin tayini için kullandılar (44-46). Motohara ve arkadaşları uzun süreli Warfarin tedavisinde olan hastaların plazmasından anormal protrombini afinite kromatografisi ile saflaştırıp hücre fusion tekniğini kullanarak anormal protrombine karşı monoklonal antikor hazırladılar. Bununla bir ELISA metodu kurdular (47). K vitamini eksikliğini tesbit etmede(48-52) ve çeşitli hastalık gruplarında (53-58) bu yöntem kullanıldı.

## 2.3 K VİTAMİNİNE BAğIMLI REAKSİYON

### 2.3.1 K VİTAMİNİ

Kan pıhtılaşmasının olabilmesi için diyetle alınması gereken bir maddeye ihtiyaç olduğu 1929 yılında Dam tarafından ortaya atıldı(59). Kendisi o sıralarda tavukların diyetinde kolesterol bulunmasının gerekli olup olmadığını araştırıyordu. Hiç lipit içermeyen bir diyetle beslediği tavuklarda kanamaların olduğunu farketti. Bunların diyetine kaba yonca ekleyince veya bu bitkinin lipit ekstraktını verince tavuklar iyileşiyordu . Koagülasyonda gerekli olduğu için buna önce antihemorajik vitamin, daha sonra da K vitamini adı verildi. 1930' lu yıllarda araştırmalar yoğun şekilde devam etti. Doisy grubu şimdi fillokinon (K<sub>1</sub> vitamini) olarak adlandırdığımız 2-Metil-3-fetil-1,4-Naftokinonu izole edip, özelliklerini belirlediler(60). Dam ve Doisy bu araştırmaları ile Nobel ödülünü paylaştılar.

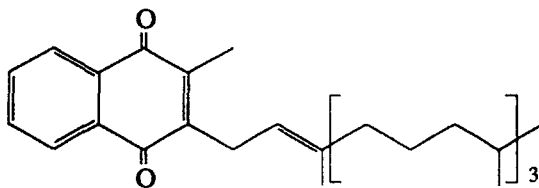
O zamanlar pıhtılaşma mekanizmasının reksiyonları tam olarak belirlenmemişti. Sadece protrombin ve fibrinojen biliniyordu. Dam, tavuk plazmasından kabaca saflaştırılmış bir protrombin fraksiyonu hazırladı ve K vitamini yetmezliğindeki tavuklardan benzer şekilde hazırladığı fraksiyonlarda daha düşük aktivite buldu. Faktör VII, IX ve X çok daha sonra 1950' lerde, protein C 1960' larda bulundu. Protein S ise 1977' de keşfedildi (61).

K vitamini olarak isimlendirdiğimiz bileşikler tabiatta 2 esas şekilde bulunur (şekil 5):

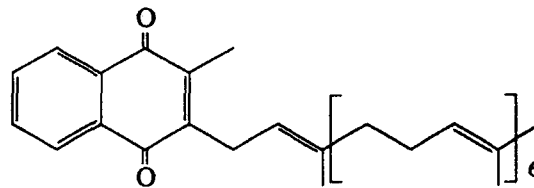
1-Fillokinonlar (K<sub>1</sub> vitamini), yeşil yapraklı bitkilerde bulunurlar.

2-Menakinonlar (K<sub>2</sub> vitamini), İntestinal bakteriler tarafından sentezlenirler.

Menakinonlar doymamış bir izoprenid yan zincirine sahiptirler ve menakinon-2, menakinon-3 gibi isimler alırlar (62).



Fillokinon



Menakinon-7

şekil 5: K vitaminlerinin kimyasal yapısı.

### 2.3.2 K VİTAMİNİNE BAĞIMLI KARBOKSİLİZ ENZİMİ

Protrombin molekülünde Gla mevcudiyetinin gösterilmesinden kısa bir süre sonra 1975' de Esmon ve arkadaşları K vitamini varlığında, protrombinin ön maddesini (Posttranslasyonel modifikasyona uğramamış protrombin molekülü)  $^{14}\text{CO}_2$  ile reaksiyona soktular ve molekülde,  $^{14}\text{CO}_2$  - gamma-karboksi glutamil kalıntılarının varlığını tesbit ettiler (63). Bu reaksiyon fare karaciğerinden elde edilen mikrozomların sağladığı enzimatik aktivite ile gerçekleştirilmişti. Reaksiyon oksijen, K vitamini ve bikarbonat ile post mikrozomal enerji kaynağı ve faktörlere gereksinim duyuyordu. Araştırmalar NAD(P)H veya indirgenmiş bir piridin meydana getiren bir sistemin varlığının gerektiğini gösterdi. Daha sonra K vitamininin indirgenmiş şeklinin yani K vitamini hidrokino-nun ( $\text{KH}_2$ ) bu stoplazmik faktörler etkisi ile değişikliğe uğradığı gözlemlendi. Karboksilaz enziminin genel özellikleri şimdi daha iyi bilinmektedir (64). Karaciğer mikrozomlarında çeşitli K vitamini redüktaz enzim aktiviteleri de tesbit edilmiştir (65).

Karboksilaz enzimi ATP' ye ihtiyaç duymaz. Reaksiyonun devamını sağlayan enerji, K vitamininin yeniden oksidasyonu ile sağlanıyor gibi görünmektedir. Enzim genellikle pH 7,2-7,4' de araştırıldı ve bunların çoğunda oksijen konsantrasyonu kontrollü değildi.  $\text{CO}_2$  konsantrasyonu ise 1 mM civarında tutuldu. Reaksiyonda  $\text{CO}_2$ , bikarbonata tercih ediliyordu. Enzimin oksijen gereksinimini araştırmak için yapılan çok az sayıdaki çalışma sonucunda  $K_m$ , 60-80 mM olarak bulundu. İlk çalışmalarda  $\text{KH}_2$  vitamininin konsantrasyonu da diğer bir çok reaktanda olduğu gibi sınırlı değilken daha sonra 50-100 mM civarında tutuldu. Deneysel çalışmalarda K vitamininin 3-tio eterleri oldukça aktif bulunmuştur, 3-oksi eterleri de aktiftir ama menadiol ve 2,3-dimetil 1,4-naftohidrokinon inaktiftir. Sahip olunan bilgiler, doğal şekilden küçük bazı sapmaların enzim aktivitesinde büyük değişiklikler yapmadığını, ama 3 nolu pozisyonun çok önemli olduğunu gösteriyor (66).

Karaciğer mikrozomlarından karboksilaz enzimi çeşitli deterjanlarla çözünürleştirilmiştir. Bunların içinde en iyisi CHAPS' dir (67). Sığır protrombininin ön maddesinden hazırlanan 5-9 amino asitlik bir peptidinin enzime substrat olabileceği ortaya çıktıktan sonra başka küçük molekül ağırlıklı peptit substratlar sentezlenmeye başlandı. Bunlarla yapılan çalışmalar enzimin substrat bağlama bölgesini belirlemede faydalı oldu (68). Genellikle Glu-Glu dizisine sahip olanların tek Glu taşıyanlara göre daha iyi substrat olduğu görüldü. Karboksilaz enziminin bu düşük molekül ağırlıklı peptitlerin çoğu için  $K_m$  değeri bir kaç mM olarak belirlendi. Bu durum karşısında, tesbit edilen düşük afinite enzime bağlanmada ikincil ve üçüncül yapının önemli olabileceğini düşündürmektedir. Osteokalsin 6800 molekül ağırlıklı ve 3 Gla taşıyan bir kemik proteini olup bunun dekarboksi şekli hepatik karboksilaz için substrat olarak kullanıldığında,  $K_m$  25 mM olarak bulundu. Bu bulgu, osteokalsinin hepatik karboksilaz için, daha sonraki çalışmalarda faydalı bir substrat olabileceği inancını doğurdu (65). Son zamanlarda karaci-

ğerden izole edilen hücrel protrombin ön maddesinin, propeptit bölgesini de ihtiva ettiği için çok iyi bir substrat olduğu gösterilmiştir. Öyle ki daha önce kullanılan des-gamma-karboksi protrombinlerden bile daha iyidir (69,70).

K vitaminine bağımlı proteinlerin sadece amino terminal 35 amino asitlik bölümündeki glutamil kalıntılarının gamma karbonunda karboksilasyonun olduğu biliniyor. ilginç olan şu ki molekülün diğer glutamil kalıntılarında hiç biri karboksillenmiyor. Karboksilasyon reaksiyonunun bu şekilde sonlanması muhtemelen sinyal peptidin uzaklaştırılması ile sağlanıyor. Bu konuyu aydınlatmak için yapılan incelemeler K vitaminine bağımlı proteinlerin amino asit dizilerinde glutamil kalıntılarının karboksilasyonu için sinyal özelliği taşıyan ve hepsinde müşterek olan bir amino asit dizilim bölümü olmadığını göstermektedir. Ancak bunların cDNA'larının dizilimi, primer gen ürününün bir "propeptit bölgesi" taşıdığını gösteriyordu. Bu bölge proteinin sekrete edilen şeklinin amino terminal ucuyla sinyal peptit dizisi arasında yer almaktadır (71). Buna benzer bir bölge osteokalsinde de bulununca buranın karboksilaz enziminin tanıma bölgesi olabileceği görüşü ortaya atıldı. Protein C ile yapılan ön çalışmalardan çıkan sonuç bu fikri destekliyordu. Ancak bu konuya tam açıklık getirmek için daha ileri bilgilere ihtiyaç duyulmaktadır (15,65).

### **2.3.3. K VİTAMİNİNE BAĞIMLI REAKSİYONUN MEKANİZMASI**

Başlangıçta K vitamininin moleküler etkisi hakkındaki spekülasyonlar 2 noktada toplanıyordu:

1- K vitamini CO<sub>2</sub> bağlanmasına zemin hazırlamak için glutamil kalıntılarındaki gamma hidrojenini uzaklaştırmakta bir kofaktördür.

2- Bir CO<sub>2</sub> taşıyıcıdır.

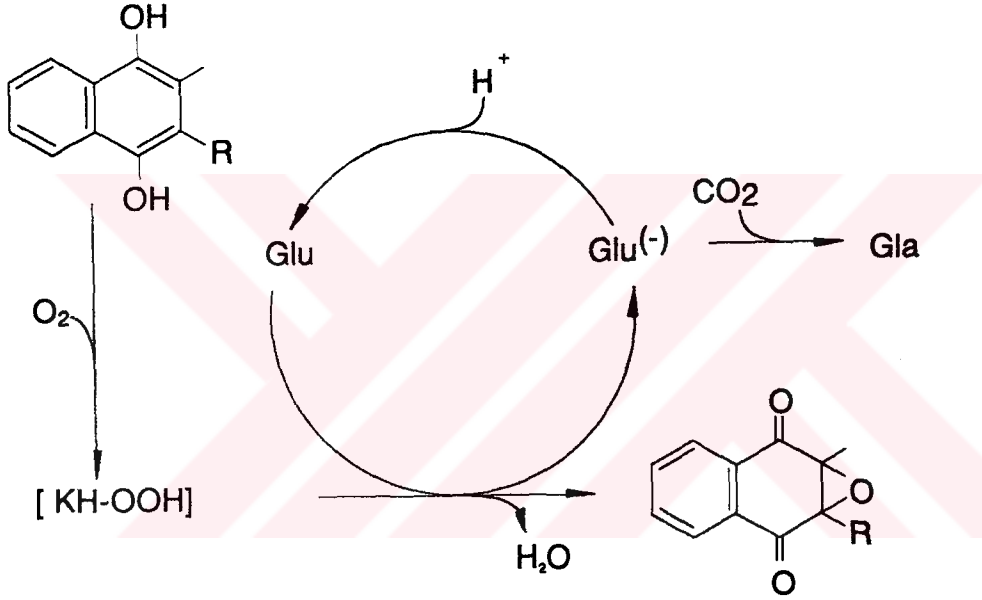
Son yıllardaki çalışmalar birinci hipotezi desteklemektedir. Şekil 6' da görüldüğü gibi günümüzde geçerli görüşe göre karboksilasyon reaksiyonu KH<sub>2</sub> vitaminini bunun 2,3-epoksit şekline dönüştüren mikrozomal K vitamini epoksidaz aktivitesi ile gerçekleştirmektedir.

Doymuş CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarında gerçekleştirilen reaksiyonlarda oluşan epoksit miktarı ile Gla arasında eşit bir sitokiometri vardır (72). Ama bu iki reaksiyonun birlikte meydana gelme mekanizması henüz bütün ayrıntıları ile belirlenmiş değildir. Muhtemelen epoksit şekline geçerken K vitamininin hidroperoksit gibi oksijenlenmiş bir ara ürününün oluştuğuna inanılmaktadır. Bu ara ürün henüz izole edilememiştir, fakat varlığına dair dolaylı kanıtlar bulunmaktadır (15,65,66).

K vitaminlerinin oksijenlenmiş şeklinin karboksilasyon reaksiyonu sırasında hangi mekanizma ile reaksiyona katıldığı henüz spekülatiftir. Bazı araştırmacılar gamma



karbonundan bir hidrojenin uzaklaştırılmasının geride bir karbanion bırakacak şekilde, bir protonun çıkartılması ile gerçekleştiği fikrini ortaya attılar. Bu reaksiyon sırasında  $^3\text{H}_2\text{O}$ ' dan  $^3\text{H}$ ' ın, substrattaki glutamilin gamma pozisyonuna,  $\text{KH}_2$  vitamini ve oksijene bağımlı olarak yerleştiği gösterilmiştir (73).  $^3\text{H}$  ' ın gamma karbonundaki hidrojen ile yer değiştirmesi ortamdaki bikarbonat konsantrasyonu artarken azalmaktadır.  $\text{CO}_2$  yokluğunda ise glutamil kalıntıları farklı bir gamma karboksi glutamik asit türevi oluşturmak yerine, sadece proton almaktadır(74). Şekil 6' da da görüldüğü gibi K vitamininin rolünün sadece gamma hidrojeninin uzaklaştırılması şeklinde olduğunu savunan radikal hipotez, bu bilgiler ışığında zorlanmaktadır. Bu hipotezin ispatı, nasıl olup da hidrojen çıkartılmasının epoksit oluşumu ile birlikte olduğu sorusuna açıklık getirilmesine bağlıdır.



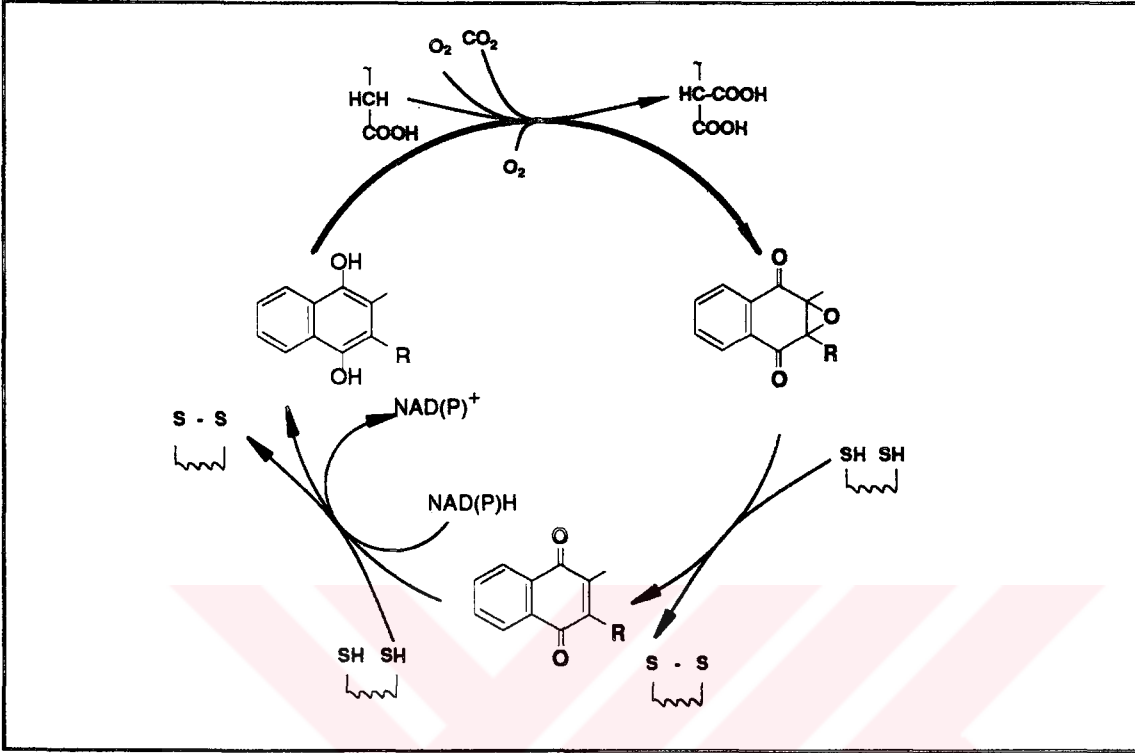
Şekil 6: K vitaminine bağımlı karboksilaz/epoksidaz sisteminin muhtemel mekanizması.

#### 2.3.4. KARACİĞERDE K VİTAMİNİ METABOLİZMASI

Gla üretimi K vitamini epoksit oluşumu ile beraber meydana geldiği için , K vitamininin aktif şekli olan  $\text{KH}_2$ ' yi yeniden meydana getirecek etkin bir mekanizmanın var olması gerekir. Şekil 7, karaciğerde K vitamini havuzunun metabolik dönüşümünü göstermektedir. Karaciğerde bir K vitamini epoksit redüktaz, en az iki belki daha fazla kinon redüktaz enzim aktivitesi tesbit edilmiştir. Mikrozomal epoksit redüktaz enzimi koenzim olarak bir piridin nukleotidden ziyade bir ditirole gereksinim duyar. Gerek çö-



zünürleştirilmiş gerekse çözünürleştirilmemiş mikrozoamlarla yapılan çalışmalar göstermiştir ki epoksit redüktazın katalizlediği reaksiyon, enzimin aktif bölgesindeki indirgenmiş bir disülfid ile epoksit arasında meydana gelmektedir (75,76).



Şekil 7: Fare karaciğer mikrozoamlarında K vitamini metabolizması.

Elde edilen bu bilgiler ve kimyasal model çalışmaları epoksit halkasının açılarak enzimin üzerinde yer alan bir sülfidril grubu ile tioeter meydana getirdiğini gösterdi. Bu ürünün daha sonra 3-hidroksi-K vitamininin enzime bağlı bir enolatına dönüştüğü, bundan su çıkmasıyla, enzim disülfid şekline geri dönerken K vitamininin de kinon şekline indirgeniği görüldü.

Şekil 7' de KH<sub>2</sub>' nin yeniden oluşumu için çeşitli reaksiyonların var olduğu görülüyor. DT-diaforaz enzim sistemi 1954' de Martius ve Strufe tarafından ortaya çıkarıldığından beri yoğun bir araştırma altındadır (77). Karaciğer DT-diaforazı (Fillokinon redüktaz) ile K vitamini redüktaz arasındaki ilişki geniş ölçüde araştırılmış ve bunun sonucunda hem sitozol hem de mikrozoamlardan izole edilen bir oksidoredüktazın DT-diaforazla aynı olabileceği ortaya çıkmıştır (78). Bu aktiviteye sahip olmayan deterjanla çözünürleştirilmiş mikrozoomal preparatlar, ortama saflaştırılmış redüktaz ve NADH eklenmedikçe K vitaminine bağımlı karboksilaz aktivitesi göstermediler. Bu bilgilere göre, fare karaciğerinde bu enzim fizyolojik olarak önemli bir K vitamini enzimi olabilir. DT-diaforaz K vitaminini KH<sub>2</sub> vitaminine indirgemektedir (79). Fakat insan karaciğerinde bu enzimin aktivitesi çok düşük olarak tesbit edildiği için, önemi şüphelidir (80).

Mikrozomlarda NAD(P)H' a bağımlı 2 redüktaz daha vardır; stokrom P-450 ve stokrom b5 redüktaz. Ancak bunların K vitamini ile ilişkileri yok gibi görülüyor, çünkü bunları inhibe eden maddeler K vitaminine ait reaksiyonlarda etkisizdir (81,82). Muhtemelen K vitaminine bağımlı reaksiyonlarda oksijenin fonksiyonel tipi farklı olabilir, K vitamini hidrokinon ve moleküler oksijen kullanılan reaksiyonun en aktif inhibitörleri SH inhibitörleridir. Ayrıca C vitaminin inhibitör etkisi görülmezken Trolox (Hoffman La Roche) gibi iyi bilinen lipitte çözülebilir anti oksidanlar, K vitamini hidrokinon ve oksijene bağımlı karboksilasyonu kuvvetle inhibe eder (66). İnvitro karboksilaz sistemlerinde daha sonraki çalışmalar göstermiştir ki, DT-Diaforaza karşı hazırlanan antikorlar deterjanla çözünürleştirilmiş [K vitamini + NADH] - bağımlı karboksilaz aktivitesinin tamamını ortadan kaldırmaz, sadece bir kısmını nötralize eder. Bundan K vitaminini indirgeyebilen ve Warfarine hassas olmayan, ikinci bir NADH' a bağımlı dehidrojenazın var olabileceği sonucu çıkarılabilir. Bu enzim membrana bağlıdır ve muhtemelen fizyolojik önemi daha fazladır (82). Deterjanda çözünürleştirilmemiş mikrozomlarda DTT, K vitamini karboksilaz reaksiyonunu yürütmede bir indirgeyici olarak hizmet eder (83,84). Hem K vitamini epoksitten hem de K vitamini kinondan mikrozomal preparatların katalizlediği bir reaksiyonla DTT' ye bağımlı olarak KH<sub>2</sub>' nin meydana geldiği açık bir şekilde gösterilmiştir (85,86). K vitamininin epoksitten meydana gelişi sırasında kinonun bir ara ürün olduğu sanılmaktadır (87).

K vitaminine bağımlı adeta bir birleşik fonksiyonlu oksidasyon gibi görev yapan bu karmaşık mekanizmanın tam açıklığa kavuşması için şu önemli sorulara cevap bulunması gerekiyor.

1- K vitamini hidrokinon ve oksijenden K vitamini kinon-2,3-oksit ne şekilde meydana geliyor ?

2- Oksijenin ve gamma karbonundan hidrojen çıkartılmasını sağlayan ve kilit ödevi gören K vitamininin oksijenlenmiş ara ürünün yapısı nasıldır ?

3- Gamma hidrojeninin uzaklaştırılmasından sonra geriye kalan ürün nonenzimatik olarak CO<sub>2</sub> bağlayabilen bir karbanion mudur, yoksa karboksilasyon için enzimatik bir reaksiyona gereksinim duyan bir radikal midir ?

Karboksilaz enziminin yaklaşık olarak 400 defadan fazla saflaştırılmaması iki veya üç enzimin bir kompleksi olma ihtimalini akla getiriyor. Bu yüzden reaksiyonun her kademesinin ayrı ayrı saflaştırılması yolunu denemek daha yararlı olabilir. Burada gerçekleşen birleşik fonksiyonlu reaksiyonun anlaşılması vücuttaki diğer benzer reaksiyonları anlamakta da faydalı olacaktır (66).

### 2.3.5. WARFARİNİN ETKİ BÖLGESİ

Warfarin epoksidi kinona indirgeyen enzimi inhibe eder ve aynı zamanda kinonu vitaminin aktif şekli olan hidrokinona dönüştüren yollardan birine de engel olur (şekil

7). Warfarin bu yüzden K vitaminine bağımlı karboksilazın aktivitesini azaltmak suretiyle, K vitaminine bağımlı proteinlerin karboksilasyonunu önler veya azaltır. Bu proteinler normal fizyolojik fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli olan kalsiyum iyonu/fosfolipit aracılı aktivasyonları mümkün olamayacağından, bu olguların trombotik potansiyelleri azalmış olacaktır.

## **2.4. KARACİĞER HASTALIKLARINDA HEMOSTATİK ANOMALİLER**

Akut ve kronik karaciğer hastalıklı kişilerde bazen travma olmaksızın anormal kanamalar meydana gelebilir ve hastanın hayatını ciddi şekilde tehdit edebilir. Akut fulminant hepatitli olgularda şiddetli gastroentestinal kanamalar meydana gelmektedir. Karaciğer hemostazda önemli bir merkez olduğundan bu durum şaşırtıcı değildir. Faktör VIII hariç bütün pıhtılaşma faktörleri; plazminojen, alfa-2 antiplazmin gibi fibrinolitik sistem proteinleri; protein C, protein S ve antitrombin III gibi doğal inhibitörler; C1 inhibitör, alfa-2 makroglobulin gibi düzenleyici proteinler karaciğerde sentezlenir. Ayrıca aktifleşmiş pıhtılaşma faktörleri ve plazminojen aktivatörlerinin dolaşımdan temizlenmelerinde önemli bir rol oynamaktadır.

Pıhtılaşma faktörlerinin sentezlerindeki azalmaya ilave olarak anormal fibrinojen sentezi, fonksiyon görmede yetersiz K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörleri, trombositopeni, trombosit fonksiyon anomalileri, DIC ve fibrinolizisde artma gibi olaylar karaciğer hastalıklarında görülen çeşitli hemostatik bozukluklardan sorumludur. Ancak her bir karaciğer hastalığında bu bozukluklar birbirinden çok farklı olarak gelişmektedir. Bu yüzden tezle ilgisi sebebiyle yalnız kronik karaciğer hastalıklarındaki bozukluklara yer verilecektir.

### **2.4.1. KRONİK KARACİĞER HASTALIKLARINDA GÖRÜLEN HEMOSTATİK ANOMALİLER**

#### **2.4.1.1. TROMBOSİTOPENİ:**

Karaciğer hastalıklarının üçte birinde az veya orta derecede trombositopeni görülebilir (88-90). Böyle hastaların kemik iliğindeki megakaryositlerin sayısı ve trombosit üretimi genellikle normal veya artmıştır. Kronik karaciğer hastalıklarındaki trombositopeninin esas sebebi, konjestif splenomegali yüzünden dalakta fazla miktarda trombositin toplanmasıdır. Normal olgularda dalak, total trombosit miktarının yaklaşık üçte birini bulundurur. Oysa, konjestif splenomegalisi olan sirozlarda total trombositin yaklaşık % 60-90'ı dalaktadır. Bununla beraber trombositlerin yaşam sürelerinin azaldığına

dair deliller de vardır. Hastaların %30'unda hem trombositlerin hem de fibrinojenin yaşam süresinin azalmasının trombin aracılı trombosit harcanması ile paralel olduğu görülmektedir. Ancak fibrinojenin yaşam süresi, heparin verilmesi ile normale yaklaştığı halde trombositler üzerinde bir etkisi tesbit edilmemiştir. Demek ki trombin aracılı trombosit harcanması dışında, mesela rejenere olmakta olan karaciğer endotelizasyonu tamamlanmamış sinüzoidlerde, trombositlerin hapsolması gibi başka bir mekanizmanın varlığı söz konusu olabilir. Alkolik karaciğer hastalıklarında genelde diyetle folik asit alımı yetersizdir ve buna bağlı olarak trombositopeni gelişir. Ayrıca etanol megakaryositlere ve dolaşımdaki trombositlere doğrudan toksik etki yaptığından trombositopeni oluşur.

#### **2.4.1.2. TROMBOSİT FONKSİYON BOZUKLUĞU**

Karaciğer hastalıklarında çeşitli trombosit fonksiyon bozuklukları tarif edilmiştir (88-90). Adezyon ve agregasyon bozuklukları bunlar arasındadır, ADP, epinefrin, trombin, ristosetine karşı agregasyonda bozukluklar görülmüştür. Bazı olgularda trombositopeni ile orantılı olmayarak ve hatta trombositopeni yokken bile kanama zamanının uzadığı görülmüştür. Bu karaciğer hastalığının şiddetine bağlıdır ve anormal trombosit agregasyonu yüzündendir. Kronik karaciğer hastalıklarındaki trombosit fonksiyon anomalilerinin yüksek plazma FDP konsantrasyonu sebebiyle olabileceği de öne sürülmüştür. Ama bazı çalışmalarda trombosit fonksiyon bozukluğu ile FDP yüksekliği arasında uygunluk görülmemektedir. Bu bozukluk araşidonik asitteki bir azalma ile ilgili olabilir. Belki de ATP/ADP oranındaki artma ile birlikte total trombosit adenin nükleotidlerindeki azalma yüzündendir. Alkolik karaciğer hastalarında, etanolün direkt toksik etkisi sebep olarak gösterilmektedir.

#### **2.4.1.3. DIC**

Kronik hepatoselüler hastalıklarda DIC sıklıkla görülür (88-92). Fibrinojenin ömrü kısalmıştır ama heparinle normale gelebilir. Fibrinopeptit A ve yüksek molekül ağırlıklı fibrinojen kompleksleri de sıklıkla artmıştır. Hafif kronik DIC, klinik olarak stabil hepatoselüler hastalıklarda meydana gelebilir. Fibrinojen ve muhtemelen faktör VIII, V ve XIII gibi trombine hassas olan diğer pıhtılaşma faktörlerinin katabolizmaları artmış olabilir. Nekrotik hepatositlerden kana prokoagülantların salınması, portal sistemdeki barsak kaynaklı endotoksinler, DIC için tetik çekici rol oynayabilir. İlave olarak, hasta karaciğer tarafından aktif pıhtılaşma faktörlerinin temizlenmesinin bozulması ve pıhtılaşma inhibitörlerinin azalmış olması DIC oluşumunu çabuklaştırabilir. Antitrombin III' ün hem antijenik hem aktivite olarak azalması görülmüştür (93). Ama sirozlarda antitrombin III eksikliği bozuk sentez ve intravasküler harcamadan çok transkapi-

ler akım yüzünden gibi görülmektedir. Bununla beraber inhibitör eksikliği görülen siroz olgularına saf antitrombin III' ün intravenöz yoldan verilmesi fibrinojenin ömrünü de uzatmaktadır. Pıhtılaşma sisteminin diğer bir düzenleyici proteini olan protein C' de siroz ve kronik aktif hepatitli olgularda azalmaktadır (94,95). Bu azalma, genellikle diğer klinik ve laboratuvar bulgularına paraleldir. Akut lösemi gibi sekonder karaciğer hastalıklarının bazısında protein C konsantrasyonundaki azalmanın şiddeti, antiprotrombin III eksikliği ile paralellik göstermektedir. Sirozlarda DIC anormal kanamaya yol açabildiği ve heparin de bu hemostatik anomalileri kısmen düzeltebildiği halde, bu hastalarda DIC' nin anormal kanamadan ne derece sorumlu olduğu genellikle belirsizdir.

#### **2.4.1.4. ANORMAL FİBRİNOLİZİS**

Bilindiği gibi fibrinoliz karaciğer sirozunda artmaktadır (88-90). Bu hiper fibrinolitik durum plazma veya öglobulin erime zamanında azalma ve FDP' de artışla karakterizedir. Hepatik klirensin azalması yüzünden plazmada plazminojen aktivatörlerinin konsantrasyonu artmış ve alfa-2 antiplazmin gibi doğal fibrinolitik inhibitörlerin seviyesi azalmıştır. Anomalilerin birlikte bulunması yüzünden sirozlarda plazminojenin ömrü kısalır ve seviyesi düşer. Ancak fibrinolizin artmış olması DIC' ye ikincil bir durum olabilir. Çünkü heparin verilmesi ile plazminojenin ömrü kısmen uzayabilmektedir. İn vitro fibrinoliz artması ile mukoz membran kanamaları arasındaki ilişkiye rağmen, kronik karaciğer hastalarında anormal kanamanın esas sebebinin bu olduğu ispatlanamamıştır.

#### **2.4.1.5. PIHTILAŞMA FAKTÖR ANOMALİLERİ**

Kronik karaciğer hastalıklarında parankimal hücrelerin ilerleyici kaybı yüzünden faktör VIII hariç hemen bütün pıhtılaşma faktörlerinin aktiviteleri düşer (96-98). Faktör VII, X ve protrombin genellikle birlikte azalırken faktör IX' daki azalma daha azdır (99,100).

Plazma fibrinojeni kronik karaciğer hastalıklarının çoğunda normal veya artmıştır. Ama ilerlemiş karaciğer sirozunda az ya da orta derecede hipofibrinojenemi görülür. Bu, sentez bozukluğundan, asit ve ödem gibi damar dışı bölgeye kayıp yüzünden, DIC' de olduğu gibi fazla kullanımdan dolayı olabilir. Ayrıca hücrel proteazlar sebebiyle artmış olan fibrinojen katabolizması da bu durumdan sorumlu olabilir (88-90).

Disfibrinojenemi anormal fibrin polimerizasyonu ile karakterizedir ve karaciğer hastalıklarında yaygın olarak görülür. Buna yol açan sebep fibrinojen moleküllerindeki sialik asit miktarının fazlalığı olabilir. Disfibrinojenemi trombin zamanının (TT) uzamasından sorumlu olabilir. Bu durum fibrinojen seviyesi normal veya hafifce azalmışken ya da FDP' ler normal veya hafifce azalmışken de görülebilir. Disfibrinojeneminin anormal kanama ile olan ilişkisi belirli değildir.



Faktör VIII seviyelerinde vWF ile birlikte orta derecede artma görülebilir. Faktör VIII' in esas üretim yeri hepatositlerden ziyade damar endotelidir. Faktör VIII:Ag ve vWF vücudun çeşitli bölgelerindeki endotel hücrelerinde üretilir. Fakat faktör VIII:C' nin üretim yeri henüz bilinmemektedir. Bazı hastalarda vWF' ne nazaran faktör VIII daha düşük seviyelerdedir (101).

Faktör V seviyeleri kronik karaciğer hastalarında genellikle düşük bulunmuştur (102).

## 2.4.2. KARACİĞER HASTALIKLARINDA HEMOSTAZİSİN LABORATUVAR DEĞERLENDİRİLMESİ

Karaciğer hastalığı şüphesi olan anormal kanamalı hastalar ya da cerrahi müdahale yapılacak olgulara bir pıhtılaşma tarama profili yapılır: kanama zamanı, trombosit sayımı, aktive kısmi protrombin zamanı (APTT), protrombin zamanı (PT) ve trombin zamanı (TT). Kanama zamanı ve trombin sayımı trombositopeni, trombosit fonksiyon bozukluğu gibi primer hemostaz bozukluğu yapan sebepleri açığa çıkarmada faydalıdır. APTT ve PT' nin birlikte azaldığı durum ise ilerlemiş hepatoselüler harabiyettir. PT' deki uzama APTT' den daha fazladır .Karaciğerin az veya orta derecedeki harabiyetlerinde APTT normal kalırken, sadece PT uzayabilir. Çünkü APTT K vitaminine bağlı faktörlerin hafifce azalmasından etkilenmez.

Clauss metoduyla fibrinojen tayini, fibrin oluşumunun hızını ölçme prensibine dayanır. Ellis ve Stranky metodu ise zamandan bağımsız olarak pıhtılaşabilen fibrinojen miktarını ölçer. Bu yüzden birinci metodla ölçülen fibrinojen miktarları daha düşüktür. Bunun sebebi disfibrinojenemi, FDP ve paraproteinler fibrin polimerizasyonunu bozmaları olabilir. Muhtemelen TT disfibrinojenemiye daha hassas olarak belirler.

Karaciğer hastalıklı kişilerin kanama riskini ölçmek için pek çok çalışma yapılmıştır. Bazı hastalarda ılımlı hemostatik anomaliler varken, anormal kanamalar gelişmekte, ama PT' leri daha uzun olanlarda travmalara cevap olarak daha fazla anormal kanama olmaktadır. K vitaminine çok az veya hiç cevap vermeyen, PT' leri belirgin şekilde uzamış hastaların genel prognozu da iyi değildir. PT' nin albumin, asetilkolinesteraz ve kolesterolden daha iyi bir hepatoselüler yetmezlik göstergesi olarak uzun süreli takipte faydalı olacağı savunulmaktadır . Normotest sadece faktör VII, X ve II' ye hassastır ama hepatoselüler fonksiyon bozukluğunu tesbitte PT' den daha üstün değildir. Literatürde halen tek faktör ölçümlerinin bu amaçla kullanımı konusunda yoğun araştırmalar devam etmektedir (96-98,101,103). Hastada pıhtı oluşumu mu yoksa kanama mı gelişeceği faktör ve inhibitörlerin bir birlerine göre olan durumuna bağlıdır.Bu hemostatik denge rutin pıhtılaşma testleri ile ortaya konamaz.

K vitamini eksikliği ve karaciğer hastalıklarında PIVKA' lar (des-gamma-



karboksi proteinler) meydana gelir. Bunlar kalsiyum ve fosfolipit bağlayamadıkları için fonksiyonel değildirler. Son zamanlarda bu konudaki çalışmalar hızlanmıştır. Bu anormal proteinleri ölçen testlerin, klasik fonksiyonel testlerden daha spesifik olabileceği düşünülmektedir.

Liebman ve arkadaşları (46) hepatoselüler karsinomlu olguların % 91'inde, Soulier ve arkadaşları (35,36) % 71 ve % 74'ünde, Fujiyama ve arkadaşları (53,104) % 65 ve % 63'inde, Deyashiki ve arkadaşları (105) % 77'sinde, Ho ve arkadaşları (106) % 80'ninde, Lefrere ve arkadaşları (107) % 69'unda yüksek PIVKA-II seviyesi tesbit ettiler.

Blanchard ve arkadaşları 14 akut hepatitli olgunun 13'ünde, 14 sirozlu hastanın 13'ünde anormal protrombini RIA ile tesbit ettiler. Ama bunların seviyesi çok düşüktü ve normal protrombin ile anormal arasında bir ilişki yoktu (44). Soulier ve arkadaşları (35,36), Ho ve arkadaşları (106) sirozlarda, PIVKA-II değerlerini normal olgularınkine yakın bulurken Fujiyama ve arkadaşları (53) çok az sayıda ki olguda hafif yüksek buldular. Lefrere ve arkadaşları (107) sadece % 1,6'sında yüksek buldular, ama olguların çoğunda normalden farklı değildi.

Kaplan ve arkadaşları primer biliyer siroz olgularında anormal protrombini yüksek buldular, bunu K vitamini yetmezliğine bağladılar (45).

## **3. ARAÇ GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **3.1. ARAÇ VE GEREÇLER**

#### **3.1.1. KİMYASAL MADDELER**

Kolon kromatografisinde Pharmacia'nın DEAE Sephadex A-50, DEAE Sephacel, Heparin Sepharose CL-6B kromatografi ürünleri kullanıldı.

Hematolojik tayin metodları için gerekli kit ve reaktifler Stago'dan temin edildi: Hemo-reagent AC, Kalsiyum Neoplastin, Staphylocoagulase, Trombin için kromojenik substrat CBS 34,47, Owren-Koller tamponu, Antiserumlar (Assera II, Assera VII, Assera IX, Assera X, Assera Protein C, Assera Protein S).

Tyrasilol (Aprotinin) Bayer'den sağlandı.

Benzamidin HCl, N-N'-metilen-bis-akrilamid, molekül ağırlığı kalibrasyon kiti, soya fasülyesi tripsin inhibitörü, fenilmetansülfonil florür Sigma olarak kullanıldı.

Akrilamid, TEMED, merkaptoetanol, bromfenol mavisi, Coomassie Brilliant Blue R-250, SDS ve diğer kimyasal maddeler Merck olarak ve reaktif saflığında kullanıldı.

#### **3.1.2. CİHAZLAR VE DİĞER GEREÇLER**

Frac-100 fraksiyon toplayıcı, Pump-1 peristaltik pompa, XK16/40, XK26/40 çift adaptörlü kolonları Pharmaciadan temin edilerek kolon kromatografisinde kullanıldı. 280 ve 260 nm dalgaboyundaki ölçümler Shimadzu 1200 UV spektrofotometrede yapıldı; lineer gradient için el yapımı cam silindirik düzen ve manyetik karıştırıcı kullanıldı. Ultra filtrasyon ve konsantrasyon için Millipore Minitan S ultrafiltrasyon sistemi ve PTGCOMSIO membran, Stafilokoagülaz ve kromojenik substrat ile protrombin tayi-

ninde Clinicon 4010 fotometre kullanıldı. Ayrıca Sarsted LC-1K soğutmalı santrifüj, Helena titan III güç kaynağı ve tankı, Helena Cliniscan 2 dansitometre, Isolab Resolve Omega elektroforez sistemi (CWS-2000 güç kaynağı ve izotermal kontrollü elektroforez tankı)'nden faydalanıldı. PAGE-disk elektroforez tankı el yapımıydı. Slab jel SDS-PAGE için Schleicher & Schuell Profil sistemi kullanıldı.

### **3.1.3 NORMAL PLAZMA HAVUZU**

Normal protrombinin saflaştırılmasında kullanmak amacıyla 7 sağlıklı vericiden Haseki Hastanesi kan merkezinde sitratlı olarak torbalara alınan kan örnekleri derhal 4<sup>0</sup> C' de, plastik tüpler içinde 1500 rpm' de 15 dakika santrifüj edilerek eritrositleri uzaklaştırıldı. Plazma 4000 rpm' de 20 dakika santrifüj edildi ve trombositten fakir plazma (PPP) elde edildi. Bunlara 50 mg/l soya fasülyesi tripsin inhibitörü, 1 mM fenilmetansülfonil florür ve 10 mM benzamidin HCl olacak şekilde proteaz inhibitörleri ilave edilerek -20<sup>0</sup> C' de plastik şişeler içinde saklandı. En çok 12 gün bekletildi.

Vericilerin HBsAg, HBeAg, anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs' leri menfi, protrombin zamanları 12-13 saniye arasında (Normali 12 saniye) ve serum total protein ve albumin değerleri normaldi.

### **3.1.4. ASİT SIVISI**

Haseki Hastanesi 1. Dahiliye Kliniğinde siroz teşhisi ile yatmakta olan bayan C.G (prot. No: 14979)' den asid sıvısı, 1 mM benzamidin HCl ihtiva eden 0.11 M trisodyum sitrat ile 1/10 oranında karıştırıldı. Bu şekilde 1650 ml olarak elde edilen sitratlı asid sıvısına 50 mg/l soya fasülyesi tripsin inhibitörü, 1 mM fenilmetansülfonil florür ve 500 U/ml tyrasilol olacak şekilde proteaz inhibitörleri ilave edildi. Plastik şişe içinde 15 gün -20<sup>0</sup> C' de saklandı.

Aynı hastadan inhibitör ihtiva eden 20 ml sitratlı kan alınıp trombositten fakir plazma elde edildi ve -20<sup>0</sup> C' de 1 hafta saklandı.

## **3.2. YÖNTEMLER**

Saflaştırma kademelerindeki işlemler 4<sup>0</sup> C' de yapıldı. Santrifüj işlemleri için soğutmalı santrifüj kullanıldı. Soğuk odaya sahip olunmadığı için, kolon, pompa ve fraksiyon toplayıcı bir buzdolabına yerleştirilmek suretiyle kromatografiler yapıldı. Karıştırma işlemleri de buzdolabına yerleştirilen manyetik karıştırıcıda yapıldı. Minitan S sistemi kullanılırken protein çözeltisi buz banyosunda tutuldu.

### **3.2.1. NORMAL PLAZMA HAVUZUNDAN PROTROMBİNİN SAFLAŞTIRILMASI**

#### **3.2.1.1. PROTROMBİN KOMPLEKSİNİN ELDE EDİLMESİ**

Uras' ın sığır plazmasından protrombin kompleksi elde etmek için uyguladığı yöntem kullanıldı (108). Önce baryum sitrat adsorbsiyonu ile K vitaminine bağımlı proteinler plazmadan ayrıldı ve sonra amonyum sülfatla elüsyon yapıldı.

-20<sup>0</sup> C'den çıkarılan normal vericilere ait 7 adet trombositten fakir plazma (PPP), 4<sup>0</sup> C' de çözündürüldü. Kriyopresipitat 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Plazmalar bir plastik şişeye toplanarak havuz hazırlandı. 1570 ml' lik bu havuza 175 ml 1 M BaCl<sub>2</sub> azar azar, karıştırılarak ilave edildi. 1 saat karıştırılarak bekletildi. Sonra 4000 rpm' de 20 dakika santrifüj edilip çökelek alındı. Üzerine 0,01 M BaCl<sub>2</sub>, 0,1 M NaCl, 1 mM Benzamidin HCl ve % 0,02 g NaN<sub>3</sub> ihtiva eden yıkama çözeltisi ilave edilip süspansiyon hazırlandı. Aynı şartlarda santrifüj edildi. Çökelti bu şekilde toplam 3 defa yıkandıktan sonra çökelek üzerine 105 ml % 40 doymuş (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edildi. Bir gece yavaşça karıştırılmaya bırakıldı. 4000 rpm' de 1 saat santrifüj edildi. Üst faza % 67 doymuluk verecek şekilde % 100 doymuş (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> karıştırılarak ilave edildi. 4000 rpm' de 1 saat santrifüj edilerek elde edilen çökelti 15 ml 0,2 M NaCl ve 1 mM benzamidin HCl ihtiva eden 0,05 M sodyum fosfat tamponunda (pH 6,0) çözüldü. Aynı tampona karşı bir gece dializ edildi.

#### **3.2.1.2. NORMAL PROTROMBİN KOMPLEKSİNİN DEAE SEPHADEX A-50 KOLON KROMATOĞRAFİSİ (108)**

Dializden çıkartılan protrombin kompleksi, 4000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. Numune, dializ tamponu ile dengelenmiş 1,6 x 15,5 cm' lik DEAE Sephadex A-50 kolonuna uygulandı. Peristaltik pompa 0,25 ml/dak. ve fraksiyon toplayıcı 3,5 ml/tüp olacak şekilde programlandı. Numune tatbiki bitince kolon denge tamponu ile yıkandı. Sonra 250 ml denge tamponu ve 250 ml 0,6 M NaCl ve 1 mM benzamidin HCl ihtiva eden 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 6,0) ile lineer gradient elüsyonu yapıldı.

#### **3.2.1.3. HEPARİN SEPHAROSE CL-6B KOLON KROMATOĞRAFİSİ İLE PROTROMBİNİN SAFLAŞTIRILMASI**

Heparin Sepharose CL-6B kolon kromatografisinde, Bajaj ve arkadaşlarının (109) insan protrombinini saflaştırılmasında kullandıkları sitrat tampon sistemi tercih

edildi. Protrombin ihtiva eden fraksiyonlardan hazırlanan havuzun, önce Minitan S ultrafiltrasyon sisteminde PTGCOMSIO membran ve 1 mM benzamidin HCl ihtiva eden 0,02 M sitrat tamponu (pH 7,5) kullanılarak, tamponu değiştirildi ve konsantre edildi. Bu tamponla dengelenmiş 1,6 x 9 cm'lik Heparin CL-6B kolonuna, 28 ml konsantre numune 0,205 ml/dak. akım hızı ile tatbik edildi. Fraksiyonlar tüp başına 2 ml olacak şekilde toplandı. Denge tamponuyla yıkandıktan sonra 250 ml denge tamponu ve 250 ml 0,6 M NaCl ve 1 mM benzamidin HCl ihtiva eden 0,02 M sodyum sitrat tamponuyla lineer gradiyent elüsyonu yapıldı.

### **3.2.2. ASİT SIVISINDAN PROTROMBİN SAFLAŞTIRILMASI**

#### **3.2.2.1. PROTROMBİN KOMPLEKSİNİN ELDE EDİLMESİ**

Bajaj ve arkadaşlarının normal insan protrombin kompleksini elde etmede uyguladıkları yöntem kullanıldı (110).  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den çıkartılan asit sıvısı, buzdolabında çözülmeye bırakıldı. Kriyopresipitatu ayırmak üzere 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. 1120 ml asit sıvısı üstüne 90 ml 1 M  $\text{BaCl}_2$  damla damla ilave edilerek 1 saat buzdolabında karıştırıldı. 4000 rpm'de santrifüj edilerek üstteki adsorbe edilmiş asit sıvısı  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Çökelek ise 370 ml sitrat salin çözeltisi (0,02 M trisodyum sitrat, 0,15 M NaCl, 0,01 M benzamidin HCl ve 50 mg/ml soya fasülyesi inhibitörü) ilave edilerek süspansiyon haline getirildi. Üzerine 90 ml 1 M  $\text{BaCl}_2$  yavaşca karıştırılarak ilave edildi. 30 dakika karıştırıldı ve 1 saat 4000 rpm'de santrifüj edildi. Çökelek yine aynı miktarlardaki sitrat salin ve 1 M  $\text{BaCl}_2$  ile muamele edildi. Buradan elde edilen çökeleğe 43 ml 50 mM benzamidin HCl ihtiva eden % 40 doymuş  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ilave edildi ve 3-4 saat karıştırıldı, 1 saat 4000 rpm'de santrifüj edilip üst faz ayrıldı. Çökeleğe tekrar 23,5 ml 50 mM benzamidin HCl ihtiva eden % 40 doymuş  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ilave edildi. santrifüjden sonra üst faz bir önceki ile birleştirilip, % 67 doygunluğa gelinceye kadar % 100 doymuş  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ilave edilip karıştırıldı. 4000 rpm'de 1 saat santrifüj edilerek çökelek ayrıldı,  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

#### **3.2.2.2. DEAE SEPHACEL KOLON KROMATOĞRAFİSİ**

Bajaj ve arkadaşlarının normal plazmadan protrombin elde ederken bu kademe de tercih ettikleri tampon sistemi kullanıldı (110). Asid protrombin kompleks çökeleği 5 ml 0,1 M NaCl, 1 mM benzamidin HCl, 50 mg/ml soya fasülyesi tripsin inhibitörü ihtiva eden 0,025 M sodyum sitrat tamponunda (pH 6,0) çözüldü. Aynı tampona karşı bir gece dializ edildi. Numune 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. 0,45  $\mu$ 'luk filtreden süzüldü.

Bu şekilde hazırlanan numune, 0,1 M NaCl, 1 mM benzamidin HCl, 0,1 mM fenilmetansülfonil florür ihtiva eden 0,025 M sodyum sitrat tamponu (pH 6,0) ile dengelenmiş 2,6 x 30 cm'lik DEAE Sephacel kolonuna 0,6 ml/dak. hızla tatbik edildi. Tüp başına 3,42 ml fraksiyonlar toplandı. Yıkama işleminden sonra 300 ml denge tamponu ve 300 ml 0,75 M NaCl ihtiva eden denge tamponu ile lineer gradient elüsyonu yapıldı.

### **3.2.2.3. HEPARİN SEPHAROSE CL-6B KOLON KROMATOĞRAFİSİ (109)**

Hazırlanan protrombin fraksiyon havuzu, 1 mM benzamidin HCl, 0,1 mM fenilmetansülfonil florür ihtiva eden 0,02 M sodyum sitrat tamponu (pH 7,5)' na karşı bir gece dializ edildi.

Dializ tamponu ile dengelenmiş 1,6 x 17,5 cm'lik Heparin Sepharose CL-6B kolonuna tatbik edildi. Akım hızı 0,22 ml/dak., fraksiyon hacmi 2,2 ml/tüp olarak ayarlandı. Aynı tamponla kolon yıkandı. 125 ml denge tamponu ve 125 ml 0,75 M NaCl ihtiva eden denge tamponu ile lineer gradient elüsyonu yapıldı.

### **3.2.3. ADSORBE EDİLMİŞ ASİTTEN PROTROMBİNİN SAFLAŞTIRILMASI**

#### **3.2.3.1. DEAE SEPHACEL KOLON KROMATOĞRAFİSİ**

Bu amaçla Michalski ve arkadaşlarının insan plazmasından baryum tuzlarına adsorbsiyon yapmadan faktör IX konsantresi elde etmede kullandıkları tampon sistemi kullanıldı (111). 1 mM benzamidin HCl, 0,1 mM fenilmetansülfonil florür ihtiva eden 5 mM sitrat, 5 mM fosfat tamponunda (pH 6,0) dialize bırakılan adsorbe edilmiş asit sıvısı, ertesi gün santrifüj edildi ve çökelek uzaklaştırıldı. 0,45 µ' luk Millipore filtreden süzülüp, dializ tamponu ile dengelenmiş 2,6 x 30 cm' lik DEAE Sephacel kolonuna, 0,8 ml/dak. hızla tatbik edildi. Fraksiyonlar 8,5 ml/tüp olacak şekilde toplandı. Kolon yaklaşık 870 ml denge tamponu ile yıkandı. Daha sonra 300 ml denge tamponu ve 300 ml 0,7 M NaCl, 1 mM Benzamidin HCl ve 0,1 mM fenilmetansülfonil florür ihtiva eden denge tamponuyla lineer gradient uygulandı. Gradyent bitiminde 250 ml 0,7 M NaCl ihtiva eden gradient tamponu ile kolon yıkandı. Denge tamponu blank olarak kullanılarak fraksiyonların absorbansı 260 ve 280 nm dalga boyunda okundu. Ayrıca stafilokoağulaz ve kromojenik substrat CBS 34.47 kullanılarak protrombin tayini yapıldı. Gradyent sonrası protrombin ihtiva eden fraksiyonlardan havuz hazırlandı.



### 3.2.3.2. HEPARİN-SEPHAROSE CL-6B KOLON KROMATOĞRAFİSİ (109)

DEAE Sephasel kolon kromatografisinden hazırlanan protrombin havuzunun tamponu, Minitan S ultrafiltrasyon sisteminde 1 mM benzamidin HCl ve 0,1 mM fenilmetansülfonil florür ihtiva eden 0,02 M sitrat tamponu (pH 7,5) kullanılarak değiştirildi ve konsantre edildi. Konsantre numune bir gece aynı tampona karşı dialize bırakıldı.

1,6 x 9 cm' lik Heparin Sepharose CL-6B kolonu dializ tamponu ile dengelendi. 0,45 µ filtreden süzölmüş numune 0,2 ml/dak. akım hızı ile kolona tatbik edildi. Fraksiyonlar 2,1 ml/tüp olacak şekilde toplandı. Kolon denge tamponu ile yıkandı. Sonra 125 ml denge tamponu ve 125 ml 0,8 M NaCl ihtiva eden denge tamponu ile lineer gradiyent elüsyonu yapıldı. Stafilokoagülaz / kromojenik substrat kullanılarak protrombin aktivitesi saptanan gradiyent sonrası fraksiyonlardan havuz hazırlandı.

### 3.2.4. SDS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE)

Karışımlardaki proteinleri moleköl ağırlıklarına göre ayırmak ve elde edilen proteinlerin elektroforetik saflığını göstermek için SDS-PAGE disk elektroforezi yapıldı (112). Her parti çalışmada düşük moleköl ağırlıklı protein standardı kullanıldı. Elektroforez oda ısısında gerçekleştirildi. 7 ml Akrilamid (% 30 g) / Bis-akrilamid (% 0,8 g) stok çözeltisi, 3 ml 1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,20), 0,3 ml % 10'luk SDS, 1,5 ml % 1,5'luk amonyum persülfat ve 18,2 ml distile su bir erlen içinde karıştırılıp 4<sup>0</sup> C' de vakum altında degaze edildi. Karışıma 0,03 ml TEMED ilave edildi. Bu şekilde elde edilen % 7' lik poliakrilamid çözeltisi, disk elektroforezi için 10 cm boyunda ve 0,6 cm çapında cam silindirlere 7 cm yüksekliğinde döküldü. Üst tarafa 0,05 ml distile su tabakalandırıldı ve oda ısısında polimerize olması beklendi. Slab jel elektroforezi için 10 x 10 cm' lik camlar kullanıldı ve jel 1 mm kalınlığında hazırlandı. Protein konsantrasyonu 0,05-1 mg/ml olan protein çözeltisi, % 2 SDS, % 5 MET ve % 10 gliserol ihtiva edecek şekilde hazırlandı. Bu solusyon 100<sup>0</sup> C' lik su banyosunda 2 dakika tutuldu, oda ısısına soğutuldu. Son konsantrasyonu % 0,001 olacak şekilde BFB ilave edildi. Üst ve alt tanklara 1/10 oranında % 10 SDS çözeltisi ihtiva eden 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,2) kondu. Poliakrilamid jel disklerine 40 µl, slab jele 25 µl numune tatbik edildi. Disk başına 8 mA , slab jel başına 30 mA akım uygulandı. Marker jelin bitimine 1-2 cm yaklaştığında akım kesildi. Jeller yarı yarıya sulandırılmış gliserol kullanılarak silindirlerden çıkarıldı ve 0,625 g CBB R-250, 113,5 ml metanol, 113,5 ml distile su ve 23 ml glasiyal asetik asit ihtiva eden boya çözeltisinde 20 dakika tutuldu. 875 ml distile su, 75 ml glasiyal asetik asit ve 50 ml metanol ihtiva eden boya çıkarma çözeltisinde yıkandı. Zemin temizlendikten sonra % 7,5 'lik asetik asit içinde saklandı.

### 3.2.5. "CROSS" IMMÜNELEKTROFOREZ (113)

PIVKA-II'yi göstermek için "cross" immünelektroforez yapıldı. Bu yöntemde birinci yöne elektroforez, kalsiyum laktat ihtiva eden tampon ve agaroz kullanılarak yapılır. PIVKA-II' nin kalsiyuma afinitesi çok düşük olduğundan, elektroforetik olarak normal protrombinden daha hızlı göç eder. İkinci yöne elektroforez için EDTA ihtiva eden tampon ve agaroz kullanılır. EDTA, kalsiyum ile kelat teşkil ederek protrombinin normal ve PIVKA şeklinin aynı şartlarda göç etmesine imkan verir.

Birinci yöne elektroforez için laktat veronal tamponu (10,30 g/l sodyum veronal, 0,77 g/l kalsiyum laktat, pH 8,8) kullanıldı. Bu tampon içinde, kaynar su banyosu içinde % 1' lik agaroz çözeltisi hazırlandı. Çözelti 60° C' ye soğutularak 8,5 x 10 cm' lik cam üzerine yaklaşık 1,5 mm kalınlığında (12 ml) döküldü. Jelin katılaşması için 10 dakika beklendi. Jel plağının katoda gelecek kısmına, her iki kenardan 1,5 cm mesafede 4mm çapında kuyu açıldı ve aspire edilerek içi temizlendi. Bu kuyudan 1,5 cm mesafede ve 3 mm çapında ikinci bir kuyu daha hazırlandı. Jel plağı,soğutma bloğu üzerine, kuyular katotda olacak şekilde yerleştirildi. Jelle, tampon arasına Whatman (No.3) kağıdı ile köprü kuruldu. 4 mm'lik kuyuya 15 µl numune, 3 mm'lik kuyuya 5 µl Coomassie brilliant Blue ile boyanmış albumin çözeltisi (20 g/l albumin, 5 g/l CBB, 1 g/l NaN<sub>3</sub>, 0,15 M NaCl) konup, jel başına 5 mA akım uygulandı. Boyanmış albuminin göçü gözlenerek yaklaşık 4 saat sonra akım kesildi. Elektroforez sırasında soğutma bloğunun ısısı 18° C' de sabit tutuldu.

İkinci yöne elektroforez için tris/glisin/EDTA/veronal tamponu (1,60 g/l sodyum veronal, 5,65 g/l tris, 7,05 g/l glisin, 1,80 g/l EDTA di sodyum tuzu, pH 8,8) hazırlandı. Bu tampon içinde daha önce tarif edildiği gibi % 1'lik agaroz çözelti hazırlandı. Bu çözeltinin 10 ml' si 60° C' ye soğutularak, 0,2 ml protrombin antiserumu ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 56° C' de 10 dakika bekletildi. Bu esnada birinci elektroforezden çıkarılan plak üzerindeki jel, numune kuyusuna 2 mm mesafeden düzgünce kesildi ve boyalı albumin ihtiva eden jel parçası cam üzerinden uzaklaştırıldı. Antiserumlu agaroz buraya döküldü ve 10 dakika katılaşması için bekltildi. Numune kuyusu birkaç defa EDTA' lı tampon ile yıkandı. Elektroforez tankındaki kalsiyum laktatlı tampon boşaltıldı. Tank yıkandıktan sonra EDTA' lı tamponla dolduruldu. Numune tarafı katoda gelecek şekilde jel ile tampon arasına köprü kuruldu. Jel plağı başına 5 mA akım uygulandı. 4-5 saat sonra akım kesildi. Elektroforez sırasında soğutma bloğunun ısısı 18° C' de sabit tutuldu.

Jel plağı, plak başına 500 ml olmak üzere % 0,9 luk NaCl solüsyonunda bir gece ve sonra distile suda 1 saat bekletildi. Numune kuyusu distile su ile doldurulduktan sonra jel yüzeyine distile su ile ıslatılmış filtre kağıdı yerleştirildi. 50° C' de 2-3 saat

kurutuldu. Kurumuş agaroz yüzeyindeki filtre kağıdı distile su ile ıslatılarak dikkatle uzaklaştırıldı. Plak boya solüsyonunda (2,5 g/l CBB, % 5 glasiyal asetik asit, % 45 metanol) 30 dakika bekletildi. Zemin beyazlaşıp pikler görülünceye kadar yıkama çözeltisiyle (% 5 glasiyal asetik asit, % 45 etanol) yıkandı.

### **3.2.6. OUCHTERLONY ÇİFT İMMÜNDİFÜZYON YÖNTEMİ (114)**

Barbital tamponu (pH 8,2) içinde hazırlanmış % 1 lik agaroz jel kullanıldı. Amaçta göre farklı antiserumlardan faydalanıldı. Boyama CBB ile yapıldı.

### **3.2.7. İMMÜNELEKTROFOREZ (115)**

Barbital tamponu (pH 8,2) ve % 2' lik agaroz kullanıldı. Ayrıca, anormal protrombini araştırmak için, laktat veronal tamponu (10,30 g/l sodyum veronal, 0,77 g/l kalsiyum laktat, pH 8,8) ile immünelektroforez yapıldı.

### **3.2.8. SELÜLOZ ASETAT PROTEİN ELEKTROFOREZİ**

Selüloz asetat elektroforezi, Tris-barbital-sodyum barbital (pH 8,6-9) tamponu ve ponceau S boyası kullanılarak, Helena Laboratories firmasından temin edilen serum protein elektroforez kiti ile yapıldı.

### **3.2.9. PROTEİN TAYİNİ**

Plazma, asit sıvısı gibi yüksek konsantrasyonda protein içeren örneklerde total protein tayini biüret metodu ile yapıldı.

Diğer örneklerde, 1 cm' lik küvet kullanarak 260 ve 280 nm dalga boyunda absorbanlar okundu. Aşağıdaki formülle protein konsantrasyonu hesaplandı (116):

$$\text{Protein konsantrasyonu, mg/ml} = 1,55 \times \text{Abs}_{280} - 0,77 \times \text{Abs}_{260}$$

### **3.2.10. PROTROMBİN EKSİK PLAZMA İLE PROTROMBİN AKTİVİTESİ TAYİNİ**

Stago' dan temin edilen "Hemoreactive AC" ve "Neoplastin" kitleri kullanıldı. Kit metodu aynen uygulandı. 1 ml normal plazmadaki aktivite, 1 U/ml olarak kabul edildi.

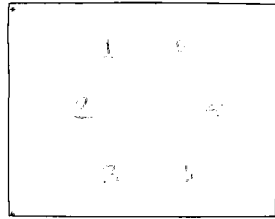
### 3.2.11. STAFİLOKOAGÜLAZ İLE PROTROMBİN TAYİNİ

Martinoli(34) 'nin "end point" yöntemi ve Soulier (35)' in kinetik yönteminden faydalanılarak modifiye bir metodla tayin yapıldı. 50 µl numune üzerine 50 µl stafilo-koagülaz (500 U/l' lik) ilave edilip 2 dak. bekletildi. 0,75 ml tampon (0,06 M tris, 0,06 M imidazol, 0,18 M NaCl, 4 g/l sodyum EDTA, pH 8,5) ve 50µl kromojenik substrat (CBS 34.47, 3 mM/l' lik) ilave edilip 37<sup>0</sup> C' de 1 dak. beklendi. 405 nm dalga boyunda birer dakika ara ile absorbanları ölçüldü. Absorbansdaki 0,001' lik değişim 1 U/l olarak kabul edildi.

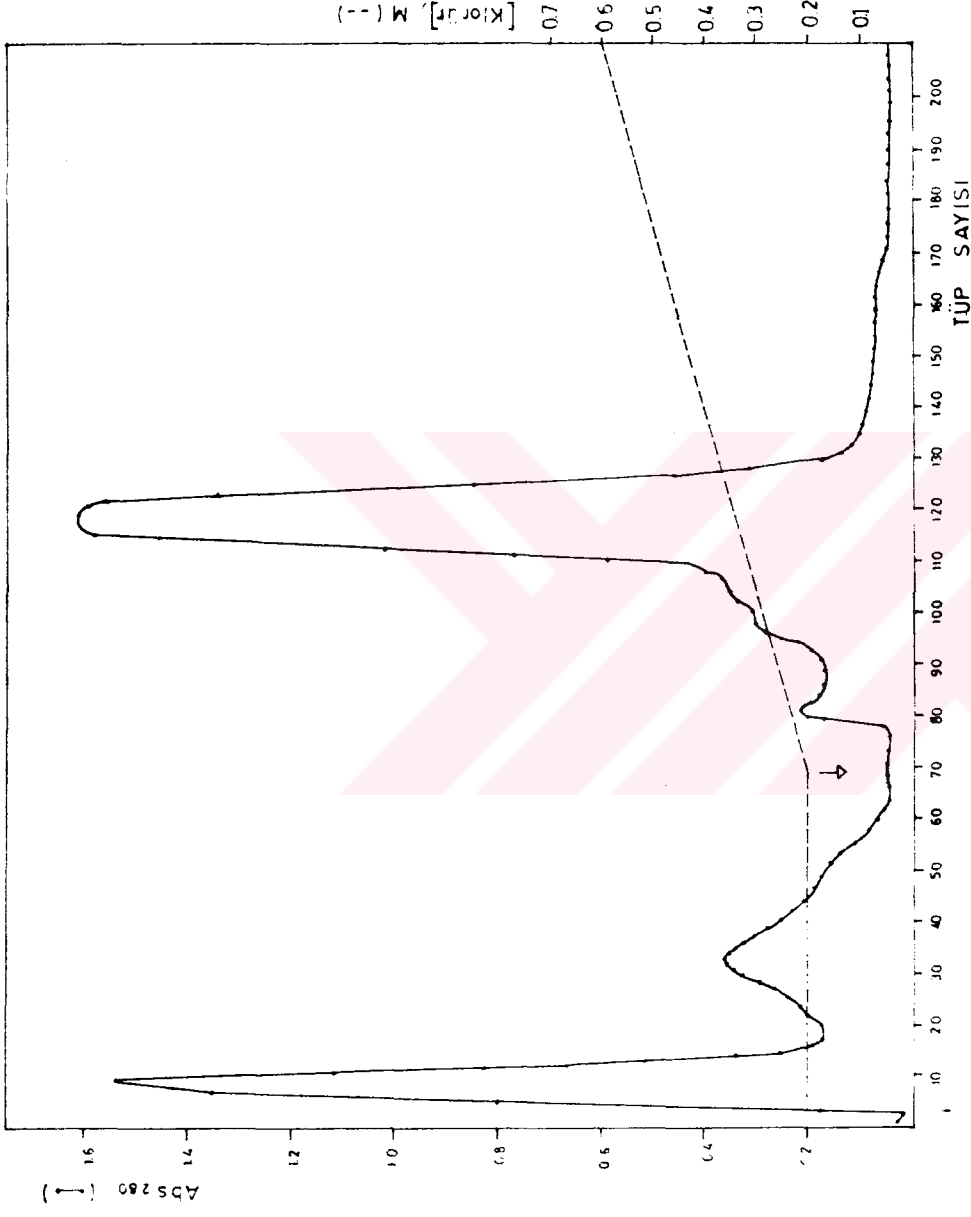
## 4. BULGULAR

### 4.1. NORMAL PLAZMA HAVUZUNDAN PROTROMBİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Baryum sitrat adsorbsiyonu ile K vitaminine bağımlı proteinler diğer proteinlerden ayrıldı. Adsorbe olan proteinler önce %40 doymuş  $(NH_4)_2SO_4$  ile elüe edilip, sonra %67 doymuş  $(NH_4)_2SO_4$  ile çöktürüldü. Tamponda çözümlü dialize tabi tutuldu. Bu şekilde elde edilen protrombin kompleksinde Ouchterlony çift immüdiffüzyon tekniği ile protrombin, faktör VII, IX, X ile protein C ve protein S' in varlığı incelendi (şekil 8) ve hepsi müsbet bulundu. Sonra kompleks, DEAE Sephadex A-50 kolonuna uygulandı. Fraksiyonların 280 nm dalga boyunda okunan absorpsanlarıyla fraksiyon sayıları arasında hazırlanan grafik şekil 9' da gösterilmiştir. Elde edilen fraksiyonların bazılarında Ouchterlony çift immüdiffüzyon tekniği ile K vitaminine bağı proteinlerin varlığı incelendi (şekil 10). Gradyent sonrasındaki en yüksek pikte geniş bir protrombin-antiprotrombin çökme bandı gözlemlendi. Protrombinin bu pikte faktör IX ve X ile birlikte bulunduğu saptandı.



Şekil 8: *Protrombin kompleksinde K vitaminine bağımlı proteinlerin varlığının Ouchterlony çift immüdiffüzyon tekniği ile gösterilmesi. Ortadaki kuyuya protrombin kompleksi, çevredeki kuyulara antiserumlar uygulandı. 1-protrombin, 2-protein S, 3-protein C, 4-faktör X, 5-faktör IX, 6-faktör VII.*



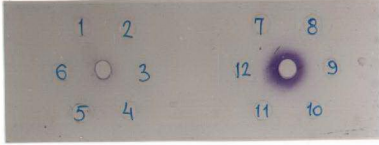
Şekil 9: Normal plazmadan elde edilen protrombin kompleksinin DEAE Sephadex A-50 kolon kromatografisi. Kolon çapı 1,6 cm, boyu 15,5 cm. Akış hızı 0,25 ml/dak. Fraksiyon hacmi 3,5 ml. Denge tamponu: 0,2 M NaCl, 1 mM benzamidin HCl ihtiva eden 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 6,0). Gradyent tamponu: 0,6 M NaCl, 1 mM benzamidin HCl ihtiva eden 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 6,0). Ok işareti gradiyent başlangıcı göstermektedir.



PROTROMBİN



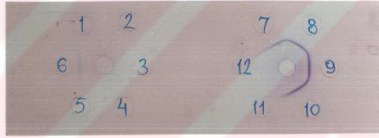
FAKTÖR VII



FAKTÖR IX



FAKTÖR X



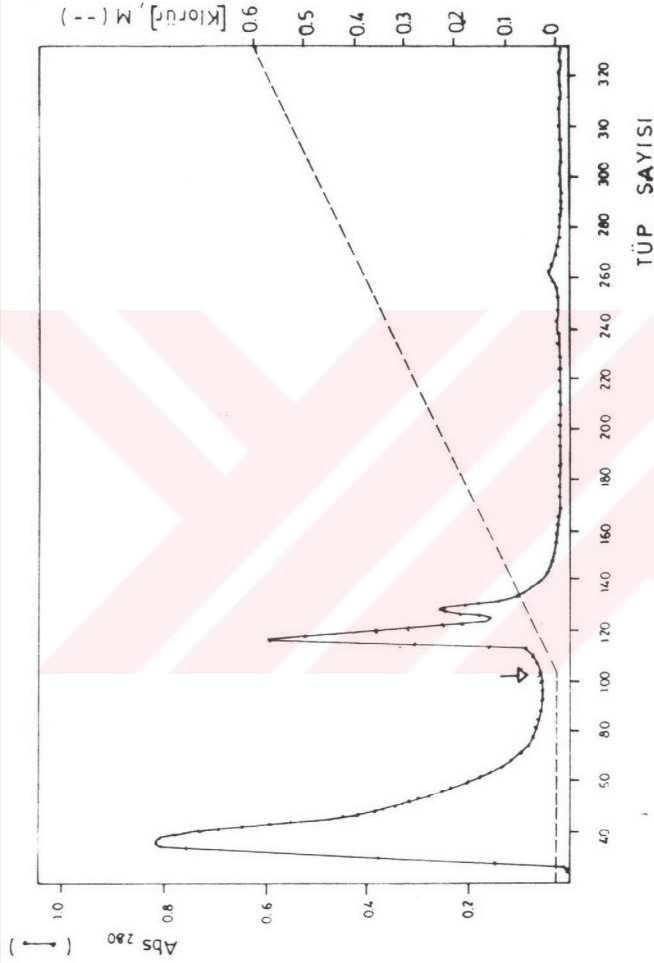
PROTEİN C



PROTEİN S

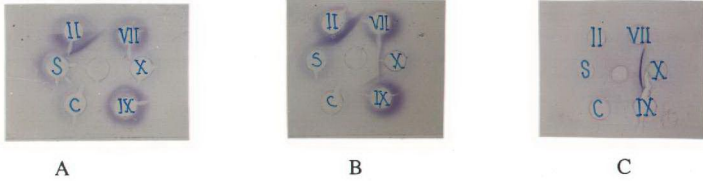


Şekil 10: Normal protrombin kompleksinin DEAE Sephadex A-50 kromatografi fraksiyonlarında Ouchterlony tekniği ile K vitaminine bağımlı proteinlerin araştırılması. Ortadaki kuyulara antiserumlar, çevredeki kuyulara fraksiyonlar uygulandı: 1- 8., 2-34., 3-56., 4-81., 5-88., 6-93., 7-97., 8-103., 9-108., 10-117., 11-130., 12-160. nolu fraksiyonlar.



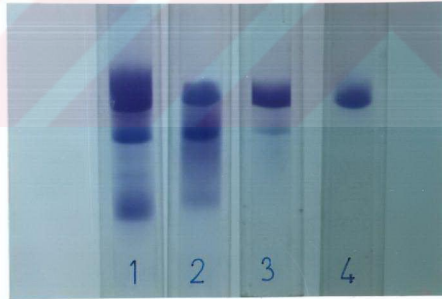
Şekil 11: Normal protrombin kompleksinin DEAE Sephadex A-50 kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyon havuzunun Heparin Sepharose CL-6B kolon kromatografisi. Kolon çapı 1,6 cm, boyu 9 cm. Akış hızı 0,205 ml/dak. Fraksiyon hacmi 2 ml. Denge tamponu: 1 mM benzamidin HCl ihiya eden 0,02 M soğyum sirtat tamponu (pH 7,5). Gradyient tamponu 0,06 M NaCl ihiya eden denge tamponu. Ok işareti gradyient başlangıcını göstermektedir.

113-130'ncu fraksiyonlar havuz haline getirildi. Konsantre edilerek Heparin Sepharose CL-6B kolonuna uygulandı (Şekil 11). Bu kromatografi fraksiyonlarında Ouchterlony çift immüdiffüzyon tekniği ile yapılan tarama sonunda gradient öncesi pikte diğer proteinleri içermeyen protrombinin tek başına bulunduğu gözlemlendi. Gradient sonrasındaki ilk pikte protrombin, faktör IX ve X' un birlikte olduğu, ikinci pikte ise yalnız faktör X' un varlığı tesbit edildi (Şekil 12).



Şekil 12: Ouchterlony çift immüdiffüzyon tekniği ile Heparin Sepharose CL-6B kromatografi fraksiyonlarında protrombin ve diğer K vitaminine bağımlı faktörlerin araştırılması. Çevredeki kuyulara antiserumlar, ortadaki kuyulara örnekler uygulandı: A-Gradient öncesi pik (33-42' nci fraksiyonlar) B-Gradient sonrası birinci pik, C- gradient sonrası ikinci pik.

Ouchterlony çift immüdiffüzyon tekniği ile protrombinin tek başına bulunduğu tesbit edilen pik havuzu, SDS-PAGE ile incelendiği zaman da tek bant görüldü. Saflaştırma kademelerinin SDS-PAGE ile incelenmesi şekil 13' de gösterilmiştir.



Şekil 13: Normal plazmadan, protrombinin saflaştırılması kademelerinin SDS-PAGE bulguları.1-Plazma havuzu, 2-Protrombin kompleksi, 3-DEAE Sephadex A-50 kromatografisine ait 113-130' uncu fraksiyon havuzu, 4- Heparin Sepharose CL-6B kromatografisindeki gradient öncesi pik.

Stafilokoagülaz ve kromojenik substrat, saflaştırma işlemleri sırasında temin edilemediği için, fraksiyonlarda protrombinin gözlenmesinde bu yöntem kullanılmadı. Faktör II eksik plazma ile ölçülen aktivitelere göre hazırlanan saflaştırma tablosu aşağıda gösterilmiştir (Tablo 1).

	Hacım ml	Protein mg/ml	T.Protein mg	Aktivite U/ml	Total aktivite U	Spesifik aktivite U/mg	Verim %	Saflaştırma defa
Plazma	1570	79,0	124030	1	1570	0,012	100	1
Protrombin kompleksi	15	22,9	343	43,9	753	2,19	48	182,5
DEAE - Sephacel	59,5	3,78	225	9,75	580	2,57	37	214
Heparin Sepharose	20	1,93	120	2,85	471	3,92	30	327

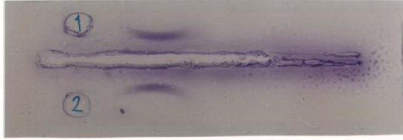
Tablo 1: *Normal protrombinin saflaştırılması. Protrombin aktivitesi protrombin eksik plazma kullanılarak yapıldı. Başlangıç plazmasındaki aktivite 1 U/ml olarak alındı.*

## 4.2. SİROZLU OLGUYA AİT ASİT SIVISINDAN PROTROMBİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Sirozlu olgunun plazma ve asit sıvılarında immünelektroforez yöntemi ile protrombinin varlığı gösterildi (şekil 14). Plazmanın anormal protrombin ihtiva edip etmediği "cross" immünelektroforez ile araştırıldı ve normal plazma havuzuna ait örneklerle karşılaştırıldı. Bunun için birinci yön elektroforez kalsiyum ihtiva eden tampon ile, ikincisi ise EDTA ihtiva eden tampon ile protrombin antiserumuna karşı yapıldı (şekil 15). Sirozlu olguya ait örnekte anormal protrombinin varlığı gözlemlendi. Sonra asit sıvısında da aynı yöntemle inceleme yapıldı (şekil 16). Anormal protrombinin çok küçük olarak belirmesi üzerine şüpheye düşüldü, tekrarlanıp aynı sonuç elde edilince bir kere de kalsiyumlu ortamda immünelektroforez ile anormal protrombinin varlığı araştırıldı ve müsbet bulundu (şekil 17).

Normal plazma havuzundan protrombin saflaştırılmasında olduğu gibi, önce asit sıvısında baryum sitrat adsorbsiyonu yapıldı. Adsorbe olan proteinler %40 doymuş  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile elüe edilip, %67 doymuş  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile çöktürüldü. Tamponda çözülüp dializ edildikten sonra protrombin kompleksinin, DEAE Sephacel kolon kromatografisi yapıldı. Elde edilen fraksiyonların absorbansları 280 nm dalga boyunda okunup, protrombin aktiviteleri stafilokoagülaz ve kromojenik substrat CBS 34.47 kullanılarak araştırıldı (şekil 18). 336-345'inci tüpler arasındaki fraksiyonlarda yüksek protrombin aktivitesi bulundu. Bu fraksiyonlar havuz haline getirdi. Ayrıca bu havuzda ve elde edilen piklerde protrombinin varlığı, Ouchterlony çift immünediffüzyon tekniği ile araştırıldı. Havuzda ve havuz hazırlanan pikin tepe noktasında protrombinin varlığı immünolojik olarak da tesbit edildi (şekil 19). Dializ edildikten sonra Heparin Sepharose CL-6B kolon kromatografisi yapıldı. Buradan elde edilen fraksiyonların da absorbansları 280 nm dalga boyunda okunup, protrombin aktiviteleri stafilokoagülaz ve kromojenik subst-

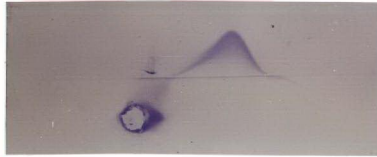
rat CBS 34.47 kullanılarak ölçüldü (şekil 20). Gradyent öncesi pikde yüksek protrombin aktivitesi gözlemlendi. Bunun saflığı SDS-PAGE ile incelendiğinde tek band görüldü (şekil 21). Oucetlony tekniği ile immünolojik olarak araştırıldığında sadece protrombinin varlığı tesbit edildi (şekil 22). Bu pikin kalsiyumlu ortamda yapılan "cross" immünelektroforezi sonucunda, anormal protrombin ihtiva etmediği görüldü (şekil 23). Asit protrombin kompleksinde de aynı yöntemle anormal protrombin bulunamadı (şekil 24). Gradyent sonrası pikde çok daha düşük protrombin aktivitesi bulundu. Tablo 2' de protrombinin saflaştırılmasına ait bilgiler gösterilmiştir.



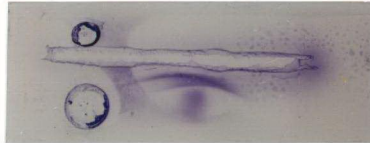
Şekil 14: Sirozlu olgunun plazma ve asit sıvısının protrombin antiserumuna karşı immünelektroforezi. 1-Plazma, 2-asit sıvısı



Şekil 15: Normal plazma havuzunun ve sirozlu olguya ait plazmanın kalsiyumlu ortamda "cross" immünelektroforezi. İkinci yön EDTA' lı ortamda protrombin antiserumuna karşı yapıldı. A-normal plazma, B-Sirozlu olguya ait plazma.

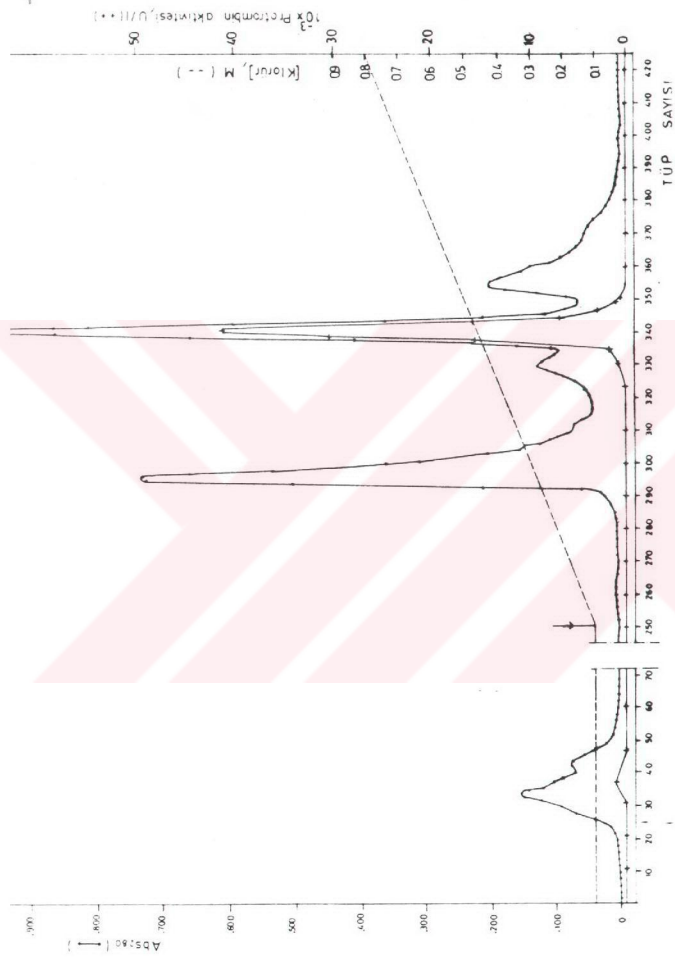


Şekil 16: Asit sıvısının kalsiyumlu ortamda "cross" immünelektroforezi. İkinci yön EDTA' lı ortamda protrombin antiserumuna karşı yapıldı.



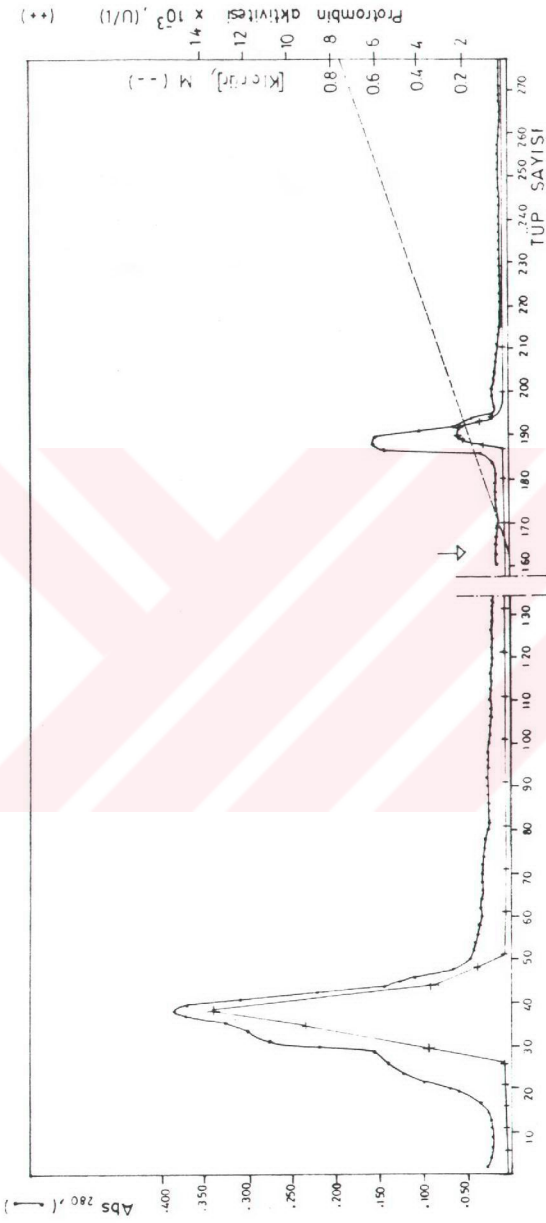
Şekil 17: Asit sıvısının kalsiyumlu ortamda protrombin antiserumuna karşı immünelektroforezi.





Şekil 18: Asit protrombin kompleksinin DEAE Sephacel kolon kromatografisi. Kolon çapı 2,6 cm, boyu 30 cm. Akış hızı 0,6 ml/dak. Fraksiyon hacmi 3,42 ml. Denge tamponu: 0,1 M NaCl, 1 mM benzamidin HCl, 0,1 mM fenilmetansülfonil florür iktiva eden 0,025 M sodyum sitrat tamponu (pH 6,0). Gradyent tamponu: 0,75 M NaCl, 1 mM benzamidin HCl, 0,1 mM fenilmetansülfonil florür iktiva eden 0,025 M sodyum sitrat tamponu (pH 6,0). Ok işaretini başlangıcını göstermektedir.

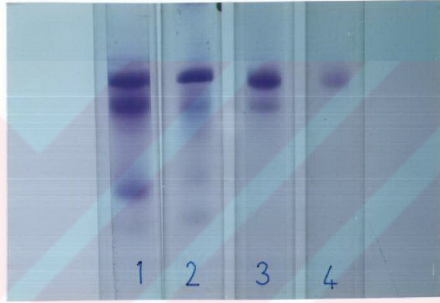




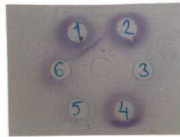
Şekil 20: Asit protrombin kompleksinin DEAE Sephacel kromatografisinden elde edilen protrombin ihtiva eden pik havuzunun Heparin Sepharose CL-6B kromatografisi. Kolon çapı 1,6, boyu 17,5 cm. Akış hızı 0,22 ml/dak. Fraksiyon hacmi 2,2 ml. Denge tamponu: 1 mM benzamidin HCl, 0,1 mM fenilmetansülfonil florür ihtiva eden 0,02 M sodyum serrat tamponu (pH 7,5). Gradyent tamponu 0,75 M NaCl içeren denge tamponu. Ok işareti gradyent başlangıcını göstermektedir.



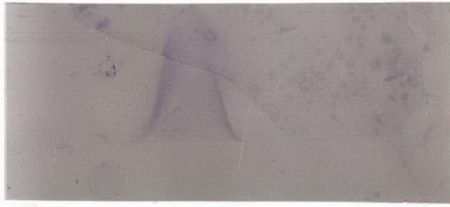
Şekil 19: Ouchterlony çift immüno-diffüzyon tekniği ile asit kompleksinin DEAE Sephacel kromatografi fraksiyonlarında protrombinin araştırılması. Orta kuyuya antiserum, çevredeki kuyulara fraksiyonlar uygulandı: 1-336-345 havuz, 2-340., 3-296., 4-349., 5-350., 6-355. fraksiyonlar.



Şekil 21: Asit protrombin kompleksinden protrombinin saflaştırılması kademelerinin SDS-PAGE bulguları. 1-Asit sıvısı, 2-Asit protrombin kompleksi, 3-Asit DEAE Sephadex A-50 kolon kromatografisine ait protrombin pik havuzu, 4- Heparin Sepharose CL-6B kromatografisindeki gradiyent öncesi pik.



Şekil 22: Heparin Sepharose CL-6B kolon kromatografisindeki gradiyent öncesi pikde K vitaminine bağımlı proteinlerin Ouchterlony çift immüno-diffüzyon tekniği ile araştırılması. Orta kuyuya numune, çevredeki kuyulara antiserumlar uygulandı. 1-Protrombin, 2-Faktör VII, 3- Faktör IX, 4-Faktör X, 5-Protein C, 6-Protein S.



Şekil 23: Asit protrombin kompleksinden elde edilen protrombinin kalsiyumlu ortamda yapılan "cross" immünelektroforezi. İkinci yön EDTA' lı ortamda protrombin antiserumuna karşı yapıldı.



Şekil 24: Asit protrombin kompleksinin Kalsiyumlu ortamda "cross" immünelektroforezi. İkinci yön EDTA' lı ortamda protrombin antiserumuna karşı yapıldı.

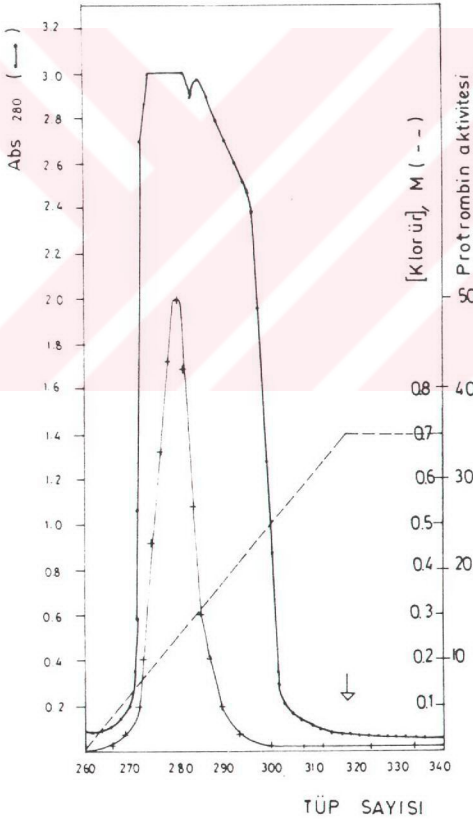
	Hacim ml	Protein mg/ml	T.Protein mg	Aktivite U/ml	Total aktivite U	Spesifik aktivite U/mg	Verim %	Saflaştırma defa
ASİD	1130	25,04	28295	1,34	1514	0,053	100	1
Protrombin kompleksi	5	7,11	35,55	108,0	540	15,2	35,6	286
DEAE - Sephacel	28	1,00	28,00	17,9	501,2	17,9	33,1	337
Heparin Sepharose	28,6	0,24	6,86	6,93	198,2	28,9	13	545

Tablo 2: Asit protrombin kompleksinden protrombinin saflaştırılması. Protrombin aktivitesi stafilokoağülaz ve kromojenik substrat kullanılarak ölçüldü. 405 nm dalga boyunda 0,001 ab sorbans değişimi 1 U/l olarak kabul edildi.

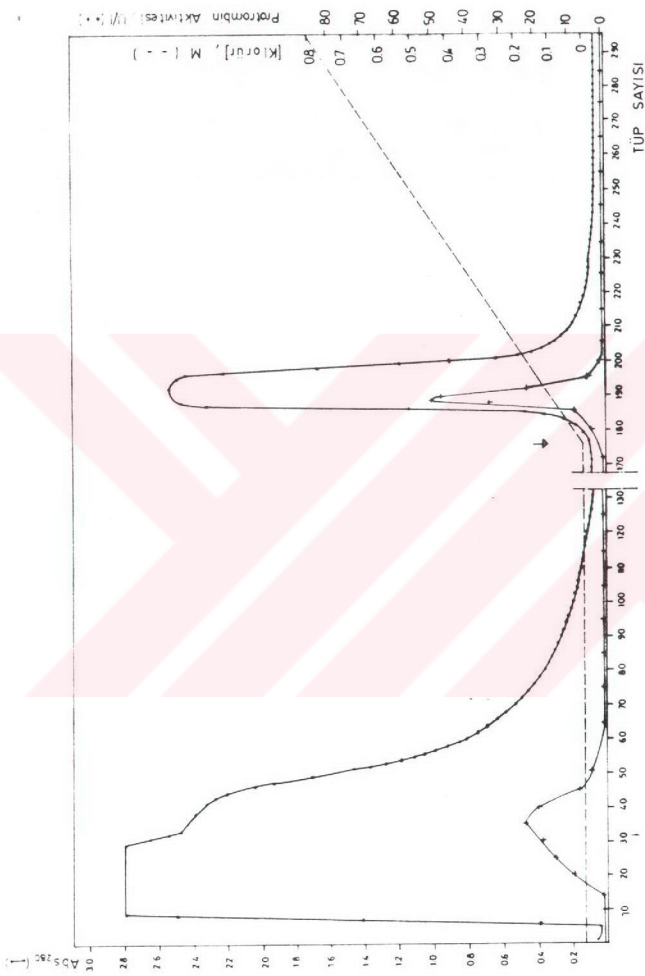
### 4.3. ASİT SIVISINDAN BARYUM SİTRATA ADSORBE OLMAYAN PROTROMBİNİN KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI

Baryum sitrat adsorbsiyonu sonrasında geri kalan asit sıvısı (adsorbe edilmiş asit) önce dializ edildi. Sonra DEAE Sephacel kolonuna uygulandı. Lineer tuz gradiyenti ile proteinler elüe edildi. Gradyent sonrasındaki en yüksek pike ait fraksiyonlarda stafiloakoagülaz ve kromojenik substratla protrombin aktivitesi saptandı (şekil 25). 272-294' üncü tüpler havuz haline getirildi. Konsantre edildikten sonra, Heparin Sepharose CL-6B kolon kromatografisine tabi tutuldu . Stafiloakoagülaz ve kromojenik substratla protrombin aktivitesi ölçüldü. Gradyent sonrasındaki pikte protrombin aktivitesi görüldü (şekil 26).

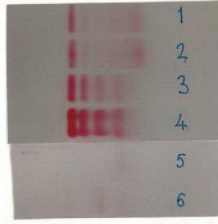
Protrombin aktivitesi gösteren gradiyent sonrası fraksiyonlardan oluşan havuz, selüloz asetat elektroforezinde beta bölgesinde tek bir bant olarak görülmürken (şekil 27), SDS-PAGE disk elektroforezinde çok sayıda bant görüldü (şekil 28). Protrombinin kısmi saflaştırılmasına ait veriler tablo 3' de gösterilmiştir.



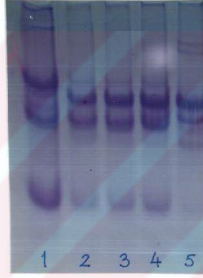
Şekil 25: Adsorbe edilmiş asitin DEAE Sephacel kolon kromatografisi. Kolon çapı 2,6 cm, boyu 30 cm. Akış hızı 0,8 ml/dak. Fraksiyon hacmi 8,5 ml. Denge tamponu: 1 mM benzamidin HCl, 0,1 mM fenilmetansülfonil florür ihtiva eden 0,005 M sodyum sitrat, 0,005 M sodyum fosfat tamponu (pH 6,0). Gradyent tamponu ) 0,7 M NaCl ihtiva eden denge tamponu. Ok işareti gradiyentin bitişini göstermektedir.



Şekil 26: Adsorbe edilmiş asitlin DEAE Sephacel kolon kromatografisinden elde edilen 272-294 fraksiyon havuzunun Heparin Sepharose CL-6B kromatografisi. Kolon çapı 1,6 cm, boyu 9 cm. Akış hızı 0,2 ml/dak. Fraksiyon hacmi 2,1 ml. Denge tamponu: 1 mM benzamidin HCl, 0,1 mM fenilmetansülfonil florür ihtiva eden 0,02 M sodyum sitrat (pH 7,5). Gradyent tamponu: 0,8 M NaCl i çeren denge tamponu.



Şekil 27: Adsorbe edilmiş asitden protrombinin kısmi saflaştırılmasına ait sellüloz asetat elektroforezleri. 1-Asit sıvısı, 2-Adsorbe edilmiş asit(Dializ sonrası), 3-DEAE Sephacel kolon kromatografisinden elde edilen protrombin havuzu, 4-3 nolu havuzun Konsantre şekli,5-Heparin Sepharose CL-6B kromatografisi gradiyent sonrası protrombin pik havuzu, 6-Heparin Sepharose CL-6B kromatografisi gradiyent öncesi 22-40 fraksiyon havuzu,



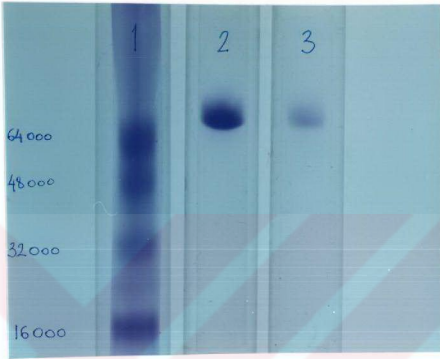
Şekil 28: Adsorbe edilmiş asitden protrombinin kısmi saflaştırılmasına ait SDS-PAGE bulguları. 1- Sirozlu olguya ait plazma, 2-asit sıvısı, 3-Adsorbe edilmiş asit sıvısı, 4- DEAE Sephacel kolon kromatografisinin 272-294. fraksiyon havuzu, 5-Heparin Sepharose CL-6B kolon kromatografisinde protrombin aktivitesi gösteren gradiyent sonrası fraksiyon havuzu.

	Hacim ml	Protein mg/ml	T.Protein mg	Aktivite mU/ml	Total aktivite mU	Spesifik aktivite mU/mg	Verim %	Saflaştırma defa
Adsorbe edilmiş Asit	1200	22,07	26484	4,3	5160	0,19	100	1
DEAE - Sephacel	187	31,67	5922	22,1	4133	0,70	80	3,6
Heparin Sepharose	42	3,16	132,7	11	462	3,48	8,9	18,3

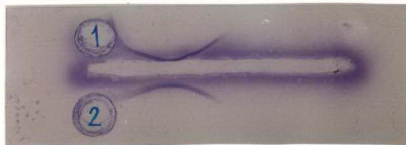
Tablo 3: Adsorbe edilmiş asitden protrombinin kısmi saflaştırılması. Protrombin aktivitesi stafiloagoğülaz ve kromojenik substrat kullanılarak ölçüldü. 405 nm dalga boyunda 0,001' lik absorbans değişimi 1 U/l olarak kabul edildi.



Normal plazmadan saflaştırılan protrombin ile asit protrombin kompleksinden elde edilen protrombinlerin SDS-PAGE' deki göç hızları aynıydı (şekil 29). Ayrıca kalsiyumlu ortamda protrombin antiserumuna karşı immünelektroforez örneklerinde de farklılık görülmedi (şekil 30).



Şekil 29: Normal protrombin ve asit protrombin kompleksinden elde edilen protrombinlerin SDS-PAGE ile karşılaştırılması.1-Molekül ağırlığı standardı,2-Normal protrombin, 3-Asit kompleksden elde edilen protrombin.



Şekil 30: Normal protrombin ve asit protrombin kompleksinden elde edilen protrombinlerin kalsiyumlu ortamda protrombin antiserumuna karşı immünelektroforezi. 1-Normal protrombin, 2-Asit kompleksden elde edilen protrombin.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sirozlu bir olguya ait 1130 ml asit sıvısından baryum sitrat adsorbsiyonu, elüsyonu, DEAE Sephacel ve Heparin Sepharose CL-6B kolon kromatografi yöntemleri ile 6,7 mg protrombin elde edildi. Benzer bir yöntemle 1570 ml normal plazma havuzundan da protrombin saflaştırıldı, 120 mg protrombin elde edildi. Her iki kaynaktan elde edilen protrombin, SDS-PAGE ile ayrı ayrı incelendiğinde tek bant olarak görüldü. Elektroforetik mobiliteleri aynıydı. Protrombin eksik plazma kullanılarak yapılan aktivite ölçümlerinde asit kaynaklı protrombinin spesifik aktivitesi 3,36 U/mg olarak bulunurken, plazma kaynaklı olanınki 3,92 U/mg' dı. Stafilokoagülaz ve kromojenik substrat ile aktiviteleri ölçüldüğünde, spesifik aktiviteler birincisinde 28,9 U/mg, ikincisinde 30,1 U/mg bulundu.

1570 ml normal plazmadan 120 mg olarak elde edilen protrombin miktarı, Bajaj ve arkadaşlarının (109), 8 l insan plazmasından 500 mg, Moore ve arkadaşlarının (117) 1,8 l sığır plazmasından 120 mg olarak elde ettikleri miktarlarla orantılıyken, Hashimoto ve arkadaşlarının(118) 15 l sığır plazmasından 1600 mg ve Uras'ın (108) 11 l sığır plazmasından 1050 mg olarak elde ettikleri değerlerden daha azdı. Normal plazmadan elde edilen protrombinin molekül ağırlığı 70200 bulundu. Bu değer Bajaj' ın bulunduğu 70000 (109) ve Di Scipio' nun 72000 (119) değerlerine yakındı. Literatürde protrombin aktivitesi bir birinden çok farklı yöntemlerle ifade edilmektedir (6,108,117,119). Bulunan 3,92 U/mg spesifik aktivite, Bajaj ve arkadaşlarının benzer fakat modifiye metodla buldukları 6 U/mg değerinin altındaydı (109). % 30 olarak bulunan verim, Bajaj' ın % 40 (109) ve Shapiro ve arkadaşlarının % 50 (120) değerlerinden biraz daha düşüktü.

Literatürde sirozlu bir olguya ait protrombinin ne plazmadan, ne de asit sıvısından saflaştırılmasına rastlanmadığı için bulgular tartışılmadı. 1989' da Liebman, hepatomalı bir olgunun asit sıvısından afinite kromatografisi yöntemini kullanarak anormal

protrombini saflaştırdı (30). Normal bir insan plazmasından elde ettiği protrombin ile anormalin özelliklerini karşılaştırdığı zaman her ikisinin de SDS-PAGE' de mobilitelerinin aynı olduğunu, ancak farklı sayıda Gla ihtiva ettiklerini gördü. Hepatomalı olgularda çeşitli yöntemlerle anormal protrombinin arttığı gösterilmiştir (46, 35, 36, 39, 53, 104 - 107). Shah ve arkadaşları(39) 1987' de farelerde deneysel hepatik tümör oluşturdular. Bunların plazmasında anormal protrombin seviyesi yüksek, karaciğer karboksilaz aktivitesi normaldi. Buna karşılık tümör dokusunda karboksilaz aktivitesi çok düşüktü. Yapılan bütün bu çalışmalar sonucunda, hepatomalı olgularda protrombin ön maddesinin sentezinin normal, ama gamma karboksilasyonun yetersiz olduğu ortaya çıktı.

Gamma karboksilasyon oral antikoagülant verilen olgularda da bozulmaktadır. Oral antikoagülant verilen sığırların baryum tuzları ile adsorbsiyondan sonra geri kalan plazmasından protrombin saflaştırılmıştır (24 - 26, 29). Nelsestuen ve Suttie (24) dicoumarol verilmiş bir sığırın plazmasından 5 kademede % 11 verimle 370 kez, marcumar verilen ineklerin plazmasından Vermeer ve arkadaşları (29), 7 kademeli bir saflaştırma protokolü ile %16 verimle 551 kez, Blanchard ve arkadaşları (43) warfarin verilmiş kişilerin plazma havuzundan % 18 verimle 6000 kez anormal protrombini saflaştırdılar. Bu çalışmalarla, oral antikoagülant verilmesiyle oluşan anormal protrombinin baryum tuzlarına adsorbsiyonda yetersiz olduğu kalsiyumlu ortamdaki elektroforezde normalden hızlı göç ettiği ve fizyolojik yöntemlerle aktivitesinin düşük olduğu gösterildi. Bazı anormal protrombin tiplerinin baryum sitrata adsorbe olabildiği de tesbit edilmiştir (28). Bu tezde, asit sıvısından baryum sitrat adsorbsiyonu ile elde edilen protrombin, kalsiyumlu ortamda immünelektroforez ve "cross" immünelektroforez ile incelendiğinde normal protrombinden farklılık gözlenmedi.

Bu çalışmada, başlangıçta asit sıvısının stafilokoagülaz ile ölçülen total protrombin aktivitesi 1514 U idi. Baryum sitrat adsorbsiyonundan sonra ise sadece 5,2 U' lik çok düşük bir total aktivite kaldı, yani totalin % 1' den daha azdı. Bu durum hepatoma olgularında ve oral antikoagülant verilen olgularda ki durumdan çok farklıdır. Oral antikoagülant verilmiş olgularda, Blanchard ve arkadaşları (43)' insanda total protrombinin % 5,6' sının, Nelsestuen ve Suttie (24) sığırdaki % 60' ının, adsorbsiyon sonrasında plazmada kaldığını tesbit etti. Liebman (30) ise hepatomalı olguya ait asit sıvısında anormal protrombini, totalin %15,5' u olarak buldu. Bir çok klinik amaçlı çalışmada hepatoselüler karsinomalı olgular ve oral antikoagülant verilmiş kişilerde anormal protrombin yüksek bulunurken, sirozlu olgularda normalden farklı değildi (35,36,46,104,107,). Sirozlu olgularda total protrombin seviyesi immünolojik yöntemle normalden azdı (32,96). Adsorbe edilmiş asit sıvısında kalan çok az miktardaki protrombinin kısmi saflaştırılması, DEAE Sephacel ve Heparin Sepharose CL-6B kolon kromatografisi yöntemleri ile yapıldı. % 9 verimle 18 kez saflaştırıldı. Bu selüloz asetat elektroforezinde beta bölgesinde tek bant olarak görülürken SDS-PAGE' de çok sa-

yıda bant ihtiva ediyordu. Bu haliyle asit sıvısından baryum sitrata adsorbe ederek elde edilen saf protrombinle molekül ağırlıklarını karşılaştırmak mümkün olmadı. Protrombin eksik plazma ile aktivite tesbit edilemediği halde stafilokoagülaz ile 3,48 mU/mg aktiviteye sahipti. Oysa, bu çalışmada elde edilen, baryum sitrata adsorbe olan protrombin, protrombin eksik plazma ile 3,36 U/mg, stafilokoagülaz ile 28,9 U/mg aktiviteye sahipti. Adsorbe edilmiş asitten elde edilen ürünün daha ileri saflaştırılması için afinite kromatografisi yöntemi düşünülebilir. Normal ve anormal protrombinlerin immünolojik özelliklerinin benzerliği göz önünde tutularak (24 - 26), bu çalışmada, normal plazmadan saflaştırılan protrombine karşı elde edilecek antiserumla afinite kolonu hazırlanabilir. Bu çalışmada, asit sıvısından baryum sitrat adsorbsiyonu ile elde edilen protrombinin özelliklerinin normale karşılaştırılması, bir ön çalışma olarak kısıtlı şekilde yapılmıştır. İleride, adsorbe edilmiş asit sıvısındaki protrombin afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra, bununla, bu çalışmada elde edilen asit ve normal plazma kaynaklı saf protrombinler karşılaştırılabilir. Gla içerikleri, çeşitli şartlardaki aktivasyonları, amino asit kompozisyonları gibi çeşitli özellikleri incelenebilir. Aynı hastadan farklı zamanlarda alınan asit sıvılarından havuz hazırlanarak bu amaç için gerekli miktarda protrombin elde edilebilir. Asit sıvısı çeşitli karaciğer hastalıklarındaki moleküler anomalileri incelemek için bir çok proteinin saflaştırılmasında kaynak olarak kullanılabilir.

## 6. ÖZET

Karaciğer hastalıklarında protrombinin fizyolojik aktivitesinde azalmaya yol açan sebebler spekülatifdir. Moleküler düzeyde inceleme yapılabilmesi için bunun saf olarak elde edilmesi gerekir. Bu amaçla sirozlu bir olguya ait 1130 ml asit sıvısından baryum sitrat adsorbsiyonu, amonyum sülfat elüsyonu, DEAE Sephacel ve Heparin Sepharose CL-6B kolon kromatografisi kullanılarak 6,7 mg protrombin saflaştırıldı. Bu, SDS-PAGE ile tek bant olarak görüldü. Elektroforetik mobilitesi normal plazma havuzundan elde edilen protrombin ile aynıydı. Molekül ağırlığı 70200, faktör II eksik plazma kullanıldığında spesifik aktivitesi 3,36 U/mg, stafilokoagülaz kullanıldığında ise 28,9 U/mg olarak bulundu. Normal plazma protrombinine ait, 3,92 U/mg, 30,1 U/mg değerleri ile karşılaştırıldığında, stafilokoagülaz ile aktivasyonda normale yakın ama faktör II eksik plazma kullanıldığında daha düşüktü. Kalsiyumlu ve kalsiyumsuz ortamda immünelektroforezde normalden farklılık görülmedi. "Cross" immünelektroforezde normalde olduğu gibi tek pik saptandı.

Baryum sitrat adsorbsiyonundan sonra geriye kalan asit sıvısında başlangıçtaki nin % 1' inden daha az protrombin aktivitesi (stafilokoagülaz ile) kaldı. Bu protrombinin kısmi saflaştırılması DEAE Sephacel ve Heparin Sepharose CL-6B kolon kromatografileri ile yapıldı. Elde edilen ürün selüloz asetat elektroforezinde beta bölgesinde tek bant verirken, SDS-PAGE' de bant sayısı çokdu.

Adsorbsiyon sonrasında asit sıvısında kalan bu protrombinin daha ileri saflaştırılmasının afinite kromatografisiyle mümkün olabileceği düşünülebilir. Normal ve anormal protrombinin immünolojik özelliklerinin benzerliği göz önünde tutularak, bu çalışmada, normal plazmadan saflaştırılan protrombine karşı elde edilecek antiserumla afinite kolonu hazırlanabilir.

Asit sıvısından baryum sitrat adsorbsiyonu ile elde edilen protrombinin normal protrombinle karşılaştırılması bu çalışmada çok kısıtlı olarak yapılmıştır. İleride, adsor-

be edilmiş asit sıvısındaki protrombin afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra bununla, bu çalışmada elde edilen asit ve normal plazma kaynaklı saf protrombinlerin karşılaştırılması, bir çok soruya açıklık getirebilir. Ayrıca asit sıvısı çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında kaynak olarak kullanılabilir.





## 7. SUMMARY

### **The Purification of Prothrombin From Ascites Fluid**

The reasons of the decreased functional activity of prothrombin in the liver disease have yet been speculative. It could be possible to study on molecular basis the reasons of prothrombin abnormalities when a highly purified preparation of prothrombin from a patient with liver disease is available.

In this study, prothrombin (6,7 mg) was purified from the ascites fluid (1130 ml) of a patient with liver cirrhosis by barium citrate adsorption, ammonium sulphate elution, DEAE Sephacel and Heparin Sepharose CL-6B column chromatography steps. This purified prothrombin migrated as a single band on SDS-PAGE and its electrophoretic mobility was same as the prothrombin isolated from normal pooled plasma. The specific activities were found to be 3,36 U/mg in the one stage clotting assay and 28,9 U/mg in the staphylocoagulase /chromogenic substrate assay when normal prothrombin had 3,92 U/mg and 30,1 U/mg specific activities respectively.

After barium citrate adsorption, less than 1% of nonphysiological total prothrombin activity in the initial ascites fluid was retained in the adsorbed ascites. This too small amount of prothrombin was partially purified by DEAE Sephacel and Heparin Sepharose CL-6B column chromatography steps. This prothrombin migrated as a single band in beta-region on cellulose acetate electrophoresis, but it was found to be heterogeneous by SDS-PAGE.

Since the immunological behaviors of normal and abnormal prothrombins are similar, the prothrombin isolated from normal pooled plasma in this study, may be used to obtain antibody required to prepare affinity column for high purification of the prothrombin from adsorbed ascites. In this study some limited properties of the prothrombin isolated via barium citrate adsorption were investigated. An extensive study to compare the characteristics of these three proteins, normal prothrombin, the prothrombin from ascites via barium citrate adsorption and the prothrombin from adsorbed ascites may be useful to explain the reasons of the decreased functional activity of prothrombin in the liver disease.

## 8. KISALTMALAR

Abs	Absorbans
anti-HBc	Hepatit B çekirdek antikoru
anti-HBe	Hepatit Be antikoru
anti-HBs	Hepatit B yüzey antikoru
APTT	Aktive kısmi tromboplastin zamanı
BFB	Brom fenol mavisi
BGP	Kemik Gla proteini
CBB	"Coomassie brilliant blue"
CHAPS	3-kolamidopropil dimetilamino-1-propan sülfat
DEAE	Dietilaminoetil
DIC	Yaygın damar içi pıhtılaşma
DTT	Ditiyotritol
cDNA	"Complimentary DNA"
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FDP	Fibrin parçalanma ürünleri
Glu	Glutamik asit
Gla	Gamma-karboksi glutamik asit
HBeAg	Hepatit Be antijeni
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni
KH2	K vitaminin hidrokinon şekli
Me-	Metil
MET	Merkapto etanol
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotidin indirgenmiş şekli
NAD(P)H	Nikotinamid adenin dinükleotid(fosfat)ın indirgenmiş şekli

<b>PAGE</b>	Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>PIVKA</b>	K vitamini yokluğunda meydana gelen protein
<b>PIVKA-II</b>	K vitamini yokluğunda meydana gelen protrombin
<b>ppp</b>	Trombositten fakir plazma
<b>PT</b>	Protrombin zamanı
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>TEMED</b>	N,N,N',N' tetrametiletildiamin
<b>TT</b>	Trombin zamanı
<b>VIII:C</b>	Pıhtılaşabilen faktör VIII
<b>VIII:Ag</b>	Faktör VIII-Antijeni
<b>vWF</b>	"von Willebrandt" faktörü



## 9. KAYNAKLAR

- 1-Friedman,P.A.: Vitamin K-dependent proteins. N Eng J Med , 310:1458-1460, 1984.
- 2- Ulutin, O.N., Johnson, J.F., Seegers, W.H.: Autoprothrombin II of human origin. Amer J Physiol, 201:660, 1961.
- 3-Seegers, W.H., Ulutin, O.N.: Autoprothrombin II-A (Autoprothrombin II Anticoagulant). Thrombos Diathes Haemorrh, 5:456-462, 1961.
- 4-Ulutin, O.N., Seegers, W.H.: Autoprothrombin II and autoprothrombin II anticoagulant. In Progress In Coagulation, I.S. Wright, F. Koller, E. Beck. Friedrich-Karl Schattauer-Verlang Stuttgart,1962, pp 256-263.
- 5-Ulutin, O.N., Seegers , W.H.: Plazmadan elde edilen yeni bir inhibitör. İstanbul Üniv Tıp Fak Mec, 28:244, 1962.
- 6-Emekli, N.B., Ulutin, O.N.: Some properties of autoprothrombin II anticoagulant. In Recent Progress in Blood Coagulation and Thrombosis Research. O.N.Ulutin (ed.) Bibliotheca Haematologica, 44:15-20, S. Karger, Basel, 1978.
- 7-Emekli, N.B., Ulutin, O.N.: The effect of autoprothrombin II-A on the DIC formed animals. Thrombos Haemostas (Stuttgart) 42:449, 1979.
- 8-Emekli, N.B., Ulutin, O.N.: The protective effect of autoprothrombin II-anticoagulant on experimental DIC formed animals. Haematologica 65:644-651, 1980.
- 9-Ulutin,O.N., Emekli ,N.B.: Protein C and autoprothrombin II- anticoagulant. New Istanbul Contr. Clin. Sc. 13: 171-185, 1982.
- 10-Coşkun, H., Özsoy, Y., Akat, E., Beşirli, K., Ulutin, T., Uzman, F., Ulutin, O.N.: Bir protein C eksikliği vakası. XXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, 11-14 Ekim 1989, İstanbul.
- 11-Walker, F.J.: Regulation of activated protein C by a new protein: A possible function for bovine protein S. J Biol Chem, 255:5521-5524, 1980.
- 12-Ulutin, O.N., Özsoy, Y., Ulutin, T., Demirkol, F., Tabak, F., Ferhanoğlu, B.: Bir protein S eksikliği vakası. XXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, 11-14 Ekim 1989, İstanbul.

- 13-Kisiel, W.: Human plasma protein C: Isolation, characterization, and mechanisms of activation by alfa-thrombin. *J Clin Invest*, 64:761-769, 1979.
- 14-Marlar, R.A., Kleiss, A.J., Griffin, J.H.: Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. *Blood*, 59:1067-1072, 1982
- 15-Suttie, J.V.: Recent advances in hepatic vitamin K metabolism and function. *Hepatology* 7:367-376, 1987.
- 16-Lian, J.B., Gunberg, C.M.: Osteocalcin, biochemical consideration and clinical applications. *Clin Orthop Rel Res*. 226:267-291, 1988.
- 17-Ploplis, V.A., Strickland, D.K., Castellino, F.J.: Calorimetric evaluation of the existence of separate domains in bovine prothrombin. *Biochemistry*, 20:15-21, 1981.
- 18-Jackson, J.M.: Mecanizms of prothrombin activation. In *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice*. R.W. Colman, J. Hirsh, V.J. Marder, E.W. Salzman, (Eds) Second edition, Lippincott, Philadelphia, 1987, pp.135-147.
- 19-Park, C.H., Tulinsky A.: Three dimentional structure of the krinkle sequence: Structure of the prothrombin fragment I. *Biochemistry*, 25:3977-3982, 1986.
- 20-Bloom, J.W., Mann, K.G.: Metal ion induced conformational transition of prothrombin and prothrombin fragment I. *Biochemistry*, 17:4430-4438, 1978.
- 21-Prendergast, F.G., Mann, K.G.: Differentiation of metal ion-induced transitions of prothrombin fragment I. *J Biol Chem*, 252:840-850, 1977.
- 22-Nelsestuen, G.L., Suttie, J.W.: Properties of asialo and aglyco-prothrombin. *Biochem Biophys Res Commun*, 45:198-200, 1971.
- 23-Hemker, H.C., Veltkamp, J.J., Hensen, A., Loeliger, E.A.: Nature of prothrombin biosynthesis: Preprothrombinaemia in vitamin K deficiency. *Nature*, 200:589-590, 1963.
- 24-Nelsestuen, G.L., and Suttie, J.W.: The purification and properties of an abnormal prothrombin protein produced by dicumarol-treated cows. A comparison to normal prothrombin. *J Biol Chem*, 247: 8176-8182, 1972.
- 25-Malhotra, O.P., and Carter, J.R.: Biological and nonbiological activation of normal and dicoumarol-treated prothrombin. *Life Sciences*, 11: 445-454, 1972.
- 26-Prowse, C.V., Mattock, P., Esnouf, M.P., and Russel, A.M.: A variant of prothrombin induced in cattle by prolonged administration of warfarin. *Biochim Biophys Acta*, 434:265-279, 1976.
- 27-Esnouf, W.P., and Prowse, C.V.: The gamma-carboxy glutamic acid content of human and bovine prothrombin following warfarin treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 490:471-476, 1977.
- 28-Malhotra, O.P.: Atypical prothrombin in purified preparations from dicoumarol-treated steers. *Life Sciences*, 11:901-907, 1972.

- 29-Vermeer,C., Govers-Riemslog,J.W.P., Soute,B.A.M., Lindhout,M.J., Kop,J., Hemker,H.C.: The role of blood clotting factor V in the conversion of prothrombin and a decarboxy prothrombin into thrombin. *Biochim Biophys Acta*, 538:521-533, 1978.
- 30-Liebman,H.A.: Isolation and characterization of a hepatoma-associated abnormal (des-gamma-carboxy) prothrombin. *Cancer Research*, 49:6493-6497,1989.
- 31-Franza,R.B., Aronson,D.L., Finlayson,J.S.: Activity of human prothrombin by a procoagulant fraction from echis carinatus venom. *J Biol Chem* 250:7057-7068, 1975.
- 32-Corrigan,J.J., Earnest,L.: Factor II antigen in liver disease and Warfarin-induced vitamin K deficiency: correlation with coagulant using echis venom. *Am J Hemat*, 8:249-255, 1980.
- 33-Bertina,R.M., van der Marel-van Nieuwkoop W, Dubbeldam, J.,Boekhout-Mussert, R.J., Veltkamp,J.J.: New method for the rapid detection of vitamin K deficiency. *Clin Chim Acta*. 105:98-8, 1980.
- 34-Martinoli, J.L.: Dosage de la prothrombine. Quelques reflexions sur le choix des techniques. 6<sup>e</sup> Congre's International sur la Thrombose de la Lique Mediterranee Contre les Maladies Thromboemboliques. Abs. 80, Monte Carlo, 1980.
- 35-Soulier,J.P., Gozin, D., Lefrere, J.J.: Nouvelle methode de dosage fonctionnel de la de-gamma-carboxyprothrombine a l'aide de staphylocoagulase. *La Presse Medicale*, 40:2049-52, 1985.
- 36-Soulier,J., Gozin,D., Lefrere,J.: A new method to assay des-gamma carboxyprothrombin. Results obtained in 75 cases of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 91:1258-1262, 1986.
- 37-Ganrot,P.O., Nilehn,J.E.: Plasma prothrombin during treatment with dicumarol: Demonstration of an abnormal prothrombin fraction. *Scand J Clin Lab Invest*, 22:23-28, 1968.
- 38-Corrigan, J.J., Kryc,J.J.: Factor II (prothrombin) levels in cord blood: Correlation of coagulant activity with immunoreactive protein. *J Pediatr* , 97:979-83, 1980.
- 39-Shah,D.V., Swanson, J.C., Suttie,J.W.: Abnormal prothrombin in the vitamin K deficient rat. *Thromb. Res*, 35:451-8, 1984.
- 40-Francis,J.L.: A rapid and simple micromethod for the specific determination of des-carboxylated prothrombin (PIVKA-II). *Med Lab Sci*,45:69-73, 1988.
- 41-Kries,R. V., Becker,A., Göbel,U.: Vitamin K in the newborn: Influence of nutritional factors on acarboxy-prothrombin detectability and factor II and VII clotting activity. *Eur J Pediatr*, 146:123-127, 1987.
- 42-Von Kries,R.,Kreppel,S., Becker,A.,Tangermann,R.,Göbel,U.: Acarboxyprothrombin activity after oral prophylactic vitamin K. *Arch. Dis. Child.*, 62:938-940, 1987.



- 43-Blanchard,R.A., Furie,B.C., Kruger.,S.F., G.Maneck,G., Jorgensen, M.J., Furie,B.: Immunoassays of human protrombin species which correlate with functional coagulant activities. *J Lab Clin Med*, 101:242-255, 1983.
- 44-Blanchard,R.A., Furie,B.C., Jorgensen,M., Steven,F.,Kruger,B.A., Frue,B.: Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. *N Eng J Med* 305:242-8, 1981
- 45-Kaplan,M.M., Elta, G.H., Furie, B., Sadowski,J.A., Russell,R.M.: Fat-Soluble vitamin nutriture in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterol*, 95:787-792, 1988.
- 46-Liebman,H.A., Furie,B.C., Tong,M.J., Blanchard,R.A., Lo,K.J., Lee,S.B., Coleman, M.S., Furie,B.: Des-gama-Carboxy (abnormal) protrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Eng J Med*, 310: 1427-31, 1984.
- 47-Motohara,K., Kuroki,Y., Kan,H., Endo,F., Matsuda,I.: Detection of vitamin K deficiency by use of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for circulating abnormal prothrombin. *Pediatric Research*, 19:354-357, 1985.
- 48-Motohara,K.,Endo,F., Matsuda,I.: Screening for late neonatal vitamin K deficiency by acarboxyprothrombin in dried blood spots. *Arch. Dis. Chid.*, 62:370-375, 1987.
- 49-Yoshikawa,Y., Sakata,Y., Toda,G., Oka,H.: The Acquired vitamin K-dependent gamma-carboxylation deficiency in hepatocellular carcinoma involves not only prothrombin, but also protein C. *Hepato*, 8:524-530,1988.
- 50-Widdershoven,J.,Lambert,W.,Motohara,K., Monnens, L., de Leenheer,A., Matsuda, I., Endo,F.: Plasma concentrations of vitamin K<sub>1</sub> and PIVKA-II in bottle-fed and breast-fed infants with and without vitamin K prophylaxis at birth. *Eur J Pediatr*, 148:139-142, 1988.
- 51-Shinzawa,T., Mura,T., Tsunei,M., Shiraki,K.: Vitamin K absorption capacity and its association with vitamin K deficiency. *AJDC*, 143:686-689,1989.
- 52-Motohara,K., Takagi,S., Endo,F., Kiyota,Y., Matsuda,I.: Oral supplementation of vitamin K for pregnant women and effects on Levels of plasma vitamin K and PIVKA-II in the neonate. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 11:32-36, 1990.
- 53 -Fujiyama,S., Morishita,T., Sagara,K., Sato,T., Motohara,K., Matsuda,I.: Clinical evaluation of plasma abnormal prothrombin (PIVKA-II) in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterol*, 33:201-205,1986.
- 54-Motohara,K., Endo,F., Matsuda,I., Iwamasa,T.: Acarboxy prothrombin (PIVKA-II) as a marker of hepatoblastoma in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 6:42-45, 1987.
- 55-Umeki,S., Umeki,Y.: Levels of acarboxyprothrombin (PIVKA-II) and coagulation factors in warfarin treated patients. *Med Lab Sci*, 47:103-107, 1990.
- 56-Origuchi,Y., Motohara,K., Endo,F., Matsuda,I.: Plasma PIVKA-II levels in epileptic patients [Letter], *Brain Dev* 12:451, 1990.

- 57-Tsai,S.L., Huang,G.T., Yang,P.M., Sheu,J.C., Sung,J.L., Cheng,D.S.: Plasma des-gamma-carboxyprothrombin in the early stage of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 11:481-488, 1990.
- 58-Nakao,A., Suzuki,Y., Isshiki,K., Kimura,Y., Takeda,S., Kishimoto,W., Nonami,T., Harada,A., Takagi,H.: Clinical evaluation of plasma abnormal prothrombin (des-gamma-carboxyprothrombin) in hepatobiliary malignancies and other diseases. *Am J Gastroenterol*, 86:62-66, 1991.
- 59-Dam,H.: Cholesterinstoffwechsel in hühnereiern Und hühnchen. *Biochem. Z.* 215:475-492, 1929, In *Recent Progress In Blood Coagulation and Thrombosis Research*. O.N.Ulutin (Ed.) *Bibliotheca Haematologica*, 44:13, S.Karger, Basel, 1978.
- 60-Doisy, E.A., MacCorquodale,D.W., Thayer,S.A., Binkley, S.B.,McKee, R.W.: The isolation, constitution and synthesis of vitamin K1. *Science*. 90:407,1939. In *Recent Progress In Blood Coagulation and Thrombosis Research*. O.N.Ulutin (Ed.) *Bibliotheca Haematologica*, 44:6, S.Karger, Basel, 1978.
- 61-Di Scipio, R.G., Hermodson, M.A., Yates, S.G., and Davie, E.W.: A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas Factor), factor X (Stuart Factor), and protein S. *Biochem*, 16:698-706, 1977.
- 62- Hathaway,W.E.: New insights on vitamin K. *Pediatric Hematology*, 1: 367-379, 1987.
- 63-Esmon,C.T.,Sadowski,J.A., Suttie,J.W.: A new carboxylation reaction. The vitamin K-dependent incorporation of H(14)CO<sub>3</sub> into prothrombin. *J Biol Chem*, 250: 4744-4748, 1975.
- 64-Suttie,J.W.: Vitamin K-dependent carboxylase. *Ann Rev Biochem* 54:459-77, 1985.
- 65-Suttie,J.W.: The biochemical basis of warfarin therapy. *Adv Exp Med Biol* 214: 3-16, 1987.
- 66-Johnson ,B.C.: The vitamin K-dependent reactions. *J Chromatography* 440:499-505, 1988.
- 67-Girardot,J.M., Johson, B.C.: A new detergent for the solubilization of the vitamin K-dependent carboxylation system from liver microsomes: Comparison with triton X-100. *Anal Biochem*, 121:315-320, 1982.
- 68-Rich,D.H.,Lehrman,S.R.,Kawai,M.,Goodman,H.L.,Suttie,J.W.: Synthesis of peptide analogues of prothrombin precursor sequence 5-9. substrate spesificity of vitamin K dependent carboxylase. *J Med Chem*, 24:706-11, 1981.
- 69-Soute,B.A.M., Vermeer,C.,DeMetz,M.,Haemker,H.C., Lijnen,H.R.: In vitro prothrombin synthesis from a purified precursor protein III. Preparation of an acid-soluble substrate for vitamin K-dependent carboxylase by limited proteolysis of bovine descarboxyprothrombin. *Biochim Biophys Acta*, 676:101-107, 1981.

- 70-Suttie,J.W.,Hoskins,J.A.,Engleke,J.,Hoffgartner,A.,Ehrlich,H.,Bang, N., Belagaje, R.M., Schoner,B., Long, G.L.: Vitamin K-dependent carboxylase: Possible role of the substrate "propeptide" as an intracellular recognition site. *Proc Natl Acad Sci, U.S.A.*, 84:634-637, 1987.
- 71-Long,L., Belagaje,R.M., MacGillivray, R.T.A.: Cloning and sequencing of liver cDNA coding for bovine protein C. *Proc Natl Acad Sci, U.S.A.*, 81:5653-56, 1984.
- 72-Larson, A.E.,Friedman,P.A.,Suttie,J.V.: Vitamin K-dependent carboxylase: Stoichiometry of carboxylation and vitamin K 2,3-epoxide formation. *J Biol Chem*, 256:11032-35, 1981.
- 73-McTigue,J.J., Suttie,J.W.: Vitamin K carboxylase: Demonstration of a vitamin K- and O<sub>2</sub>-dependent exchange of <sup>3</sup>H from <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O into glutamic acid residues. *J Biol Chem*, 258:12129-31, 1983.
- 74-Anton, D.L.,Friedman,P.A.: Fate of activated gamma-carbon-hydrogen bond in the uncoupled vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylation reactions. *J Biol Chem*, 258:14084-87, 1983.
- 75-Siegfried,J.M.: Solubilization of vitamin K epoxide reductase and vitamin K-dependent carboxylase from rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 83:1488-95, 1978.
- 76-Hildebrandt,E.F., Preusch,P.C., Patterson,J.L., Suttie,J.W.: Solubilization and characterization of vitamin K epoxide reductase from normal and warfarin resistant rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 228:480-92, 1984.
- 77-Martius,C., Strufe,R.: *Biochem Z*, 326:24-27, 1954. In *The Vitamin K Dependent Reactions*. (Johnson ,B.C.) *J Chromatography* 440:499-505, 1988
- 78-Wallin,R., Gephardt,O., Prydz,H.: NAD(P)H dehydrogenase and its role in the vitamin K (2-Methyl-3-phytyl-1,4-Naphthoquinone)-dependent carboxylation reaction. *Biochem J* 169:95-101, 1978.
- 79-Fasco,M.J.,Principe,L.M.: Vitamin K<sub>1</sub> hydroquinone formation catalyzed by DT-diaphorase. *Biochem Biophys Res Commun*, 104:187-92, 1982.
- 80-Wallin,R.,Martin,L.F.: Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin. *J Clin Invest*, 76:1879-84, 1985.
- 81-Wallin,R., Suttie,J.W.: Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K epoxydation. Evidence that the warfarin sensitive microsomal NAD(P)H dehydrogenase reduces vitamin K<sub>1</sub> in these reactions. *Biochem J*, 194:983-88, 1981.
- 82-Wallin,R.: Vitamin K antagonism of coumarin anticoagulation. A dehydrogenase pathway in rat liver is responsible for the antagonistic effect. *Biochem J*, 236:685-93, 1986.
- 83-Whitlon,D.S., Sadowski,J.A., Suttie,J.W.: Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochem*, 17:1371-77, 1978.

- 84-Wallin,R., Hudson,S.: Vitamin K-dependent carboxylation. Evidence that at least two microsomal dehydrogenases reduce vitamin K<sub>1</sub> to support carboxylation. *J Biol Chem*, 257:1583-86, 1982.
- 85-Fasco,M.J.,Principe ,L.M.: Vitamin K<sub>1</sub> hydroquinone formation catalysed by a microsomal reductase system. *Biochem Biophys Res Commun*, 97:1487-92, 1980.
- 86-Sherman,P.A., Sander,E.G. Vitamin K epoxide reductase: Evidence that vitamin K dihydroquinone is a product of vitamin K epoxide reduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 103:997-1005, 1981.
- 87-Fasco,M.J.,Principe ,L.M.: R- and S-warfarin inhibition of vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide reductase activities in the rat. *J Biol Chem*, 257:4894-4901, 1982.
- 88-Joist,J.H.: Hemostatic abnormalities in liver disease. In *Hemostasis and Thrombosis. Basic Prenciples and Clinical practice*. R.W.Colman,J.Hirsh, V.J.Marder,E.W. Salzman,(eds.), Second Edition, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1987. pp.861-872
- 89-Fiore,L., Levine,J., Deykin,D.: Alterations of hemostasis in patients with liver disease. In *Hepatology A Text Book of Liver Disease*. D.Zahim, T.D.Boyer,(Eds), Second Edition, Saunders, Philadelphia, 1990.pp 546-571.
- 90-Lechner,K., Niessner,H., Thaler,E.: Coagulation abnormalities in liver diseases. *Throm Haemos*, 4:40-56, 1977.
- 91-Verstaete,M., Vermylen,J., Collen,D.: Intravascular coagulation in liver disease. *Annu Rev Med*, 25:447-453, 1974.
- 92-Bertaglia,E., Belmonte,P., Vertolli,U., Azzurro,M., Martines,D.: Bleeding in cirrhotic patients: A precipitating factor due to intravascular coagulation or to hepatic failure? *Haemostasis*, 13:328-334, 1983.
- 93-Aurousseau,M.H., d'Angeli,J.L., Josso,F.: Antithrombin III versus prothrombin in liver cirrhosis. *Haemostasis*, 10:104-107, 1981.
- 94-Zurborn,K.H., Kirch,W., Bruhn,H.D.: Immunological and functional determination of the protease inhibitors, protein C and antithrombin III, in liver cirrhosis and in neoplasia. *Throm Res* 52:325-336, 1988.
- 95-Töziün, N., Ökten, A., Yardımcı, T.: Role of protein C in thrombus formation in cases of presinusoidal and postsinusoidal portal hypertension. *Thrombosis and Hemorrhagic Diseases* O.N. Ulutin, H. Vinazzer (Eds.), Istanbul Gözlem Matbaacılık koll Ş., 1986, pp 404-408.
- 96-Girolami,A., Patrassi,G., Cappellato,G., Quaino,V.: An immunological study of prothrombin in liver cirrhosis. *Blut*, 41:61-66, 1980.
- 97-Barlas,O., Ulutin, Ş.B., Ulutin, O.N.: The heamostatic defects in liver cirrhosis. V th Congr.Asian-Pacific Soc. Haemat. Sept. 1-6,1969, Istanbul, Turkey.(Abst. 150)
- 98-Barlas,O., Ulutin, Ş.B., Ulutin, O.N.: Karaciğer sirozunda hemostatik defekt. *Ist. Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak Dergisi*, 1:3, 1970.

- 99-Balkuv,Ş.,Ulutin,O.N., Barlas,O.: Siroz vakalarında bazı koagülasyon faktörlerinin durumu. XIX. Milli Türk Tıp Kongresi, 25-29 Eylül 1966, İzmir.
- 100-Balkuv,Ş.,Ulutin,O.N., Barlas,O.: Karaciğer hastalıklarında faktör IX üzerine bir çalışma. Türk Tıp Cem.Mec. 39:133, 1967.
- 101-Badylak,S.F.: Coagulation disorders and liver disease. Hemostasis, 18:87-93, 1988.
- 102-Balkuv,Ş.,Ulutin,O.N., Barlas,O.: Karaciğer hastalıklarında faktör V seviyeleri. Ist.Univ. Tıp Fak.Mec. 29:424, 1966.
- 103-Biland,L., Duckert,F., Prisender,S., Nyman,D.: Quantitative estimation of coagulation factors in liver disease. The diagnostic and prognostic value of factor XIII, factor V and plasminogen. Thrombos Haemostas (Stuttg), 39:646-656, 1978.
- 104-Fujiyama,S., Morishita, T.,Hashiguchi,O., Sato,T.: Plasma abnormal prothrombin (des-gamma-carboxy prothrombin) as a marker of hepatocellular carcinoma. Cancer, April 15:1621-1628, 1988.
- 105-Deyashiki,Y., Nishioka,Y., Takahashi,K., Kosaka,Y., Suzuki,K.: Evaluation of des-gamma-carboxy prothrombin as a marker protein of hepatocellular carcinoma. Cancer Dec 15:2546-2551, 1989.
- 106-Ho,C.H., Lee,S.D., Chang,H.T., Wu,J.C., Tsai,Y.T., Lo,K.J.: Application of des-gamma-carboxy prothrombin as a complementary tumor marker with alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. Scand J Gastro, 24:47-52,1989.
- 107-Lefrere,J.J., Conard,J., Mavier,P., Bettan,L., Beaugrand,M., Gozin,D., Lerable,J., Dhumeaux, Samama,M.: Coagulation assays as diagnostic markers of hepatocellular carcinoma. Throm Haemos, 60:468-470, 1988.
- 108-Uras,A.R.: K vitamini bağımlı sığır plazma proteinlerinin sistematik saflaştırılması ve HPLC ile değerlendirilmesi. Doktora Tezi, MÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (1990)
- 109-Bajaj,S.P.,Rapaport,S.I., Prodanos,C.: A simplified procedure for purification of human prothrombin, factor IX and factor X. Prep Biochem, 11:397-412, 1981.
- 110-Bajaj,S.P.,Rapaport,S.I., Maki,S.L., and Brown,S.F.: A procedure for isolation of human protein C and protein S as by products of the purification of factor VII, IX, X and prothrombin. Prep Biochem, 13:191-214, 1983.
- 111-Michalski,C., Bal,F.,Burnouf,T.,Goudemand,M.: Large-scale production and properties of a solvent-detergent-treated factor IX concentrate from human plasma. Vox Sang, 55:202-210, 1988.
- 112-Payne, J.W.: Electrophoresis of proteins on SDS gels in Chromatographic and Electrophoretic Techniques. I.Smith, (Ed.) Vol II. Heinemann, London (fourth edition), 1976, pp 321-332.



- 113-Bidimensional Electrophoresis in Hemostasis. Technical Brochure, (Diagnostica Stago), Jan 1989.
- 114-Ouchterlony,O.:Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Arbor Science Publishers Inc.(1970), In Practical Immunology, L.Hudson., F.C.Hay (Eds), Blackwell, Oxford, 1976, pp 110-115.
- 115-Hudson,L., Hay,F.C.: Practical Immunology. Blackwell, Oxford, 1976, pp 119-121.
- 116-Johnston,A., Thorpe, R.: Immunochemistry in practice. Second Edition, , Blackwell, Oxford, 1987, pp 2.
- 117-Moore,H.C., Lux,S.E., Malhotra,O.P., Bakerman,S., Carter,J.R.: Isolation and purification of bovine and canine protrombin. Biochim Biophys Acta, 111: 174-180, 1965.
- 118-Hashimoto,N.,Morita,T., Iwanaga,S.: A method for systematic purification from bovine plasma of six vitamin K-dependent coagulation factors: Protrombin, factor X, factor IX, protein S, C and protein Z. J Biochem, 97,1347-1355, 1985.
- 119-Di Scipio,R.G., Hermodson,M.A., Yates,S.G., Davie,E.W.: A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas Factor), factor X (Stuart Factor), and protein S. Biochem. 16:698-70, 1977.
- 120-Shapiro,S.S., Waugh,D.F.: The purification of human prothrombin. Thromb Diath Haemorrh,16:469-490, 1966.