

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FAKTÖR V 4070 A-G DEĞİŞİMİNİN TROMBOZLU HASTALARDA
İNCELENMESİ

Sezen BALLI

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. M. Nejat AKAR

ANKARA

2010

KABUL ONAY

Prof. Dr. Nejat AKAR danışmanlığında, Sezen BALLI tarafından hazırlanan bu çalışma, 31.08.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı' nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Zümrüt UYSAL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Nejat AKAR

İmza:

Üye: Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Enstitü Müdürü

Faktör V 4070 A-G değişiminin trombozlu hastalarda incelenmesi

ÖZET

Tromboz, birçok etmenin neden olduğu bir hastalıktır. APC direnci ise venöz tromboz için önemli risk faktörlerinden biridir. FV geninde yanlış anlam mutasyonuna neden olan yaygın bir polimorfizm olan FV Arg506Gln değişimi, faktör V molekülündeki APC kesim bölgelerinden birinin kaybına neden olur, APC direncinden sorumludur. Bununla birlikte, faktör V geninde kompleks bir haplotip bulunmaktadır. Haplotipe adını veren ve genin 4070. nükleotidinde bulunan A (R1) – G(R2) değişimi ile birlikte, haplotipe ait 13 polimorfizm tanımlanmıştır. R2 haplotipine sahip faktör V proteinin, FVIIIa' nın degradasyonunda görevli APC için gösterdiği kofaktör aktivitesinin düşük ve daha prokoagülan bir form olan FV1' in oranının ise FV2' ye göre artmış olduğu belirlenmiştir. Çelişkili sonuçlara rağmen, faktör V genine ait bu haplotipin venöz tromboz riskini önemli şekilde arttırdığı belirtilmiştir. Tromboz için önemli bir risk faktörü olduğu bilinen FVL' i taşımasına rağmen, uzun yıllar tromboz geçirmeyen bireyler mevcuttur. Tromboza katkısı olduğu düşünölen R2 allelinin aksine R1 allelinin, bu kişileri tromboza karşı koruyabileceği düşünölmüş ve bu çalışmada, FV 4070 A (R1) – G (R2) gen değişiminin tromboz açısından etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmaya, tromboz tanısı almış 0-18 yaş aralığındaki ve 70 yaş ve üzerindeki hastalarla birlikte, aynı iki yaş grubundaki sağlıklı bireyler dahil edilmiştir. Bireylerden alınan kan örneklerinden fenol-kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Faktör V 4070 A-G değişimi için uygun primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiş, faktör V geninin 13. ekzonunun çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinde, ilgili gen değişimini saptamak için RsaI restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim yapılmış, agaroz jel elektroforezi ile bant farklılıkları saptanarak gen değişimleri tespit edilmiştir.

Faktör V 4070 A-G değişiminin, 0-18 yaş ve 70 yaş üzeri gruplara dahil olan hasta ve sağlıklı bireylerdeki etkisine bakıldığında, R1 allelinin heterozigot veya homozigot taşınması durumunda, trombozla ilişkili koruyucu bir etkiye sahip olmadığı görülürken, R2 allelinin de aynı yaş grupları ve aynı genotip durumunda tek başına tromboza neden olabilecek bir risk faktörü olmadığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Koagölasyon, Tromboz, Haplotip, Faktör V HR2, Factor V Leiden

Investigation of Factor V 4070 A-G substitution in patients with thrombosis.

ABSTRACT

Thrombosis is a multigenic disease and APC resistance is major risk factor for causing thrombosis. A common polymorphism (FVL) in the FV gene that causes a missense mutation, FV Arg506Gln, results in the loss of one activated protein cleavage site of FV and APC resistance. Recently, a complex haplotype of FV (HR2), which includes 13 different polymorphisms throughout the gene, has been reported. One of these polymorphisms is factor V 4070 A(R1) –G(R2) substitution which also gives its name to the haplotype. Factor V with HR2 possesses decreased co-factor activity to APC in the degradation of FVIIIa and an increased ratio of the more procoagulant isoform FV1 compared to FV2. Contrasting results on whether the haplotype induces a significant risk of venous thromboembolism have been reported. There are several individuals who have FVL, a common risk factor related to thrombosis, didn't experienced thrombosis. Contrast to R2 allele which contributed to thrombosis risk, R1 allele is thought to be protective associated with the disease and the goal of the study is to determine effects of FV 4070 A (R1) –G(R2) substitution in patients with thrombosis.

In the study, in the range of 0-18 years and 70 and over 70 years patients diagnosed with thrombosis and the same two age groups healthy controls were screened. DNA isolation was carried out with phenol-chloroform method from blood samples taken from individuals. Amplification of exon 13 of the factor V gene was performed by polymerase chain reaction (PCR) with appropriate primers. PCR products was digested with RsaI restriction endonuclease enzyme for detecting gene variation with agarose gel electrophoresis.

Effects of factor V 4070 A-G substitution were determined in 0-18 and 70 and older age groups included patient and healthy individuals. Carrying R1 allele in heterozygous or homozygous state was not associated with any protective effect in thrombosis. It was found that R2 allele was not an independent risk factor for thrombosis in the same age groups and genotype states.

Key words: Coagulation, Trombosis, Haplotype, Factor V HR2, Factor V Leiden

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana çalışma olanağı sağlayan, akademik hayatım boyunca bilgi ve yardımına her zaman ihtiyaç duyacağım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve önerileriyle bana her zaman yol gösteren, bilimsel düşüncemin şekillenmesinde çok büyük payı olan değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a,

Yüksek lisans eğitimim sırasında yurtdışında bulunduğum süre boyunca bana karşı samimi ve sabırlı davranarak, bilimsel altyapımın oluşmasında çok büyük katkısı olan, Prof. P. Mannuccio MANNUCCI ve Dr. Luciano BARONCIANI'ye, değerli çalışma arkadaşlığı için Maria SOLIMANDO'ya,

Güler yüzü ve samimiyeti için Uzm. Ece AKAR'a, tez çalışmalarım sırasındaki yardımları için Dr. Ayşenur ÖZTÜRK'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca çok büyük yardımını ve desteğini gördüğüm, bu dönemdeki en sıkıntılı anlarımı benimle paylaşan, güzel yorumları ile her zaman yanımda olan çok değerli çalışma arkadaşım Uzm. Z. Gülin GÜLBAHAR'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım arkadaşlarım, Çiğdem ARSLAN'a, Kadir SİPAHİ'ye, Duygu SANLIDİLEK'e, Dilara F. AKIN'a, Ercan BAYRAKTAR'a, Duygu DUMAN'a, Özge CUMAOĞULLARI'na, Didem TORUN'a ve Afife KARABIYIK'a, tez çalışmamın ilerlemesinde emeği olan Emel USLU'ya, her sabah güzel karşılamaları için Nurgül ŞEDİT'e, Hatice GÜÇLÜ'ye ve ismini saymadığım tüm Çocuk Genetik ailesine çok teşekkür ederim.

Ayrıca; on beş yıldır benimle olan, birlikte büyürken hayatın iyi ve kötü yanlarını paylaştığım çok sevdiğim arkadaşlarıma,

Sevgisini her zaman hissettiğim, bilimsel fikirleri ile tez çalışmam sırasında olduğu gibi bundan sonra da hayatımın her anında benimle birlikte olacak olan, varlığına her zaman ihtiyaç duyacağım, Uzm. Samet Serdar YILDIRIM'a,

Bana nitelikli bir insan olmak adına bildiğim her şeyi öğreten, olmak istediklerimi olabilmem için bana her türlü imkanı sağlayan, beni her konuda anlayarak göremediklerimi gösteren ve kendimi her zaman şanslı hissettiren, çok sevdiğim aileme teşekkür ederim.

Sezen BALLI

Ankara, Ağustos 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
DİZİNLER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HEMOSTAZ	3
2.1.1. Primer Hemostaz	4
2.1.2. Sekonder Hemostaz	6
2.1.2.1. Koagülasyon Kaskadı	7
2.1.2.2. Koagülasyonun Sınırlandırılması ve Antikoagülan Yol	13
2.1.2.3. Fibrinolitik Sistem	16
2.2. TROMBOZ	17
2.3. KOAGÜLASYON FAKTÖRÜ V (FV)	19
2.4. MOLEKÜLER TEKNİKLER	23
2.4.1. Çözelti ve Solüsyonlar	23
2.4.2. DNA Ekstraksiyonu	23
2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	23
2.4.4. DNA' nın Enzimatik Kesimi	24
3.MATERYALve YÖNTEM	26
3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI	26

3.2. YÖNTEMLER	26
3.2.1. DNA İzolasyonu	26
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	27
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	29
3.2.4. Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesim	29
3.2.5. İstatistiksel Analiz	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	31
4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bulguları	31
4.2. PCR ürünlerinin RsaI Restriksiyon Enzimi Kesim Sonuçları	31
4.3. İstatistiksel Analiz Bulguları	32
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	41
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Hemostaz mekanizmasındaki komponentlerin basit gösterimi	3
Şekil 2.2.	Hemostaz sürecinde rol alan sistemlerin gösterimi	4
Şekil 2.3.	Endoteldeki, prokoagülan ve antikoagülan sistemlere ait bileşenlerin gösterimi	5
Şekil 2.4.	Trombosit adezyon ve agregasyonu	6
Şekil 2.5.	Koagülasyon Kaskadı	9
Şekil 2.6.	Yeni koagülasyon kaskadı modeli	10
Şekil 2.7.	Pıhtılaşmanın üç basamağı	12
Şekil 2.8.	Vasküler endoteldeki antikoagülan sistemlerin gösterimi	14
Şekil 2. 9.	Virchow triadı	18
Şekil 2.10.	FV geni ve aktif FV proteinin fonksiyonel domainler	20
Şekil 2.11.	FV molekülünün APC tarafından inaktivasyonu	21
Şekil 2.12.	FV geni üzerindeki HR2 haplotipine ait polimorfizmlerin bir kısmı	22
Şekil 4. 1.	Faktör V geni 13. ekzonuna ait PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü	31
Şekil 4. 2.	RsaI restriksiyon enzimi ile yapılan kesimin %2'lik Agaroz jeldeki görüntüsü	32
Şekil 5. 1.	FV R1/R2 gen değişimi ve tromboz riski arasındaki ilişki	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1.	Pıhtılaşma faktörler	7
Çizelge 2. 2.	Venöz tromboza neden olan risk faktörleri	19
Çizelge 3. 1.	PCR için gerekli bileşenler ve konsantrasyonları	27
Çizelge 4. 1.	FV R1/R2 gen değişiminin 0-18 yaş ve 70 yaş ve üzeri gruplardaki genotip dağılımı ve sıklığı	33
Çizelge 4. 2.	0-18 yaş grubunda, FV 4070 R1/R2 gen değişimlerinin tromboz riski açısından değerlendirilmesi	34
Çizelge 4. 3.	70 yaş ve üzerinde, FV 4070 R1/R2 gen değişimlerinin tromboz riski açısından değerlendirilmesi	34
Çizelge 4. 4.	0-18 ve 70 yaş hasta ve kontrol gruplarında, R1 ve R2 alleleri için allel dağılımları ve frekansları	35
Çizelge 4. 5.	0-18 yaş grubunda, FV 1691 G-A ve FV 4070 A-G değişimlerinin birlikteliğinin, tromboz riski açısından değerlendirilmesi	36
Çizelge 4. 6.	70 yaş üzerindeki gruplarda, FV 1691 G-A ve FV 4070 A-G değişimlerinin birlikteliğinin, tromboz riski açısından değerlendirilmesi	37
Çizelge 4. 7.	0-18 ve 70 yaş ve üzeri hasta gruplarında FV 1691 G-A ve FV 4070 A-G değişimlerinin birlikteliğinin, yaş bakımından değerlendirilmesi	38
Çizelge 4. 8.	FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A değişimlerinin olmadığı 0-18 yaş grubunda, FV 4070 A-G gen değişiminin dağılımı ve tromboz riski açısından değerlendirilmesi	39
Çizelge 4. 9.	FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A değişimlerinin olmadığı 70 ve üzeri yaş grubunda, FV 4070 A-G gen değişiminin dağılımı ve tromboz riski açısından değerlendirilmesi	39
Çizelge 4. 10.	FVL ve PT gen değişimlerinin taşıyan bireylerin bulunmadığı, 0-18 ve 70 yaş hasta ve kontrol gruplarında, R1 ve R2 allelerinin dağılımları ve frekansları	40

DİZİNLER DİZİNİ

- Dizi 3. 1.** FV geni 13. ekzonunun 703 bç'lik bölgesinin çoğaltılması için kullanılan 5', 3' primer dizisi ve 4070. nükleotidde bulunan A-G değişimi 28

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Mm	Mikromolar
A	Adenin
APC	Aktif Protein C
Arg	Arjinin
Asp	Aspartat
bç	Baz çifti
C	Sitozin
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
ddH ₂ O	Deiyonize Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonukleik asit
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dNTP	Deoksinukleotit trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
DVT	Derin ven trombozu
FI	Fibrinojen
FII	Protrombin
FIII	Tromboplastin
FIV	Kalsiyum
FV	Proakselerin, labil faktör
FVL	Faktör V Leiden
FVII	Faktör VII
FVIIa	Aktif Faktör VII
FVIII	Antihemofilik Faktör
FVIIIa	Aktif Faktör VIII
FIX	Faktör IX

FIXa	Aktif Faktör IX
FX	Faktör X
Fxa	Aktif Faktör X
FXI	Plazma tromboplastin komponenti
FXII	Hageman Faktör
FXIII	Fibrin stabilize edici faktör
G	Gram
G	Guanin
His	Histidin
kDa	Kilo dalton
kb	Kilobaz
K+	Potasyum
MgCl ₂	Magnezyum klorur
M	Molar
mM	Milimolar
ml	Mililitre
mg	Miligram
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
p	Kromozomun kısa kolu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	Pikomol
q	Kromozomun uzun kolu
RE	Restriksiyon Endonukleaz
RFLP	Restriksiyon Fragment Length Polimorfizmi
S	Saniye
Ser	Serin
TE	Tris EDTA
TBE	Tris, Borik asit, EDTA
TF	Doku Faktörü
T	Timin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tromboz, hemen her yaş grubunu ilgilendiren multifaktöriyel bir hastalıktır. Prokoagülan, antikoagülan ve fibrinolitik faktörler arasındaki hassas dengedeki bozukluk sonucu ortaya çıkar. Kan damarları içerisinde gelişen anormal pıhtıya trombüs, bir damarda trombüsten kopan pıhtı parçasının başka bir bölge damarında tıkanmaya neden olmasına ise tromboembolizm denir. Trombozun multifaktöriyel yapısı, çok sayıda edinsel ve kalıtsal risk faktörünün sıklığı ile ilişkilidir. Arteriyel ve venöz sistemde trombüs formasyonları birbirinden farklıdır. Arteriyel trombozlarda, endotel hasarı ve trombositlerin fonksiyonel bozukluklarının önemli rol oynadığı, venöz trombozlarda ise daha çok pıhtılaşma sistemine ait bozuklukların tromboz gelişimine neden olduğu bilinmektedir (Rosendaal 1999).

Bugün bilinen genetik defektlerin büyük kısmı, doğal antikoagülan yollarını ve protein C sisteminin fonksiyonlarını etkilemektedir. Aktif protein C direnci, venöz trombozla ilişkili bulunan en yaygın kalıtsal hiperkoagülasyon durumudur. 1. kromozomun uzun kolunda yer alan ve 25 ekzondan oluşan Faktör V geni, koagülasyon kaskadının önemli kofaktörlerinden birini kodlar. Bir plazma glikoproteini olan Faktör V, koagülasyon sırasında aktif formuna (FVa) dönüşerek, FXa'ya bağlanır ve protrombinin trombine dönüşümünü sağlayan protrombinaz kompleksini oluşturur (Rosing et al. 1997). FVa, aktive protein C tarafından inaktive edilir. Ancak, Faktör V geninde tek nokta mutasyonunun (G1691A) neden olduğu, 506. pozisyondaki Arjinin aminoasidi yerine Glutaminin kodlanmasıyla oluşan mutant FV, aktif protein C (APC) 'ye karşı dirençlidir (Bertina et al. 1994).

FV geninin kompleks haplotiplerinden biri olan HR2, 13 farklı polimorfizm içerir. Bu polimorfizmlerden biri FV geninin 13. ekzonundaki 4070 A-G değişimidir ve bu durum B domaininde 1299.pozisyonda Histidin (R1) ile Arginin (R2) 'in yer değiştirmesine neden olur (Lunghi et al. 1996). Yapılan çalışmalara göre HR2 haplotipinin, APC direncini arttırmakla beraber, plazma FV düzeylerini de etkilediği belirlenmiştir (Hoekema et al. 2001). FVIIIa'nin APC aracılı degradasyonunda, HR2 haplotipindeki FV 'in kofaktör aktivitesi düşüktür (Castoldi et al. 2000). Bu bilgilere dayanarak, FVL 'in VTE için en yaygın kalıtsal risk faktörü olduğunun bilinmesinin yanı sıra, HR2'nin de önemli bir risk faktörü olup VTE riskini arttırabileceği öngörülmüştür (Margaglione et al. 2002).

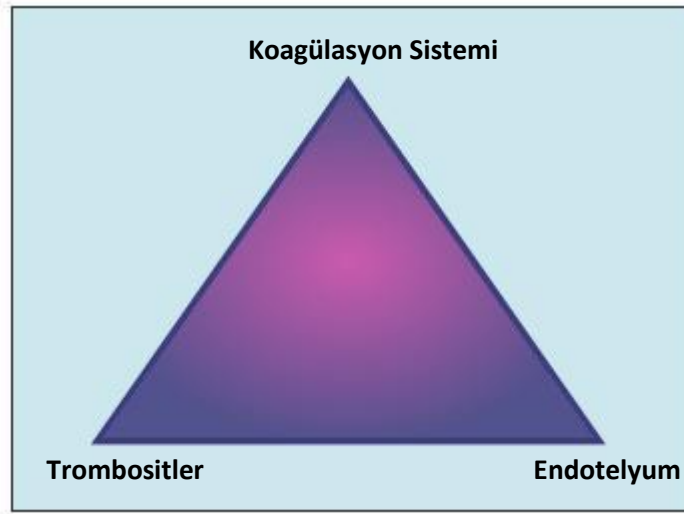
Daha önce bölümümüzde yapılan tez çalışmasında FVL mutasyonunun doğumdan itibaren tromboz için risk faktörü olduğu ve morbiditeye etkisi olduğu gösterilmiş, ancak bazı kişilerin FVL mutasyonunu taşımasına rağmen uzun yıllar boyunca, 70 yaş ve sonrasında dahi tromboz geçirmediikleri elimizdeki veriler ile saptanmıştır.

R2 allelinin de FVL gibi tromboz riskine katkıda bulunabileceği göz önünde bulundurulursa, R1 allelinin, tromboza karşı koruyucu bir etki göstereceği düşünülebilir. Tromboz bakımından koruyucu veya risk getirici bu gen değişimi ile birlikte yaşın öneminin belirlenebilmesi için çalışma, popülasyon çalışmalarında daha önce belirtilmemiş iki farklı yaş grubunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın amacı, tromboz tanısı alan ve sağlıklı olan bireylerden oluşan gruplar kullanılarak, FV 4070 A (R1) – G (R2) gen değişiminin tromboz açısından etkisinin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 HEMOSTAZ

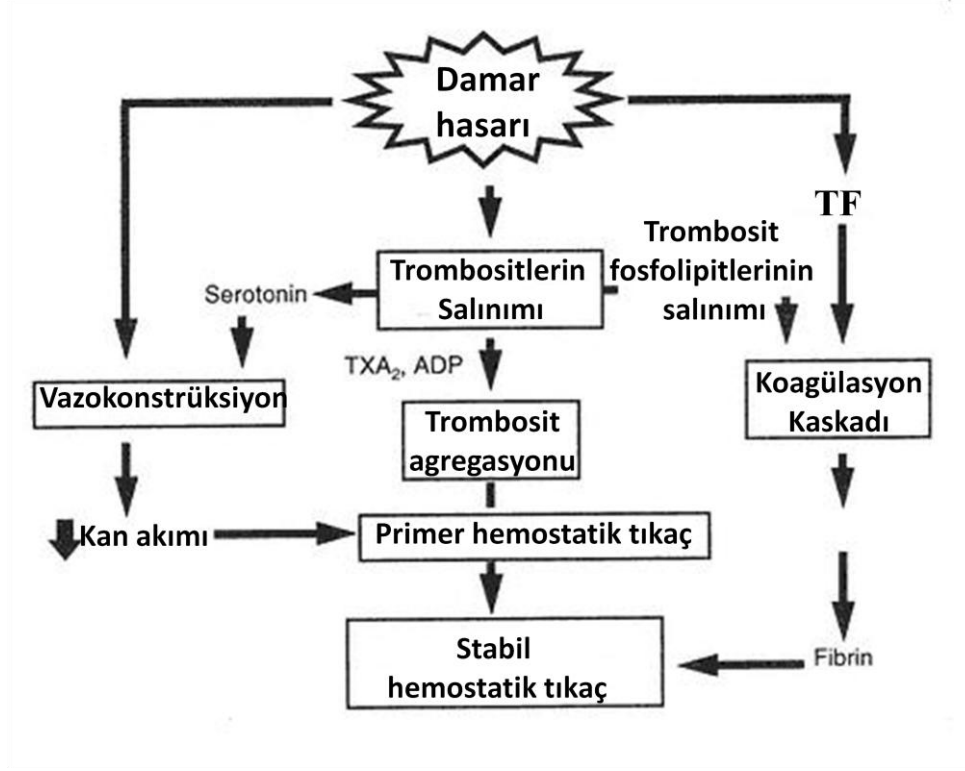
Hemostaz, kanın dolaşımında sıvı halde kalmasını sağlayan fizyolojik bir mekanizmadır. Endotel hasarının ortaya çıkması sonucu oluşan kanamayı önlemek için pıhtı oluşumunu ve damar bütünlüğünün korunmasını sağlayan sistemler bütünüdür. Koagülasyon ve hemostaz zaman zaman aynı anlamda kullanılsa da, hemostazın tanımından da anlaşılacağı gibi, koagülasyon, hemostazın yalnızca bir fazıdır. Hemostaz mekanizmasının üç önemli bileşeni, koagülasyon sistemi, trombositler ve endotelyumdur (Şekil 2. 1). Hemostatik sistemin her bileşeninin, eşit şekilde önemli olduğu düşünülürse, bu gösterim her bileşenin diğerleri ile etkileşim halinde olduğunu ve onları etkilediğini gösterir (Roberts et al. 2004).



Şekil 2.1. Hemostaz mekanizmasındaki komponentlerin basit gösterimi.

Normal şartlarda, bu etkileşimler, organizmanın hayatta kalmasını sağlamak adına, kanın akışkan halde kalması için bir bütünlük oluştururlar. Endotel hasarının meydana geldiği durumda, herhangi bir patolojinin olmadığı normal fizyolojik koşullarda, yalnızca hasarın olduğu bölgede, kanın akışkanlığı değişkenlik gösterir ve kan pıhtısı oluşur. Herhangi bir anda damarın zedelenmesi ile oluşan kanamada, hemostazın sağlanabilmesi için bu sistemler sırasıyla, endotelyum (vasküler sistem), trombositler, koagülasyon sistemi ve son

olarak da fibrinolitik sistem (tamir mekanizması)'in devreye girmesi ile sağlanır. Bir sıralama yapılmış olsa da, hemostazda yer alan bu sistemlerin, zamanlama açısından birbirinin içine girdiği veya paralel seyrettiği bilinmelidir (Perry 1999) (Şekil 2. 2) .

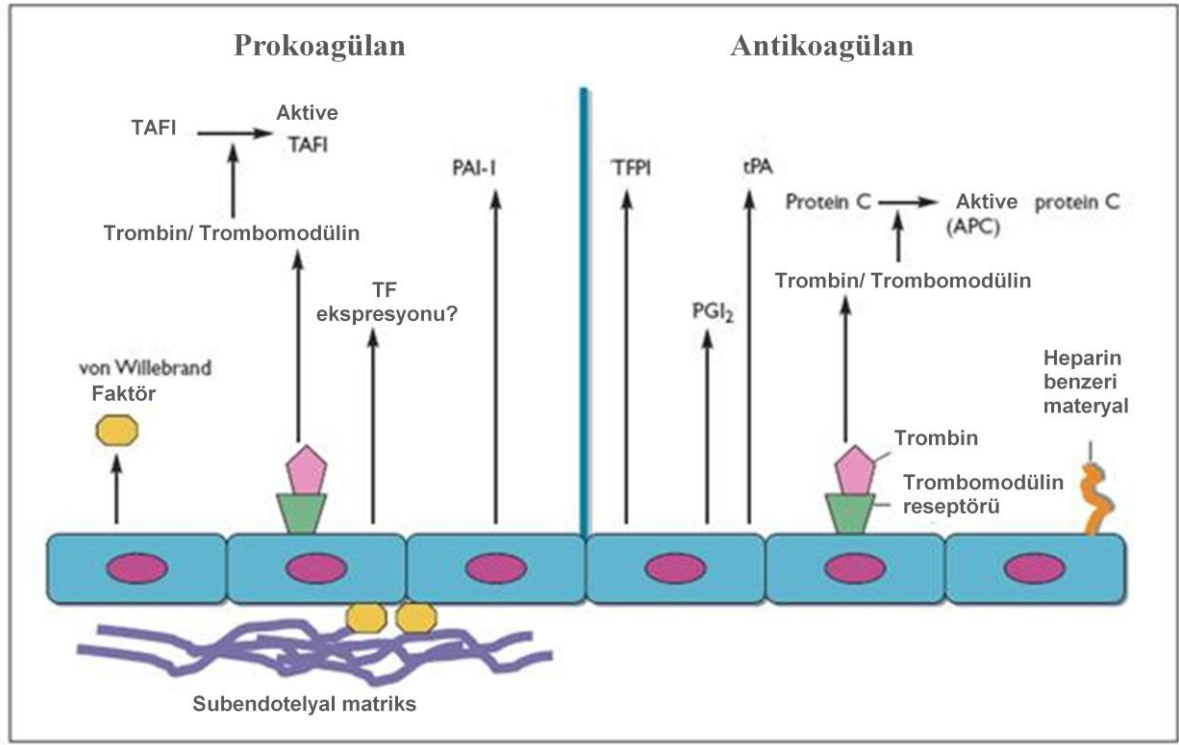


Şekil 2.2. Hemostaz sürecinde rol alan sistemlerin gösterimi (Perry 1999)

Travmadan sonraki birkaç saniye içinde refleks olarak zedelenen damarda oluşan vazokonstrüksiyon (damar çapının daralması), o damarda kan akışının yavaşlamasına neden olur. Bu süreçte, primer hemostazı vasküler endotel ve trombositler sağlarken, sekonder hemostazda ise koagülasyon proteinleri ve fibrinolitik sistemin bileşenleri görev alır (Dalhback 2005).

2.1.1. PRİMER HEMOSTAZ: Trombosit Tıkacı

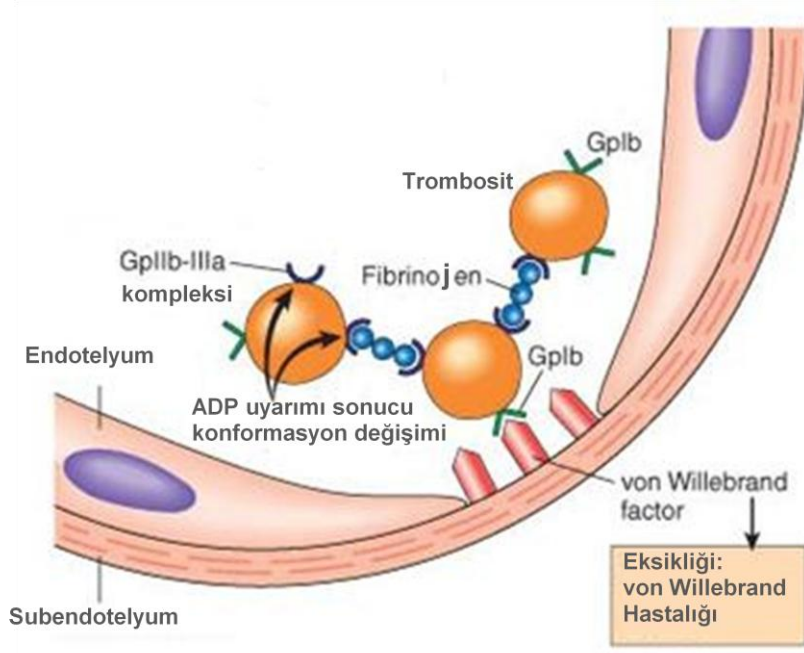
Sirkülasyondaki trombositler endoteldeki hasarı reseptörleri aracılığı ile fark eder ve zedelenen endotele yapışır. Endotelyumun antikoagülan ve prokoagülan özelliği olduğu bilinmektedir (George 2000) (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3. Endoteldeki, prokoagulan ve antikoagulan sistemlere ait bileşenlerin gösterimi (Lefkowitz BJ 2007)

Endotel, prostasiklin, trombomodulin ve doku plazminojen aktivatörü (t-PA) sentezleyerek antikoagulan özellik gösterirken, Von-Willebrand Faktörü (vWF) sentezi ile trombosit adezyonunu artırır, doku faktörü sentezi ile de koagülasyon mekanizmasının aktivasyonuna ve plazminojen aktivatör inhibitör (PAI-1) sentezi ile fibrinolizisin inhibisyonuna neden olur (Michiels 2003).

Hemostazın sağlanmasında, trombosit aktivasyonu ile koagülasyon birbirinden ayrılmaz bir bütündür. Trombositler çok çeşitli koagülasyon faktörleri ile interaksiyona girerken trombin de güçlü bir trombosit uyarandır. Trombositlerin subendotelyal kollajen veya trombin ile stimülasyonu prokoagulan fosfolipid olan fosfotidil serin' in (PS) mikroveziküler yapı içinde belirginleşmesini sağlar. Endotelde sentez edilen NO ve PGI2 trombositlerin endotele yapışmasını (adezyon) önleyen başlıca yapıdır. Endotel hasarı ile açığa çıkan kollajen, Von-Willebrand faktörü ve trombositlerin bu bölgede kümelenmesine neden olur. Adezyonda, trombositlerin GPIb adı verilen reseptörleri primer olarak görev alır (Clemetson et al. 2001). Adezyonu, trombositlerin agregasyonu takip eder. Agregasyon veya trombositlerin birbirine yapışarak küme oluşturması esnasında trombositlerin GPIIb-IIIa reseptörleri ve fibrinojen ara bağlayıcı molekül görevi üstlenir (Şekil 2. 4).



Şekil 2.4. Trombosit adezyon ve agregasyonu (Kumar 2007)

Trombositlerde fosfolipaz aktivasyonu araşidonik asit üzerinden Tromboxane A2 sentezine varacak reaksiyonlarla trombosit agregasyonuna neden olur (Woodside et al. 2001). Primer trombosit tıkaçı oluşumu geçicidir ve trombin üretimi, fibrin pıhtısının oluşumu ile sonuçlanan kan pıhtılaşması sisteminin aktivasyonu ile koordinelidir (Monroe et al. 2002).

2.1.2 SEKONDER HEMOSTAZ: Fibrin Pıhtısı

Trombositlerin aktivasyonu sonucu yüzeylerinde açığa çıkarmış oldukları fosfolipit kompleksleri, koagülasyon kaskadının iki önemli aşamasını (tenaz ve protrombinaz komplekslerinin oluşumu) hızlandırırlar. Trombositler bu etkiyi lokal olarak koagülasyon faktörlerinde artış, koagülasyon faktörlerinin optimal fonksiyonu için gerekli yapısal değişikliklerin sağlanması, koagülasyonda substratın taşınmasını kolaylaştırma ve koagülasyonun aktivasyonunu yalnızca hasar gören bölgede sınırlı tutma şeklinde gerçekleştirir (Heemskerk et al. 2002).

2.1.2.1. Koagülasyon Kaskadı

Pıhtılaşma, kanamanın durdurulması sırasında damar dışında; hiperkoagülasyon ya da tromboz sırasında ise, damar içinde meydana gelir. Pıhtılaşma mekanizması bir çağlayana benzetilir ve pıhtılaşma faktörleri adı verilen, çoğu birer plazma proteini olan, doğal maddelerin kendi aralarında belirli bir hiyerarşik düzene göre etkileşimleri sonucu oluşur (Davie et al. 1964, MacFarlane et al. 1994) (Çizelge 2. 1).

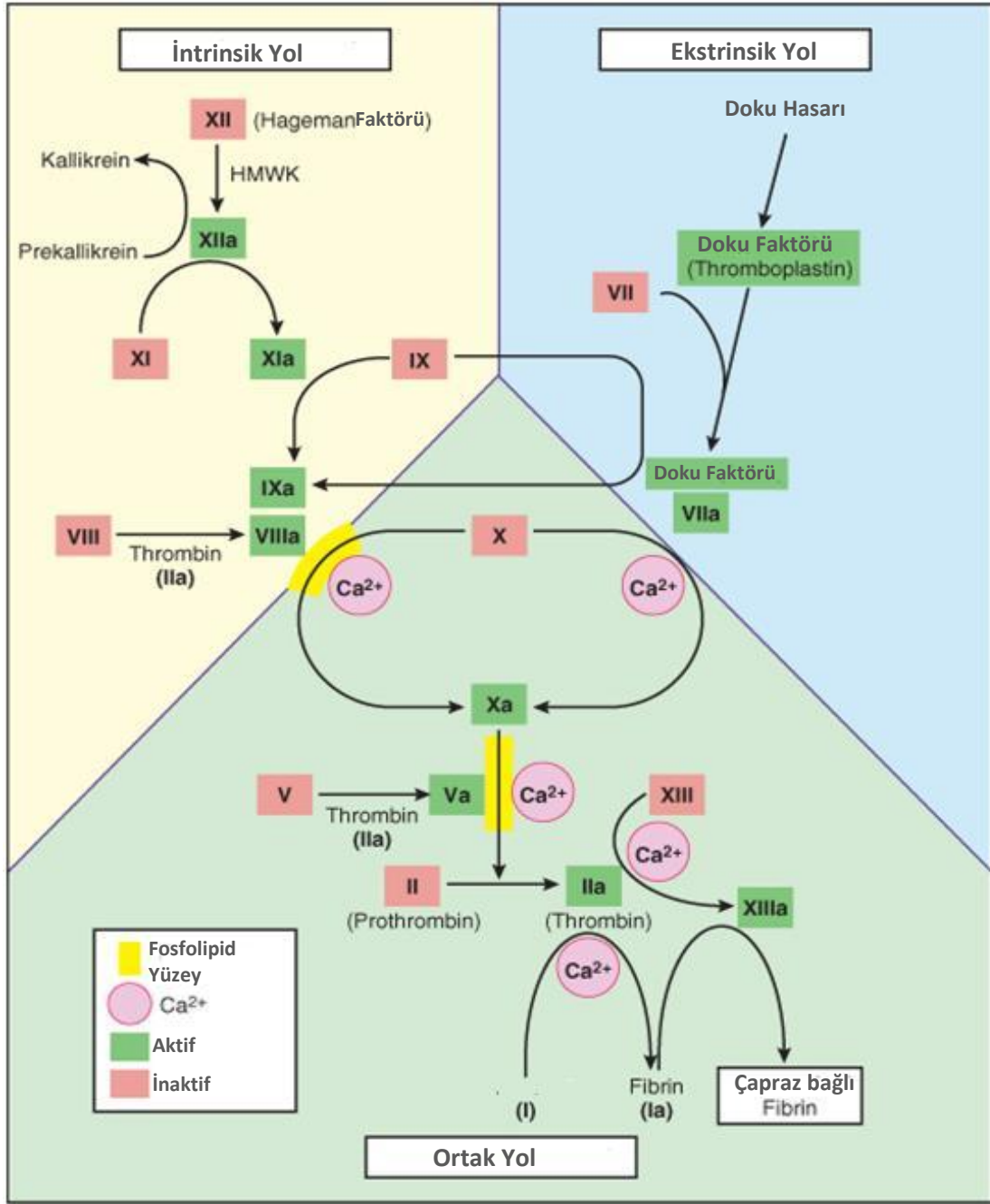
Çizelge 2. 1. Pıhtılaşma faktörleri (O’Shaughnessy 2005)

<i>Adlandırma</i>	<i>İsim</i>	<i>Fonksiyon</i>	<i>Yarı-ömür (saat)</i>
Factor I	Fibrinojen	Fibrin öncüsü	90
Factor II	Protrombin	Serin proteaz	65
(Factor III)	Kalsiyum	Kofaktör	
(Factor IV)	Doku faktörü	Koagülasyonun başlaması	
Factor V	Proakselerin	Protrombinaz kompleksi kofaktörü	15
Factor VII	Prokonvertin	Koagülasyonun başlaması	5
Factor VIII	Antihemofilik faktör	Tenaz kompleksi kofaktörü	12
Factor IX	Christmas faktörü	Serin proteaz	24
Factor X	Stuart-Prower faktörü	Serin proteaz	40
Factor XI	Plazma tromboplastini öncüsü	Koagülasyonun büyümesi	45
Factor XII	Hageman faktörü	Temas faktörü	50
Factor XIII	Fibrin sağlamlaştırıcı faktör	Fibrinin çapraz bağlanması	200
Prekallikrein	Fletcher faktörü	Temas faktörü	35
Yüksek moleküler ağırlıklı kininogen	Fitzgerald faktörü	Temas faktörü	150

Pıhtılaşma faktörleri I’den XIII’e kadar Romen sayıları ile numaralandırılır. von Willebrand faktörü (vWF) hariç bütün faktörlerin yapım yeri karaciğerdir. Dolaşan kanda FVIII’i taşıyan ve stabilize ederek degradasyonunu önleyen vWF, endotel hücreleri ve megakaryositlerde yapılır. Karaciğerde bazı faktörlerin sentezinde K vitamini gereklidir. FII, FVII, FIX ve FX’ a “protrombin grubu pıhtılaşma faktörleri” de denir. Pıhtılaşmanın “doğal” inhibitörlerinden olan Protein C (PC) ve Protein S (PS) sentezi de K vitaminine bağımlıdır. Pıhtılaşma faktörlerinden bazıları proenzim, bazıları enzim, bazıları substrat, bazıları da kofaktör olarak işlev görürler. Bir dizi proenzim ya da inaktif faktör (zimojen) ardı sıra aktive olarak etkin enzimleri doğururlar. Bazı aktive edilmiş faktörler, aktive olmuş trombositlerin negatif yüklü fosfolipid yüzeylerinde Ca⁺⁺ iyonlarının yardımı ile büyük kompleksler yaparlar.

Kan pıhtılaşması, trombin enziminin oluşması ve bu enzimin solübl halde bulunan fibrinojen'i (Faktör I) parçalayarak katı haldeki fibrin pıhtısına çevirmesi şeklinde özetlenebilir (Mann et al. 1993, Furie et al. 1992). Normal koşullarda dolaşan kanda trombin yoktur. Kanda proenzim şeklinde Protrombin (FII) bulunur. Protrombin'in trombin'e çevrilebilmesi için öncelikle Faktör X'un aktive edilmesi gerekir (FXa). Eskiden FX'un, ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere birbirlerinden bağımsız iki ayrı yolla aktive edildiği kabul edilirdi (Şekil 2. 5).

Bugün için koagülasyon mekanizmasının, transmembran bir protein olup, hücre bütünlüğü bozulunca kanla temas eden doku faktörünün, FVII' yi aktive ederek başladığı (ekstrinsik yol) görüşü hâkimdir (Bungay et al. 2008). Ekstrinsik yol, damar duvarı zedelenmesi (endotel lezyonu) sonucu açığa çıkan doku faktörü (TF)' nün pıhtılaşmayı başlattığı yoldur. Pıhtılaşma testlerinden protrombin zamanı (PT) bu yolu ölçer. Bu yolda TF, FVII ve ortak yoldan FX, FV, FII (protrombin) ve FI (fibrinojen) yer alır.

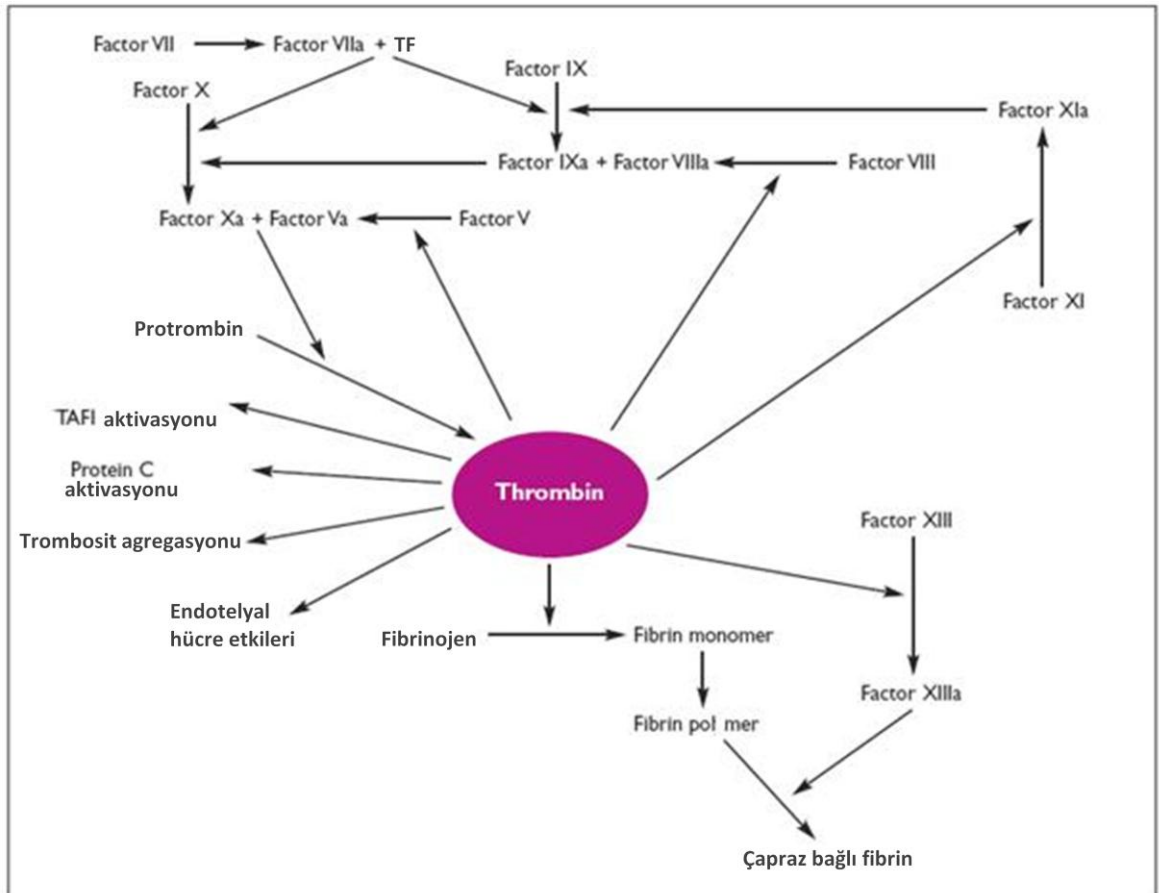


Şekil 2. 5. Koagülasyon kaskadı (Kumar 2007)

İntrinsik yol ise, doku faktörü işe karışmadan, negatif yüklü yabancı yüzeylerle (örn. endotel altında bulunan kollajen lifleriyle) temas sonucu bazı faktörlerin aktivasyonu ile başlayan yoldur. Bu faktörlere (aktivasyon sırasına göre FXII, prekallikrein ve yüksek molekül ağırlıklı kininojen) “temas faktörleri” adı verilir. *In vivo* hemostazda bu faktörlerin önemli bir rol oynamadıkları anlaşılmıştır. Konjenital eksikliklerinde pıhtılaşma zamanının çok uzamasına karşın, hastalarda kanama belirtileri görülmez. Temas

faktörlerinin pıhtılaşmadan çok inflamasyon olaylarında rol aldıkları düşünülmektedir (Esmon 2003). İntrinsik yolu ölçen pıhtılaşma testi aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) 'dır. Bu yolda temas faktörleri dışında, FXI, FIX, FVIII ve ortak yoldan FX, FV, FII (protrombin) ve FI (fibrinojen) yer alır. Tam kan pıhtılaşma zamanı da intrinsik yolu ölçen bir testtir. Ancak; duyarlı olmadığından uzun yıllar önce yerini aPTT'ye bırakmıştır. Kan pıhtılaşmasının iki farklı yol üzerinden başladığı görüşü eski pıhtılaşma modelini tanımlamasa bile, PT ve aPTT testleri tanı koymak için hala kullanılmaktadır.

Klasik pıhtılaşma modelinin dışında, intrinsik yolak ile birlikte değil yalnızca ekstrinsik yolağı başlatan, hasarlı dokudan TF salınımı ile gerçekleştiği düşünülen daha yeni bir koagülasyon modeli belirlenmiştir. Bu modelde, trombin koagülasyon modelinin merkezindedir. Trombin üretimini düzenleyen ve kontrol eden tüm sistemler, hasarlı bölgede kesin bir pıhtı formunun oluşabilmesi için iç içe besleme (feed-into) mekanizması ile organizedir (Perez-Gomez et al. 2007, Hoffman et al. 2007) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Yeni koagülasyon kaskadı modeli (Lefkowitz BJ 2007)

Pıhtılaşma yolağının daha iyi anlaşılması ve koagülasyonda rol olan proteinlerin tam olarak algılanması için, klasik intrinsik ve ekstrinsik yolların yer aldığı pıhtılaşma modeli daha açıklayıcı durumdadır.

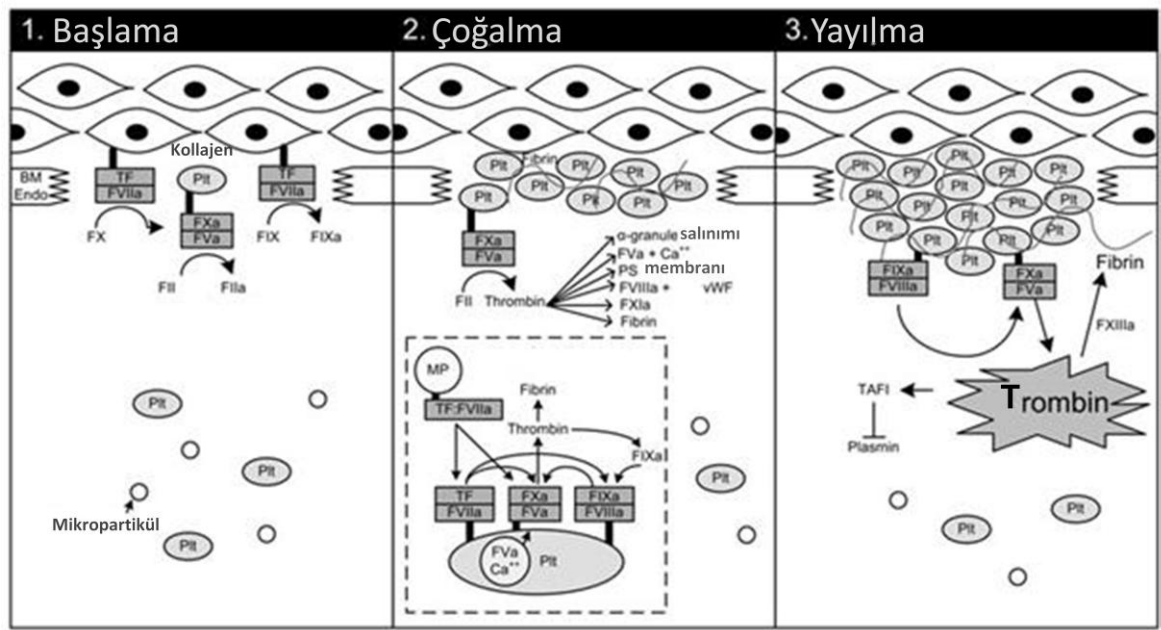
Pıhtılaşma sürecinin ilerleyebilmesi için, doku faktörü taşıyan hücrelerde ya da bu hücrelerin yakınında, trombositleri ve bazı pıhtılaşma faktörlerini aktive etmeye yetecek derecede trombinin oluşması gerekir. Doku faktörü (TF), 47 kDa ağırlığında, FVII' e karşı yüksek affiniteye sahip, hücresel bir transmembran glikoproteinidir. FVII ve VIIa için kofaktör rolü oynar (Morrisey 2001). Damarların adventisya katmanında (fibroblastlar), epidermis, stroma ve glia hücrelerinde bulunur. İstirahat halindeki endotel hücrelerinde belirmez. Endotoksin ya da sitokinlerle (IL-1, TNF- α) aktive olmuş endotel hücrelerinden TF salınabilir. Damar duvarının medya katmanı ya da kolajen ile temas eden monositler de sitokinlerin etkisi ile TF salabilirler. Ayrıca TF'nün kanda, özellikle inflamasyon ve apoptoz durumlarında, hücre membranı vezikülleri şeklinde bulunabileceği gösterilmiştir. TF'nün kanda solübl şekilde dolaştığı da kanıtlanmıştır.

“Ekstrinsik pıhtılaşma yolu” dendiğinde, damar duvarı lezyonu sonucu açığa çıkan doku faktörünün (TF) pıhtılaşmayı başlattığı yol anlaşılır. FVIIa/TF kompleksi, kan pıhtılaşmasını başlatan en önemli öğedir. Damar duvarında bir lezyon olduğunda, endoteli çevreleyen dokulardan açığa çıkan TF kanla temas olanağı bulur. Dolaşan kandaki FVII hızla TF'ne bağlanarak aktive olur ve ikisi birlikte bir kompleks oluştururlar (FVIIa/TF). Lezyon yerindeki TF taşıyan hücrelere sınırlı kalan FVIIa/TF kompleksi iki önemli reaksiyonu başlatır. Hem FX'u, hem de intrinsik yoldaki FIX'u aktive ederek FXa ve FIXa'yı oluşturur (Mann et al. 1998, Rauch et al. 2000).

FIXa ve FXa, hücreler tarafından taşınan veya sıvı faza difüze olmuş TF ile ilişkide kalırlar. Aktive olmuş trombositler tarafından sağlanan negatif yüklü fosfolipit yüzey, birçok pıhtılaşma faktörü ve enzim-kofaktör kompleksi için trombosit membranındaki potansiyel bağlanma bölgesidir. Oldukça etkili olan bu kompleksler, pıhtılaşma sisteminin etkili bir şekilde yayılması için hayati öneme sahiptir (Kalafatis et al. 1994, Zwaal et al. 1998, Stenflo 2001). TF taşıyan hücrelerde oluşan FXa, kofaktörü FV (FVa) ile birlikte protrombini trombine çevirecek protrombinaz ara kompleksini meydana getirir (Krishnaswamy et al. 1993). Çok az miktarda FV'in, FXa tarafından ya da koagülasyonla ilgili olmayan hücresel proteazlar tarafından aktive edildiği düşünülür. Protrombinaz kompleksinin oluşumu için aktive trombositlerin sağladığı fosfolipid (PL) yüzeyine de

gerek vardır ancak deneyler TF ortamında trombositler olmadan da eser miktarda trombinin oluşabileceğini göstermiştir.

FVa ve fosfolipid eksikliği nedeniyle son derece az miktarda oluşan trombinin fibrinojeni fibrine parçalaması güçtür. Ancak bu ilk oluşan trombin, trombositleri (PLT) ve bazı pıhtılaşma faktörlerini (FV, FVIII, FXI) aktive ederek pıhtılaşmanın büyümesine (amplification) ve yayılmasına (propagation) neden olur. Bir anlamda trombinin oluşturduğu tüm sistemde “patlama” yapar (Şekil 2. 7).



Şekil 2. 7. Pıhtılaşmanın üç basamağı (Adams et al. 2009)

İlk oluşan ürün trombin, yine aktive edilmiş trombositlerin fosfolipid (PL) yüzeyinde FXI'i aktive eder. Böylece, intrinsik yoldan FXIIa'nın FXI'i aktive etmesine gerek kalmaz. Oluşan FXIa ise, FIX'un aktivasyonunu artırır. Dolayısıyla FX'u aktive edecek ara makromoleküler kompleksin (tenaz) oluşumunu hızlandırır. FXI aktivasyonu trombin oluşumunu destekleyen bir mekanizmadır.

TF'ün açığa çıktığı damar lezyonu bölgesine trombositlerin tıkaç yapmak üzere gelmiş olmaları (trombosit aktivasyonu, adezyonu, agregasyonu ve sekresyonu) pıhtılaşmaya kolaylıkla katılmalarını sağlar. Aktive olmuş trombositlerde, iki tabakalı trombosit membranının iç yaprakçığında bulunan fosfolipid (PL) fosfatidil serin'in bir tür takla

atarak dışa çıkması aktive pıhtılaşma faktörlerinin (Va, VIIIa, IXa) bu yüzeye bağlanmasını kolaylaştırır. Trombositlerin sağladığı fosfolipid (PL) (fosfatidil serin) yüzeyinde FVIIIa, FIXa ve Ca⁺⁺ tarafından oluşturulan makromoleküler ara kompleks (tenaz) FX'u aktive eder (Fay 2004).

Protrombinaz ve tenaz kompleksleri, trombositlerin sağladığı fosfatidil serin (PL) yüzeyinde fibrinojeni pıhtıya çevirebilecek şiddetli bir trombin patlamasına yol açar. Trombin güçlü bir proteolitik enzimdir ve fibrinojen molekülünden önce iki peptidi ayırır (fibrinopeptid A ve B) ve geriye fibrin monomerleri kalır. Daha sonra bu monomerler polimerleşerek fibrin(s) oluşur (s:soluble) ancak bu fibrin sağlam bir pıhtı değildir. Trombin tarafından aktive edilen FXIII, Ca⁺⁺ ile birlikte fibrin polimerlerini çapraz bağlarla bağlayarak pıhtıyı mekanik yönden sağlamlaştırır [fibrin(i), (i:insoluble)]. Konjenital FXIII eksikliğinde göbek kordonundan kanama ve yaraların geç iyileşmesi sık görülen bulgulardır (Ichinose 2001) .

Trombin aynı zamanda, pıhtıyı plazmin aracılı fibrinolizisten koruyan, trombin ile aktive edilen fibrinoliz inhibitörü (TAFI) 'ni de aktive eder. TAFI, fibrin pıhtısından lizin rezidülerini proteolitik olarak çıkarır ve bu durum plasminojenin fibrine bağlanma bölgelerini uzaklaştırarak, fibrin pıhtısının, plazmin aracılı gerçekleşen lizisinin etkinliğini azaltır (Bouma et al. 2004).

Kanın 1 mL'sinde vücuttaki tüm fibrinojeni 10-15 saniyede fibrine çevirmeye yetecek güçte bir pıhtılaştırıcı potansiyel vardır. Trombosit tıkaçı ve fibrin pıhtısının sadece lezyon yerinde sınırlı kalarak ilerlememesi ve kanın sıvı durumunun korunması çok ince ve ayrıntılı bir şekilde çalışan inhibitör (antikoagülan) mekanizmalarla sağlanır.

2.1.2.2. Koagülasyonun Sınırlandırılması ve Antikoagülan Yol

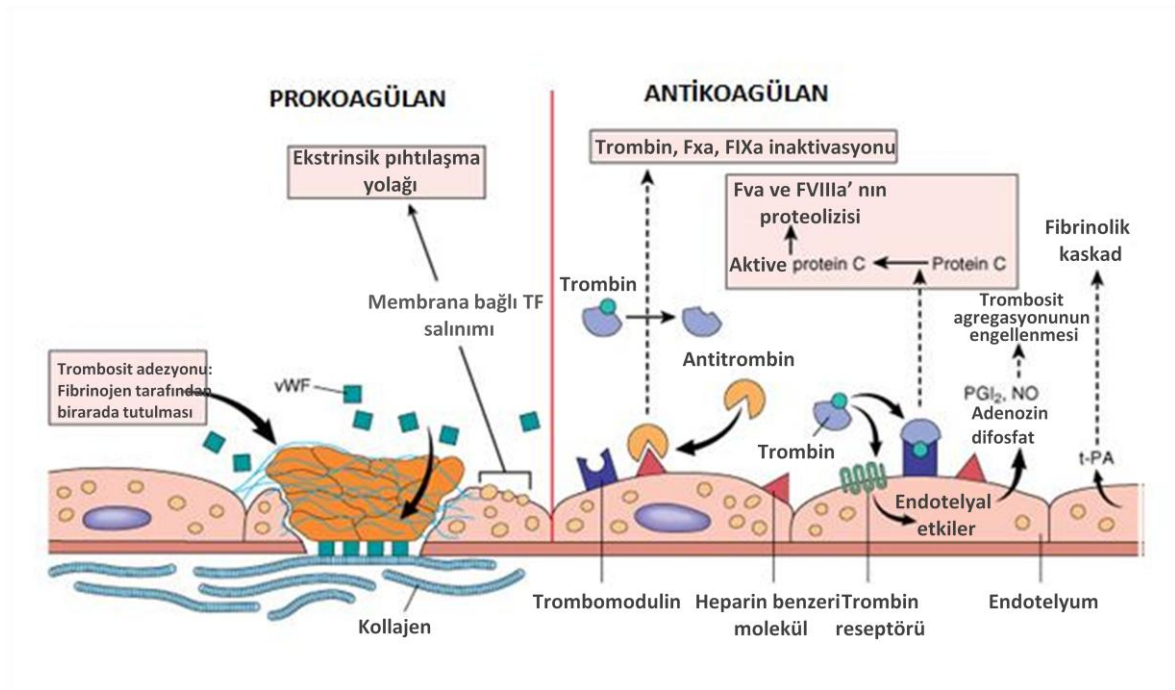
Prokoagülan sistemlerin yanı sıra, her aktivasyonu denetleyen, frenleyici bir inhibitör mekanizma mevcuttur. Damar duvarı lezyonu ile başlayan pıhtılaşma hücre yüzeylerinde gelişir ve sınırlandırılır, bu hücreler endotel hücreleri ve trombositler' dir. Endotel hücresi pıhtılaştırıcı (prokoagülan) maddeler (örn. doku faktörü), inhibitör (antikoagülan) maddeler (örn. glikozaminoglikanlar, doku faktörü yolu inhibitörü) yapar ve salgılar. Ayrıca yüzeyindeki reseptörler'le (örn. trombomodulin, endotel hücresi protein C reseptörü)

inhibisyon olaylarına katılır. Fibrinolitik sistemin bileşenlerinden olan, doku plazminojen aktivatörleri (tPA ve uPA) ve inhibitörleri (PAI-1) de endotel hücreleri kaynaklıdır. Hemostaz tıkanmasının oluşması sırasında, çeşitli uyarılarla aktive olan trombositler'in yüzeyleri pıhtılaştırıcı (prokoagulan) bir nitelik kazanır (<http://www.kanbilim.com/kanPih.htm>) (Şekil 2. 8).

Koagülasyonu aktive eden her yol aynı seviyede bir inhibitör sistemle kontrol altında tutulmakta, bu şekilde hemostatik mekanizmanın sadece hasar bölgesinde aktive olması ve tamir süreci tamamlandıktan sonra zarar gören vasküler yapının dolaşıma açılması mümkün hale gelmektedir.

Organizmada üç ayrı "doğal" inhibitör sistemi trombin oluşumunu frenler ve tümü vasküler endotel sistemle ilişkilidir. Bunlar;

1. Doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI),
2. Antitrombin (AT)
3. Protein C (PC)-Protein S (PS) sistemi' dir.



Şekil 2. 8. Vasküler endoteldeki antikoagulan sistemlerin gösterimi (Kumar 2007)

Bunların dışında, pıhtılaşmayı önleyen başka denetim yolları da vardır. Damarlardaki kan akımı yerel olarak oluşmuş aktive pıhtılaşma faktörlerini ve ara ürünleri (kompleksleri) seyreltir. Ayrıca aktive olmuş faktörler ve ara kompleksler retikuloendotelial sistem, özellikle karaciğerdeki makrofajlar tarafından temizlenir. Dolaşıma karışmış doku faktörü

(TF) partikülleri de yine karaciğer tarafından ortadan kaldırılır. Sonunda, fibrinolitik sistem (plazminojen-plazmin sistemi) yerel fibrin birikintilerini eritir ve yara iyileşmesi ile birlikte damar duvarı yeniden şekillenir (<http://www.kanbilim.com/kanPih.htm>).

1. TFPI

TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) ekstrinsik yolun ana inhibitörüdür (Broze 1995, Kato 2002) . Başlıca endotel hücreleri tarafından sentezlenir. Büyük bölümü endotel hücrelerinin yüzeyindeki heparan sülfata bağlıdır. Plazmada TFPI'nin önemli bir kısmı lipoproteinlere bağlı olarak dolaşır. İnhibitör etkiyi az miktardaki serbest TFPI gösterir. Farmakolojik heparin endotel hücrelerindeki TFPI'yi açığa çıkartır ve plazmadaki inhibitör düzeyini yükseltir. TFPI'nin faktör Xa ve FVIIa/TF kompleksini inaktive etmesi iki aşamada olur. Birinci aşamada TFPI, FXa'ya bağlanarak FXa'yı inaktive eder, daha sonra TFPI-FXa kompleksi, Ca⁺⁺ ile birlikte TF-FVIIa kompleksine bağlanarak bu yapıyı inaktive eder. Özetle, inhibisyonu dörtlü bir kompleks (TFPI-FXa-TF-FVIIa) sağlar.

2. Antitrombin (AT)

Karaciğerde sentez edilen bir serin proteaz inhibitörüdür (serpin). AT yalnız trombini nötralize etmez. FXa, FIXa, FXIa ve FXIIa gibi diğer serin proteazları da inaktive eder. FXa inhibisyonu, heparin tedavisi yönünden önemlidir. *In vivo* koşullarda, damar duvarındaki heparine benzer etkiye sahip glikozaminoglikanlar (GAG) (örn. heparan sülfat) AT üzerinden pıhtı oluşumunu engellerler. AT'nin konjenital ve edinsel eksikliklerinde, klinikte venöz tromboza eğilim görülür. Yine karaciğerde yapılan heparin kofaktör II de dermatan sülfat ve heparinin etkisiyle yalnızca trombini inhibe eden bir diğer serpindir (van Boven et al. 1997, Weitz 2003).

3. Protein C (PC)

Protrombin grubu pıhtılaşma faktörleri gibi (faktör II, VII, IX, X), PC de K vitaminine bağımlı olarak karaciğerde yapılır. PC kanda inaktif şekilde dolaşır. PC'nin aktive olabilmesi için, trombinin endotel yüzeyinde yer alan trombomodulin reseptörü ile

birleşmesi gerekir. Endotel yüzeyindeki *PC* reseptörünün (EPCR) de rol aldığı bu birleşme sonucu, trombin prokoagulan etkinliğini yitirerek antikoagulan bir işlev kazanır ve trombositlerin fosfolipid (fosfatidil serin) (PL) yüzeylerinde *PC*'yi aktive eder (APC). Aktive Protein C (APC), kofaktör işlevi gören Protein S (PS) ile birlikte FVa ve FVIIIa'yı parçalayarak inaktive eder (Dahlback 2001, Dahlback et al.2004, Esmon 2003).

APC ayrıca endotel hücrelerinde plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) yapımını baskılar. Bu etkisiyle, sonuçta, doku plazminojen aktivatörünün (t-PA) açığa çıkışını, bir başka deyişle fibrinolizi uyarmış olur. PS, K vitaminine bağımlı olarak karaciğerde yapılır. Endotel hücresi de PS sentez edebilir.

2.1.2.3. Fibrinolitik Sistem

Pıhtılaşmada nasıl bir proenzim olan protrombin, fibrin pıhtısını oluşturacak trombin'e çevriliyorsa, fibrinolitik sistemde de, aynı şekilde bir proenzim olan plazminojen, aktivatörlerin etkisiyle fibrin pıhtısını eritecek plazmin'e dönüşür. Plasmin, fibrini spesifik lizin ve arjinin rezidülerinden keserek, fibrin degradasyon ürünlerinin oluşumuna neden olur (Greer 2004). Pıhtılaşmada olduğu gibi, burada da aktivasyon reaksiyonlarını frenleyen inhibitör mekanizmalar (plazminojen aktivatörü inhibitörleri, antiplazminler) işe karışacaktır. Bunların dışında trombin, oluşmaya başlayan fibrin pıhtısının erken erimesini engellemek için, son yıllarda önem kazanan yeni bir inhibitörü (TAFI: thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) devreye sokacaktır. Trombüs içindeki fibrin, t-PA' nın aktivasyonu için en önemli tetikleyicidir. t-PA, trombüs varlığı ile aktive olunca, inaktif bir enzim olan ve karaciğerde sentezlenen plazminojen, aktif formu plazmine dönüşür. Ürokinaz tipi plazminojen (u-PA) ise, fibrinden bağımsız bir şekilde aktive olur. t-PA ve u-PA, endotel hücreleri ve aktive trombositlerden salınan plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) tarafından inhibe edilmektedir (Sprengers et al. 1987). PAI-2 ise, u-PA' yı, t-PA'dan daha fazla inhibe edebilmektedir. Aktif bir enzim olan plazmin, fibrine bağlandığında major inhibitörü olan alfa2 antiplazminin inhibe edici etkisinden kurtulabilmektedir. Fibrine bağlı plazmin, çapraz bağları olan fibrini parçalayarak fibrin yıkım ürünlerini oluşturur. Fibrinolitik sistemi (plazminojen) aktive etme potansiyeli olan daha zayıf aktivatörler ise kallikrein, aktif FXI ve aktif FXII' dir. Endotel duvarında da tıpkı monositler ve makrofajlarda olduğu gibi u-PA ve Anneksin II reseptörü bulunur. Bu şekilde plazmin üretiminin etkinliği artırılır.

2.2. TROMBOZ

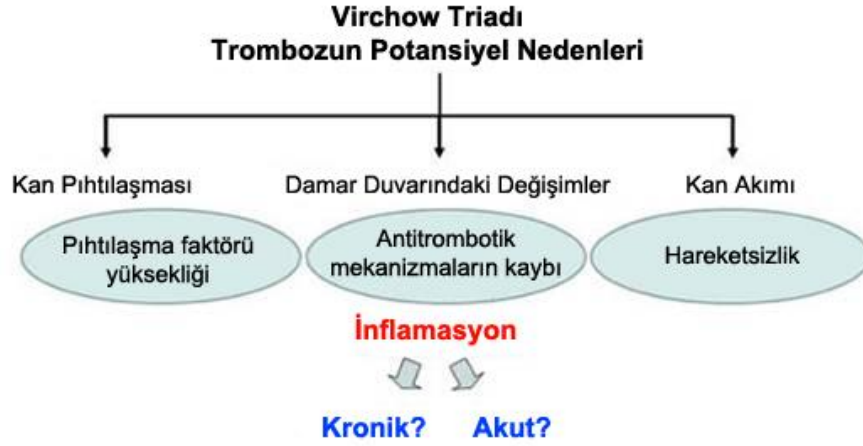
Trombofili (Thrombo-philia: trombozu sevme), tromboza eğilim yaratan tabloları tanımlamakta kullanılan bir terimdir. Trombofili, en yaygın olarak görülen kardiyovasküler hastalıklar arasında üçüncü sırayı almaktadır ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık 100.000 ölümün en büyük nedenlerinden biridir. Tromboz gelişimi multifaktöriyeldir. Çok sayıda edinsel ve kalıtsal faktörün değişik mekanizmalarla tromboz oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Middeldorp 2001).

Arteriyel ve venöz sistemde trombüs formasyonunun farklı olması, bu iki sistemde farklı etiyolojilerin rol oynadığını düşündürmektedir. Arteriyel sistemde endotel hasarı ve trombositlerin fonksiyonel bozukluklarının önemli rol oynadığı, venöz sistemde ise daha çok staz ve pıhtılaşma sistemine ait bozuklukların tromboz gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Gerçekten şimdiye dek tanımlanan kalıtsal trombofilik sendromların büyük bir kısmında venöz tromboz eğilimi olduğu belirlenmiştir.

Kardiyovasküler sistem içinde kanın pıhtı kitlesi oluşturmasına trombozis ve bu kütleye de trombüs adı verilir. Kan pıhtısı, zedelenmiş damarda ise, yaşam kurtarıcı; yaşamsal bir yapıyı besleyen damarda ise, yaşamı riske edicidir. Ortaya çıkan trombüsün kısmen ya da tamamen parçalanması ve akımla uzak bölgelere gitmesi emboli ile sonuçlanır. Tromboz ve emboli bu nedenle yakından ilişkilidir ve genellikle tromboemboli teriminin kullanılması bu olayları belirtir. Venöz trombüs, kan akımının yavaş olmasından dolayı veya primer hastalık nedeniyle proteinlerinin aktivasyonuna bağlı olarak meydana gelir. Bu olayda trombositlerin katkısı azdır ve damar çeperi genellikle normaldir. Arteriyel trombüs oluşmasında arter çeperinin, ateroskleroza bağlı lezyonlar (ateroskleroz plağının yırtılması ile ülser oluşması gibi) tarafından bozulmuş olması kuraldır ve olayın primer nedeni trombosit doku etkileşmesine bağlı olarak trombositlerin aktivasyonudur (Greenfield 1994).

Hemostaz mekanizmasında, pıhtı oluşumu ve fibrinolizis dinamik bir denge oluştururlar. Bu denge, dolaşım sisteminin yapısal içeriğinde bir bozulma oluşturduğu zaman, hastayı kanama veya pıhtılaşmanın ölüme götürmesini engeller. Birçok faktör bu dengeyi bozar (Paiement 1998).

Virchow, 1856 yılında; kan akımı, damar duvarındaki değişimler ve kandaki değişimlerin tromboza neden olduğunu varsayan bir triad (üçleme) öne sürmüştür (Şekil 2. 9). Bunlar, pıhtılaşma faktörlerinin yüksekliği, antitrombotik mekanizmaların kaybı ve stazdır.



Şekil 2. 9. Virchow triadı (Esmon 2009)

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, tromboza neden olduğu düşünülen bu değişimlerin ortaya çıkmasının altında yatan nedenlerin anlaşılmasını sağlamıştır. Genetik olarak manipüle edilmiş fare modellerini kapsayan çalışmalar ve insan epidemiyoloji çalışmaları, özellikle venöz tromboza neden olabilecek genetik risk faktörlerini ortaya çıkarmıştır (Aird 2007, Lane et al. 2000).

Genetik mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan trombofilik hastalıklar, iki kategoriye ayrılabilir. Birincisi, Protein C, Protein S ve Antitrombin (AT) gibi doğal antikoagülan proteinlerin eksikliğine neden olan mutasyonlar sonucu ortaya çıkan fonksiyon kaybına; ikincisi ise, Faktör V Leiden ve Protrombin G20210A mutasyonunu gibi prokoagülan proteinleri etkileyen mutasyonlar sonucu meydana gelen fonksiyon kazanımına bağlı hastalıklardır (Bertina 1999, De Stefano et al. 1996, Seligsohn et al. 2001).

Pıhtılaşmanın doğal inhibitörleri olan Protein C, Protein S ve Antitrombin' de ortaya çıkabilecek bir eksiklik, aşırı trombin üretimi ile sonuçlanabilir ve bu durum, hemostaz dengesinin pıhtı oluşumu yönüne kaymasına neden olabilir. Protein C sistemini etkileyen, Faktör V Leiden, genin 1691. nükleotitinde meydana gelen G-A değişimi (Arg506Gln) sonucu ortaya çıkar ve neden olduğu amino asit değişimi, aktive protein C (APC)' nin

kesim bölgelerinden birinde yer alır (Bertina et al. 1994). Bu nedenle aktif FV molekülü, APC tarafından normalden 10 kat daha yavaş bir şekilde inaktive edilir ve bu durum trombin artışına neden olur (Heeb et al. 1995) . Kalıtsal trombozun en sık rastlanan ikinci nedeni, protrombin geninin 3' UTR 'da bulunan 20210 G-A gen değişimidir. Bu mutasyon ise bir amino asit değişimine neden olmasa bile, proteinin fazla sentezlenmesi sonucu, protrombin düzeylerinin artması ile ilişkilendirilmiştir (Poort et al. 1996). Kalıtsal trombofili nedenlerini genetik olarak taşıyan bireylerde tromboz riski artmakla birlikte, yaşamları boyunca hiç bir trombotik atak geçirmemeleri de mümkündür.

Edinsel risk faktörleri olarak değerlendirilen oral kontraseptif kullanımı, tromboz riskini önemli ölçüde artırırken, kanser ve yaş da tromboz oluşumuna katkı sağlamaktadır. Kanser, doku faktörü üretilmesiyle koagülasyona önyak olarak trombotik riski artırır. Yaş ise tromboz için en güçlü risk faktörlerindedir (Esmon 2009) (Çizelge 2. 2).

Çizelge 2.2. Venöz tromboza neden olan risk faktörleri (Rosendaal et al. 2009)

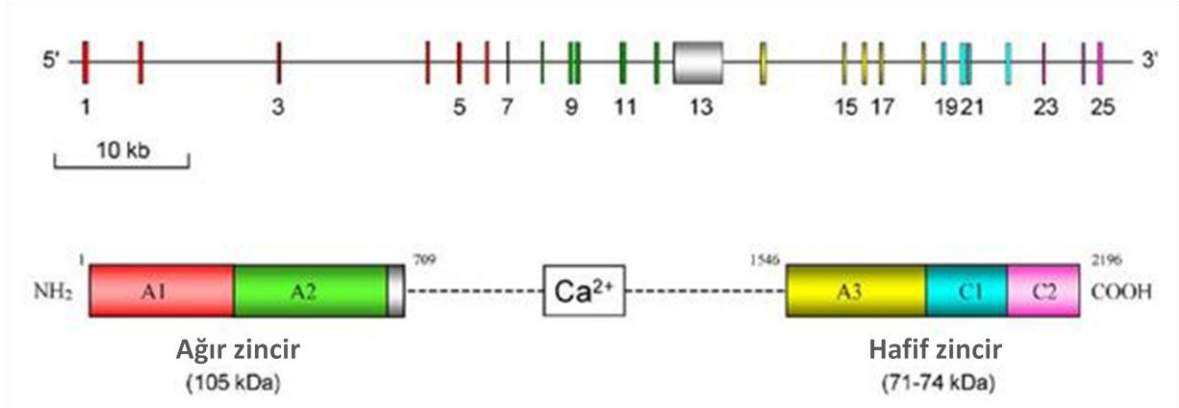
<i>Edinsel</i>	<i>Kalıtsal</i>	<i>Karma/Bilinmeyen</i>
Hareketsizlik	Antitrombin eksikliği	Yüksek FVIII düzeyleri
Alçı	Protein C eksikliği	Yüksek FIX düzeyleri
Travma	Protein S eksikliği	Yüksek FXI düzeyleri
Major cerrahi	FVL	Yüksek fibrinojen düzeyleri
Ortopedik cerrahi	Protrombin 20210A	Yüksek TAFI düzeyleri
Tümör	Disfibrinojenemi	Düşük TPII düzeyleri
Doğum kontrol hapları	FXIII 34val	FVL bulunmadığında APC direnci
Hormon tedavisi	Fibrinojen 10034T	
Antifosfolipid sendromu	O dışındaki kan grupları	Hiperhomosisteinemi
Miyeloproliferatif hastalıklar		Yüksek PCI düzeyleri
Polisitemi		
Santral venöz kateterler		
Yaş		
Obezite		

TAFI, Trombinle aktive olan fibrinoliz inhibitörü TFPI, Doku faktörü yolağı inhibitörü PCI, protein C inhibitör; PAI-3, plasmino en-aktivator inhibitör-3.

2.3. KOAGÜLASYON FAKTÖRÜ V (FV)

Koagülasyon faktör V (FV), karaciğer ve megakaryositlerden sentezlenen, plazmada dolaşan, kısmen trombositlerde depolanan, 330 kDa ağırlığında büyük ve asimetric bir glikoproteindir. FV, kısmi proteolizle aktive olduğunda, FXa'ya bağlanarak, protrombini trombine dönüştüren, protrombinaz kompleksinde ve FVIII'in, Protein S ile birlikte APC tarafından inaktivasyonunda kofaktör görevi görür. A1-A2-B-A3-C1-C2 domainlerinden meydana gelen FV, yine APC tarafından inaktive edilen FVIII ile B domani hariç yaklaşık

%40 oranında homoloji gösterir. 25 ekzon ve 24 introndan oluşan Faktör V geni, 1.kromozomun uzun kolunda (1q23) lokalize olur (Mann et al. 2003, Nicolaes et al. 2002) (Şekil2.10).



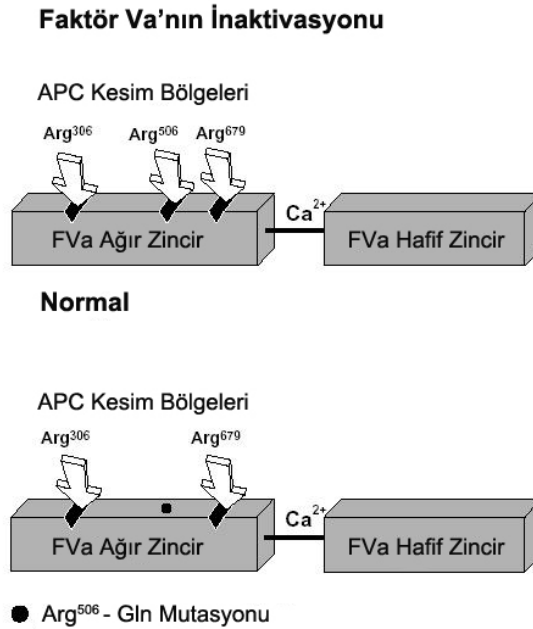
Şekil 2.10. FV geni ve aktif FV proteinin fonksiyonel domainleri (Duga et al. 2004)

1992’de izole edilen gen, 2224 aminoasit kodlar ve öncü protein yapısında 28 rezidüden oluşan ve kodlanan proteinin endoplazmik retikuluma gitmesini sağlayan bir sinyal peptit yapısı bulunmaktadır. Altı kısımdan oluşan proteinin, B domainin proteolitik aktivite sonucu uzaklaştırılması ile Ca^{2+} iyonu ve kovalent olmayan iki bağın bulunduğu aktive FV (FVa) proteini meydana gelir.

FV’ in sentezi ve degradasyonu, proteinin iki yönlü gerçekleştirdiği biyolojik fonksiyonu ile ilişkilidir. Proteinin %80’i plazmada bulunurken, geriye kalan %20 ’lik kısmı ise trombositlerin α granüllerinde saklanır. FV, trombin tarafından, üç arjinin rezidüsünün (Arg709, Arg1018 ve Arg1545) kısmi proteolizisi sonucunda aktif FV molekülüne dönüşmeden, herhangi bir intrinsik prokoagulan aktivite göstermez. Bu süreç sonunda, B domainin uzaklaşmasıyla meydana gelen FVa, 105 kDa ağırlığındaki bir ağır zincir ve 74/71 kDa ağırlığına sahip hafif zincirden oluşur ve bu iki zincir Ca iyonu hidrofobik etkileşimler ile bir arada tutulur (Mann et al. 2003, Nicolaes et al. 2002). Hafif zincirdeki bu ağırlık farklılığı, proteinin C2 domainindeki kısmi glikolizasyon sonucunda ortaya çıkar, glikozillenen FV1 ve glikozillenmemiş FV2 molekülleri kanda, yaklaşık olarak 30: 70 oranında bulunur (Nicholaes et al. 1999). FVa ile birlikte, Ca^{2+} varlığında bir araya gelen FXa, protrombinaz kompleksini meydana getirir ve protrombinin aktivasyonunu 300.000 kat artırır. Glikozillenmiş FV formu (FV1), trombositlerdeki fosfolipit

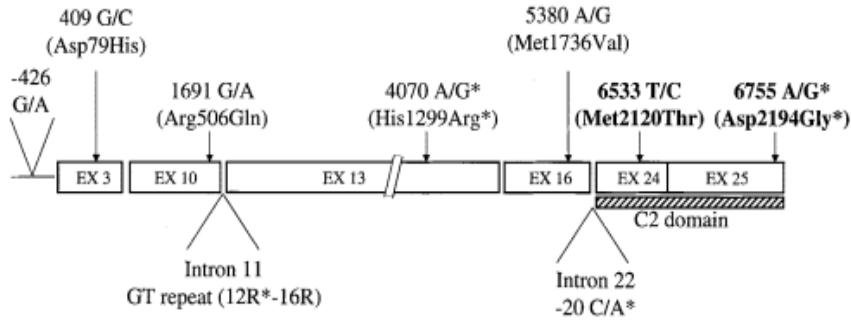
membranları için FV2' ye göre daha yüksek bir affinite gösterirken, trombin üretimi için de daha yüksek bir kofaktör aktivitesi sergiler (Nicholaes et al. 1999). FV, negatif yüklü fosfolipit yüzeylerinde, APC tarafından 506. Pozisyondaki Arjinin aminoasidinden kesilmesi ise, prokoagülan özelliklerini hemen hemen kaybetmiş bir antikoagülan proteine (FVac) dönüşür. FVac, APC' nin kofaktörü olarak, Protein S ile birlikte, membrana bağlı FVIIIa' nın APC tarafından degradesyonunda rol oynar.

FV molekülünde meydana gelebilecek defektler, proteinin iki farklı biyolojik fonksiyona sahip olması nedeniyle, kanama veya pıhtı oluşumu fenotipi ile sonuçlanabilir. Nadir rastlanan bir kanama hastalığı olan FV eksikliği, tip I ve tip II eksiklikler olmak üzere sınıflandırılabilir. Tromboz oluşumu ile ilgili daha çok araştırma konusu olan FV, kofaktör olarak Protein S'nin etkin hale getirdiği bir reaksiyonla, antikoagülan bir proteaz olan APC tarafından inaktive edilir. Kalıtsal trombofili nedenleri arasında büyük payı olan genin 10. ekzonunda bulunan 1691 G-A değişimi, 506. aminoasitte argininin glisine yer değiştirmesiyle sonuçlanır ve bu mutasyon, FV'in APC kesim bölgelerinden birinin kaybına yol açar (Bertina et al. 1994) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. FV molekülünün APC tarafından inaktivasyonu

APC direncine neden olan mutasyonun, Türk populasyonundaki sıklığı %8'dir (Akar 2009) . FV'in kompleks bir haplotipi olan HR2, gen üzerinde 13 farklı polimorfizm içerir (Lunghi et al. 1996). Haplotip, tek bir birim olarak kalıtımla geçen, birbirleriyle yakın bağlantılı gen gruplarının allel dizisini ifade eder. Haplotipe ait bu polimorfizmlerden yedisi aminoasit değişimine neden olurken, altısı yalnızca sessiz mutasyon sonucu baz değişimi ile sonuçlanır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. FV geni üzerindeki HR2 haplotipine ait polimorfizmlerin bir kısmı (Scavini et al. 2004)

FV geni R2 haplotipine ait olan mutasyonlardan biri, haplotipe adını veren, 13. ekzonunda bulunan 4070. nükleotidteki A (R1) – G (R2) değişimidir. Mutasyon sonucunda, FV' in, FVIII'in APC aracılı degradasyonundaki kofaktör aktivitesi azalır (Hoekema et al. 2001) ve daha prokoagülan bir form olan FV1' in oranının FV2' ye göre artması neden olur (Castoldi et al. 2000). Değişimin, Asya, Avrupa ve Afrika yerlileri arasındaki görülme sıklığı ise % 5 ila 17 arasındadır (Bernardi et al. 1999, Kotska et al. 2003). Mutasyonun Türk populasyonundaki sıklığı %8,5 olarak bulunurken (Akar et al.2000), Kıbrıs Türklerindeki sıklığı % 4,2 olarak belirlenmiştir (Yılmaz et al. 2001). Faktör V genine ait R2 haplotipindeki His1299Arg değişimine neden olan bu mutasyon, azalan FV aktivitesi ile birlikte, plazmadaki azalan faktör V düzeyleri ile de ilişkilendirilmiştir (de Visser et al. 2000). Ancak yapılan çalışmaların artması ile birlikte FV düzeylerinin azalmasından sorumlu değişimin FV R2 haplotipine ait C2 domainindeki Asp 2194 Gly, olduğu ekspresyon çalışmaları ile belirlenmiştir (Yamazaki et al. 2002). Haplotipe ait 4070 A-G değişiminin venöz tromboz riski ile ilişkisi konusunda yapılan çalışmalar birbirinden farklı

olsa da, mutasyonun APC direncine katkıda bulunduğu ve tromboz için hafif bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Alhenc- Gelas et al. 1999, Margaglione et al. 2002) . Bununla birlikte, haplotipe ait bu değişimin FVL ile birlikte bulunması durumunda hastalık için ortaya çıkan riskin, FVL' in tek başına taşınmasından daha fazla olduğu, birbirinden farklı popülasyonlar üzerinde yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Faioni et al. 1999, Akar et al. 2000).

2.4. MOLEKÜLER TEKNİKLER

2.4.1. Çözelti ve Solüsyonlar

Bu çalışmada, DNA izolasyonunda kırmızı kan hücrelerini parçalamak için; RBC (Red Blood Cell) lizis çözeltisi, proteinlerin DNA'dan uzaklaştırılması amacıyla fenol / kloroform karışımı ve polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında elde ettiğimiz ürünleri kontrol etmek için kullandığımız agaroz jeli hazırlamak için; TBE (Tris- HCl Borik asit EDTA) çözeltisi kullanılmıştır (Sambrook 1989) .

2.4.2. DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA'lar, kan örneklerinden proteinaz K, fenol / kloroform yöntemiyle izole edilmiş ve etanol ile muamele edilerek çöktürülmüştür.

2.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Rekombinant DNA teknolojisi 1970' lerin başında geliştirilmiş, bu konu ile ilgili araştırmalarda devrim yaratmıştır. 1986 yılında PCR adı verilen bir teknik geliştirilmiştir. Biyolojik araştırmalarda hızla yerini alan bu teknik, hücreden arındırılmış bir yöntem olarak, DNA klonlanmasını kolaylaştırmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) özel bir DNA dizisinin *in vitro* ortamda çoğaltılması yöntemidir. PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bu

yöntemin uygulanabilmesi için az miktarda DNA yeterlidir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotit primerin sentezi için kullanılır. Bu primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz, deoksिनükleotit trifosfatları (dNTP) kullanarak çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. Polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle Tris ve KCl) ayrıca önemli bir kofaktör olan Mg^{+2} iyonları gereklidir. PCR reaksiyonu temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır ve çoğaltılan ürünün miktarı, teorik olarak, bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır (Akar 1999).

İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır (90-95 C' de, yaklaşık 5 dakika süreyle). Sıcaklık 50 ila 70 C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA' ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotitlerdir (15-30 nükleotit uzunluğunda) ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere spesifik olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA' nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar. DNA polimeraz' ın ısıya dayanıklı bir şekli (sıcak su kaynaklarında yaşayan bir arke olan *Thermus aquaticus*' tan elde edilen enzim, *Taq polimeraz*) reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70 ila 75 C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi, nükleotitleri 5' den 3' üne doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA' nın iki zincirli kopyasını oluşturur. Bu üç basamaktan oluşan reaksiyon seti- çift zincirli ürünün tek zincirli hale getirilmesi (denaturation), primerlerin bağlanması (annealing) ve polimeraz enzimi ile zincirin uzaması (extension)- bir döngü olarak ifade edilir. PCR bir zincir reaksiyonudur çünkü, yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve pek çok kez tekrar edilir. Yirmibeş-otuz döngü sonunda, DNA miktarında yaklaşık bir milyon kez artma olur. İşlem, thermocycler (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntem ile, klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanmak üzere bol miktarlarda hedef DNA fragmentleri elde edilir (Öner 2000).

2.4.4. DNA' nın Enzimatik Kesimi

PCR ürünlerinin incelenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden biri, PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri ile kesilmesidir. Restriksiyon endonükleaz enzimleri uzun çift sarmal kısa DNA dizilimlerini spesifik olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır. Restriksiyon enzimleri DNA çift sarmalında kendilerine özgü tanıma dizilerini şeker ve fosfat omurgasından kırarlar ve bu şekilde DNA'yı manipüle etmek mümkün olur. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin esas fonksiyonu, dışarıdan bakteriye giren ve bazı özel gen veya belirteçleri taşıyan genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonlara engel olmak ve türleri genetik bakımından kalıcı kılmaktır. Bu enzimlerin tanıdığı bölgelerin büyük kısmı palindromiktir (sağdan sola veya soldan sağa aynı olan). Kesim sonrasında oluşan parçalar birbirine simetrikdir. DNA enzimler tarafından her zaman spesifik olarak kesilemeyebilir. Optimal olmayan pH, enzim konsantrasyonunun DNA' ya göre fazla olması, tuz konsantrasyonunun azalması gibi durumlarda ortaya çıkan bu durum, yıldız aktivitesi (star aktivitesi) olarak adlandırılır ve DNA' nın nonspesifik kesilmesi ile sonuçlanır. Bu etmenlerin düzeltilmesi ile enzimin spesifik olarak kesimi sağlanabilir (Akar, 1999).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Çocuk Genetik Bilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Hasta –kontrol şeklinde yapılan çalışmaya dahil edilen bireyler, 0-18 ve 70 yaş üzeri olacak şekilde iki farklı yaş grubuna ayrılmıştır. 0-18 yaş aralığında pediatrik inme tanısı konmuş 220 ve 70 yaş üzerinde trombozlu 181 birey hasta grubunu oluştururken, 0-18 yaş grubunda yer alan 191 ve 70 yaş üzeri grupta bulunan 211 sağlıklı birey ise ailevi tromboz öykülerinin de olmaması sonucunda kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Aynı zamanda sırasıyla 0-18 yaş ve 70 yaş hasta grubundaki 52 ve 38 bireyin, FVL ve PT 20210A değişimlerinden birini taşıdığı bilinmektedir. Bu mutasyonlardan birine sahip olduğu bilinen, kontrol grubunda 0-18 yaş grubunda 19, 70 yaş grubunda ise 30 birey bulunmaktadır. Hasta-kontrol çalışmasına ait bireylerden elde edilen DNA örneklerinin tamamı laboratuvarımızın DNA bankasından temin edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler ve aileleri çalışmanın konusu ve olası sonuçları hakkında bilgilendirilmiş, kendilerinden gönüllü olarak çalışmaya katıldıklarına dair aydınlatılmış onam formu alınmıştır.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan 1 ml 0.5M Etilendiamintetraasetikasilikli (EDTA) (Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 ml kan örneği alınır. Alınan kan örneği 50 ml.lik falkon tüp içerisinde 25 ml RBC(Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya) 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] eklenir, çalkalanarak 20 dk buzda bekletilir. Soğutmalı santrifüjde (Hettich, Almanya) +4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek, pellet üzerine tekrar 25 ml RBC Lizis solüsyonu eklenir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanmıştır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000 µL RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800 µL'si 35 ependorf tüpüne alınarak -20°C'de stok olarak

saklanır. Geriye kalan 200 µL bir eppendorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/mL olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu [10 mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100 mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1 mM pH: 8.0 EDTA (AppliChem, Almanya) eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Almanya) bekletilir. İkinci gün tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform(Merck, Almanya), izoamil alkol (Merck, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir eppendorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Türkiye) eklenir. Eppendorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilir. Üçüncü gün tüpler +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500 µL %70'lik alkol eklenir ve +4°C 4000 rpm'de 20dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında alkol dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüplerin içerisine Tris EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C veya -20°C 'de saklanır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

FV geni 4070 A-G değişiminin belirlenmesinde kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için yapılan PCR karışımında 500 mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH 8,3), 15mM MgCl₂ bulunur. dNTP karışımından 10mM stok hazırlanır (Çizelge 3. 1.)

Çizelge 3. 1. PCR için gerekli bileşenler ve konsantrasyonları

Bileşen	Reaksiyondaki Hacim	Konsantrasyon
Su	*	-
10X Taq Pol Buffer + (NH ₄) ₂ SO ₄	5 µl	1x

25 mM MgCl ₂ solüsyonu	2-8 µl	1.0 – 4.0 mM
dNTP karışımı	4 µl	800 µM
Primer 1	1-5 µl	0.2 – 1.0 µM
Primer 2	1-5 µl	0.2 – 1.0 µM
Kalıp DNA	*	< 1 µg/ reaksiyon
Taq Polimeraz Enzimi	0.25 µl	1.25 ünite/reaksiyon
Toplam Hacim	50 µl	

FV geni 4070 A-G değişimi için her biri 0,1 µg/ml konsantrasyonunda,

Forward: 5' - CAAGTCCTTCCCCACAGATATA -3'

Reverse: 5' - AGATCTGCAAAGAGGGGCAT-3' olmak üzere iki primer kullanılmıştır ve 703 baz çifti içeren bir bölge çoğaltılmıştır (Dizi 3.1).

FV geni 4070 A-G değişimi için polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 94°C'de 5dk, bunu izleyen 35 siklуста; 94°C'de 1 dk, 62°C'de 1dk, 72°C'de 2dk ve son siklуста 72°C'de 7 dk olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda 703 bç uzunluğunda oligonükleotit ürün elde edilmiştir. PCR ürünleri, %1'lik agaroz jele 5µl hacimde yüklenerek görüntülenmiştir (Şekil 4. 1).

CAAGTCCTTCCCCACAGATATA agtcaaatgtccccttctcagaacatgaagtctggcagacagtcattc
tccagacctcagccaggtgacctctctcagaactcagccagacaaacctctctcagacctcagccacacgactctctccag
aactcattcagagaaaccttccccagccctcggtcagatgccatttctccagacctcagccatacaacctttctccagacctcag
ccatacaacctttcttagacctcagccagacaaacctctctcagaactcagtcagacaaacctttctccagccctcggtcagatg
cccccttctccagacctcagccatacaacctttcttagacttccagacacaaacctctctcagaactcagccatagactctct
ccagaactcagtcagacaaaccttccccagccctcggtcagatgccatttctccagacctcagcc**A/G**tacaacctttcttag
acttccagccagacaaacctctctcagaactcagtcacaaaccttccccagccctcggtcagatgccctttctccagacccca
gccatacaacctttcttagacctcagccagacaaacctctctcagaactcagtcagacaaaccttccccagacctcagtgag
ATGCCCTCTTTGCAGATCT

Dizi 3. 1. FV geni 13. ekzonunun 703 bç'lik bölgesinin çoğaltılması için kullanılan 5', 3' primer dizisi ve 4070. nükleotidde bulunan A-G değişimi.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz, kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. PCR ürünlerinin yürütüleceği %1'lik agaroz jeli hazırlamak için 1g agaroz tartılır, TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH₂O ile seyreltilmesi ile elde edilen TBE 1X eklenerek, son hacim 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan karışımdaki agarozun çözülmesi için mikrodalga fırında (Beko,Türkiye) ısıtılır ve homojen bir çözelti elde edene kadar kaynatılmaya devam edilir. Elde edilen homojen agaroz, TBE 1X karışımının soğuması için bir süre beklenir ve %5'lik stok solüsyon şeklinde bulunan Etidyum Bromid (Sigma, ABD)' den 5 µl karışıma ilave edilir. Ethidium Bromide boyanan agaroz jel iyice karıştırılarak, uygun jel tarakları ile önceden hazırlanmış olan jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür ve donması için 30 dakika bekletilir. Donan agaroz jel, jel tabağı ile birlikte elektroforez tankının (Biometra, Almanya) içine yerleştirilir ve tank, jelin tamamı tampon çözeltinin içerisinde kalacak şekilde TBE 1X ile doldurulur. 5µl PCR ürünü, 3µl Brom Fenol Mavisini (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılır ve jeldeki kuyulara yüklenir. PCR 'ın kontrol edilmesi ve elde edilen ürünün uzunluğunun (baz çifti) değerlendirilebilmesi için kullanılan marker (ΦX174 DNA HaeIII BioLabs, ABD), PCR ürünleri ile birlikte, jele 2µl yüklenir. Elektroforez tankında 80 V akımda 30 dakika yürütülen jel, ultraviyole ışık (Spectroline, ABD) altında incelenir ve fotoğraflanır (Alpha Imager, ABD).

3.2.4. Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesim

PCR ile çoğaltılan 703 baz çifti uzunluğundaki ürünler, FV geni 13. ekzonunda bulunan 4070 A-G değişiminin belirlenmesi amacıyla *RsaI* (Fermentas, Litvanya) restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl ve 0.1 mg/ml BSA'dan oluşan restriksiyon endonükleaz tamponu, 10X Buffer Tango (Fermentas, Litvanya) ve 1 ünite restriksiyon endonükleaz enzimi, 10 µl PCR ürünü ile karıştırılır, tampon-enzim-PCR ürünü karışımı, enzimin optimum sıcaklığı olan 37°C' de 1-16 saat inkübasyona bırakılır.

FV geni 13. ekzonunda 4070. pozisyonda yer alan A-G değişimi sonucu, A (R1 alleli) ve G (R2 alleli) olmak üzere, iki farklı genotip ortaya çıkabilir. Kullanılan enzim *RsaI*, 5'-GT[^]AC-3' şeklindeki palindromik diziyi tanır ve yalnızca 4070.pozisyonda, G nükleotidini (R2 alleli) taşıyan dizi, enzim için kesim noktası yaratır. Mutasyonu taşımayan, normal

(yabani-tip) (R1 alleli) örneklerde, kesim noktası bulunmayacağı için jel incelendiğinde, 703 baz çifti uzunluğunda tek bant görülmektedir. Yalnızca mutasyonu taşıyan, homozigot örnekler (R2R2) ise enzimin tanıyıp keseceği diziye sahip olmaları nedeniyle, jelde 493 ve 210 baz çifti uzunluklarında iki farklı bant profili gösterirler. Her iki genotipin birlikte bulunması durumunda ise heterozigot olarak adlandırdığımız örnekler (R1R2), kesim sonucunda; 703, 493 ve 210 baz çiftlik olmak üzere 3 farklı bant profili meydana getirirler.

3.2.5. İstatiksel Analiz

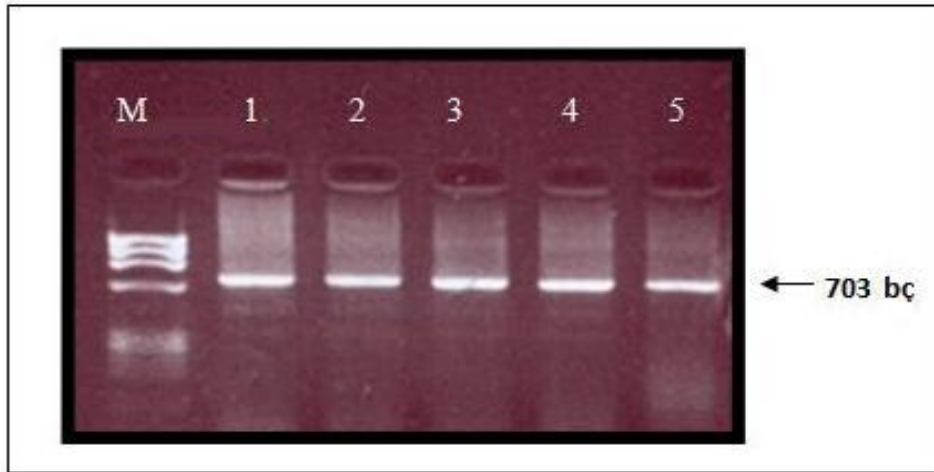
Çalışmada, istatistiksel analiz; hasta ve kontrol grupları arasında, genotipik varyantların ve genotip dağılımlarının hesaplanması ile elde edilen allel frekanslarının değerlendirilmesi için kullanılmış, hasta ve kontrol grupları arasındaki, genotip ve allel frekansı farklılıkları, χ^2 (Chi-square) testi ile hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık, $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Odds Ratio (OR), araştırma kapsamına alınan tüm populasyon için genotipik varyantlar arasındaki bağıl riskin değerlendirilmesi amacıyla, %95 güven aralığında (CI-Confidence Interval) hesaplanmıştır. Tüm grupların genotip dağılımları ve allel frekansları, Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluk açısından teyit edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yapmış olduğumuz bu çalışmaya, 0-18 ve 70 yaş üzeri olacak şekilde iki farklı yaş grubuna ayırdığımız, tromboz tanısı konmuş 401 hastanın ve kontrol gruplarını oluşturan 382 sağlıklı bireyin DNA örnekleri dahil edilmiştir. Bununla birlikte, FVL değişimini homozigot olarak taşıdığı belirlenmiş 7'si kontrol, toplam 106 bireyin DNA'sı da bu çalışmada yer almış, toplamda 889 örnek çalışılmıştır. *F5* geninin 13. ekzonuna ait bölge, PCR ve enzimle kesim teknikleriyle, ilgilenilen değişim bakımından taranmıştır.

4.1. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU BULGULARI

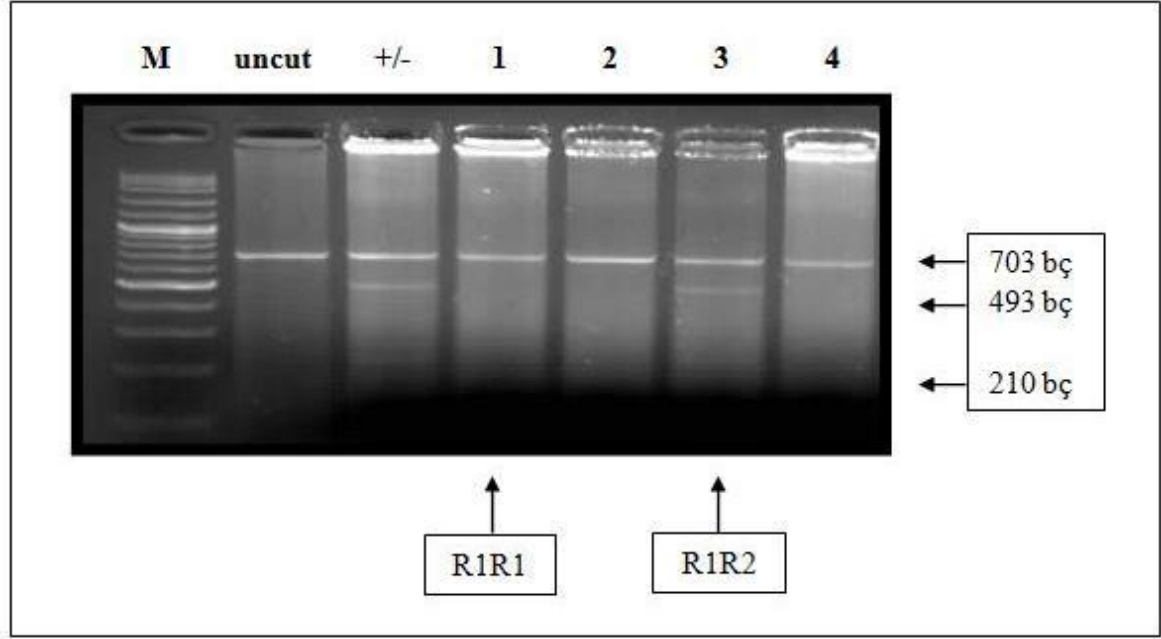
Genin 13. ekzonuna ait PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde 80V akımda 20 dakika yürütülmüştür.



Şekil 4. 1. Faktör V geni 13. ekzonuna ait PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. **M:** Markır, **1-5: Çoğaltılan** 703 bç'lik PCR ürünleri.

4.2. PCR ÜRÜNLERİNİN *RsaI* RESTRİKSİYON ENZİMİ İLE KESİM SONUÇLARI

Faktör V geni 13.ekzonunda bulunan 4070. pozisyondaki A>G değişimini saptamak amacıyla 5'-GT[^]AC-3' dizisini kesen *RsaI* Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile kesim yapılmıştır.



Şekil 4.2. RsaI restriksiyon enzimi ile yapılan kesimin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M(Marker), uncut (kesime tabi tutulmayan PCR örneği), +/- ; heterozigot olduğu bilinen kontrol örneği, örnekler 1, 2, 4 R1R1 normal, örnek 3, R1R2 heterozigot

4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ BULGULARI

Çalışmamızda yer alan, 0-18 yaş grubuna ait 171 kontrol ve 220 hasta, 70 yaş ve üzeri gruba ait 211 kontrol ve 181 hasta örneğinde, FV 4070 A-G değişimine ait genotip dağılımı ve sıklığı belirlenmiştir (Çizelge 4. 1).

FV 4070 A-G değişimi bakımından, 0-18 yaş grubundaki dağılıma bakıldığında, R1R1 genotipine sahip 157 (%91.81) kontrol ve 198 (%90) hasta örneği; R1R2 genotipine sahip 14 (%8.18) kontrol ve 21 (%9.54) hasta örneği bulunmuştur. R1R1 ve R1R2 genotiplerinin sıklığının, hasta ve kontrol grupları arasında farklı olmadığı görülmektedir. R2R2 genotipine sahip, hasta grubunda 1 (%0.45) birey bulunmaktadır.

Gen değişimi bakımından 70 yaş ve üzerindeki dağılıma bakıldığında ise, R1R1 genotipine sahip 190 (%90.04) kontrol ve 166 (%91.71) hasta örneği, R1R2 genotipine sahip, kontrol grubunda 21 (%9.95) , hasta grubunda 15 (%8.28) birey bulunmaktadır.

Çizelge 4. 1. FV R1/R2 gen değişiminin 0-18 yaş ve 70 yaş ve üzeri gruplardaki genotip dağılımı ve sıklığı.

Yaş Grupları	0-18 Yaş Kontrol	70 Yaş Üzeri Kontrol	0-18 Yaş Hasta	70 Yaş ve Üzeri Hasta
FV 4070 A-G	n=171 (%)	n=211(%)	n=220 (%)	n=181 (%)
AA (R1R1)	157 (91.81)	190(90.04)	198(90)	166(91.71)
AG (R1R2)	14(8.18)	21(9.95)	21(9.54)	15(8.28)
GG (R2R2)	-	-	1(0.45)	-

0-18 yaş grubunu detaylı olarak incelediğimizde, iki yüz yirmi tromboz hastasının, 198'i R1R1 genotipini taşırken, 21'i R1R2 ve 1'i R2R2 genotipini taşımaktadır. Kontrol grubundaki 171 bireyin ise 157'si R1R1 genotipine sahipken, 14'ünün R1R2 genotipini taşıdığı bulunmuştur. Kontrol grubunda ise R2R2 genotipi sahip birey bulunmamıştır.

0-18 yaş hasta ve kontrol grupları arasındaki FV 4070 A-G değişimine bağlı olarak ortaya çıkan genotip varyantları arasında trombozla ilişkili risk değerlendirilmesi yapıldığında, R1R2 genotipinde, 0. 5-2.41 güven aralığında, OR değeri 1.18, R2R2 genotipinde ise 1.58 (CI %95 0.05-47.5) olarak hesaplanmıştır. Mutasyonu özellikle homozigot taşımının tromboz için normalden 1.58 kat fazla risk getirebileceği görölse de, p değerleri anlamlandırılmamıştır (Çizelge 4. 2)

Çizelge 4. 2. 0-18 yaş grubunda, FV 4070 R1/R2 gen değişimlerinin tromboz riski açısından değerlendirilmesi

FV 4070 A-G	0-18 Yaş Kontrol n=171(%)	0-18 Yaş Hasta n=220(%)	O.R CI %95	P
R1R1	157 (91.81)	198 (90)	1	
R1R2	14 (8.18)	21 (9.54)	1.18 (0.5-2.41)	0.63
R2R2	-	1 (0.45)	1.58 (0.05-47.5)	0.13

70 yaş ve üzeri hasta ve kontrol grupları incelendiğinde, 181 tromboz hastasının 166'sı R1R1 genotipini gösterirken, 15'i R1R2 genotipine sahiptir. Kontrol grubundaki 211 bireyden ise 190'ı R1R1, 21'i R1R2 genotipini taşımaktadır (Çizelge 4.3).

70 yaş ve üzeri hasta ve kontrol grupları arasındaki FV 4070 A-G değişimi ile trombozla ilişkili risk değerlendirilmesi yapıldığında, R1R2 genotipinde, 0.40-16.3 güven aralığında, OR değeri 0.81 olarak bulunmuştur ancak p değerinin istatistiksel olarak anlamlılığı gösterilememiştir.

Çizelge 4. 3. 70 yaş ve üzerinde, FV 4070 R1/R2 gen değişimlerinin tromboz riski açısından değerlendirilmesi

FV 4070 A-G	70 Yaş ve üzeri Kontrol n=211(%)	70 yaş ve üzeri Hasta n=181(%)	O.R (CI %95)	P
R1R1	190 (90.04)	166 (91.71)	1	
R1R2	21 (9.95)	15 (8.28)	0.81 (0.40-16.3)	0.57

0-18 yaş grubuna baktığımızda; kontrol grubunda 328, hasta grubunda 417, 70 yaş ve üstünde ise kontrol grubunda 401, hasta grubunda 347 R1 alleli saptanmıştır. 0-18 yaş aralığı kontrol grubunda 14, hasta grubunda 23 , 70 yaş ve üstünde ise kontrol grubunda 21, hasta grubunda 15 R2 alleli olduğu tespit edilmiştir. Allel frekansları kullanılarak, 0-18 yaş grubu için hesaplanan trombozla ilişkili risk katsayısı 1.29 iken p değeri anlamsız bulunmuş, 70 yaş grubunda ise OR değeri 1.82 olarak hesaplanmış ve p değerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4. 0-18 ve 70 yaş hasta ve kontrol gruplarında, R1 ve R2 alleleri için allel dağılımları ve frekansları

FV 4070 A-G	0-18 Yaş Kontrol n=171 (%)	0-18 Yaş Hasta n=220 (%)	OR CI(%95)	P	70 Yaş ve Üzeri Kontrol n=211 (%)	70 Yaş ve Üzeri Hasta n=181 (%)	OR CI(%95)	P
R1	328 (0.95)	417 (0.94)	1		401 (0.95)	347 (0.95)	1	
R2	14 (0.04)	23 (0.05)	1.29 (0.65- 2.55)	0.53	21 (0.04)	15 (0.04)	1.82 (0.41- 1.62)	0.58

0-18 yaş hasta ve kontrol gruplarında, FV 1691 G-A (FVL) ve FV 4070 A-G değişimlerinin birlikteliği durumunda trombozla ilişkili risk değerlendirilmesi yapılmıştır (Çizelge 4. 5). Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, FV 1691 değişiminin olmadığı durumda, R2 allelinin heterozigot olarak taşınması 1.42, homozigot taşınması 1.76 OR değeri getirdiği belirlenmiştir ancak her iki kombinasyon için p değeri istatistiksel olarak anlamsızdır. FV 1691 gen değişiminin heterozigot taşınması, FV 4070 gen değişiminin olmadığı durumda trombozla ilişkili risk katsayısı 2.14 olarak hesaplanmış ve p değeri 0.02 bulunmuştur. Her iki gen değişimini heterozigot olarak taşınması 0.44 OR değeri getirirken, FV 1691 değişimi bakımından homozigot ancak R2 allelinin

bulunmaması durumu 1,47 olarak hesaplanmıştır ancak elde edilen p değerleri istatistiksel olarak anlam taşımamaktadır.

Çizelge 4. 5. 0-18 yaş grubunda, FV 1691 G-A ve FV 4070 A-G değişimlerinin birlikteliğinin, tromboz riski açısından değerlendirilmesi

FV 1691 G-A	FV 4070 A-G	0-18 Yaş Kontrol n=171(%)	0-18 Yaş Hasta n=220(%)	OR	CI (%95)	P
G/G	R1R1	140 (81.87)	159 (72.27)	1		
G/G	R1R2	13 (7.60)	21 (9.54)	1.42	0.69-2.94	0.65
G/G	R2R2	-	1 (0.45)	1.76	0.05-52.8	0.17
G/A	R1R1	14 (8.18)	34 (15.45)	2.14	1.10-4.15	0.02
G/A	R1R2	1 (0.58)	-	0.44	0.01-13.22	0.29
A/A	R1R1	3 (1.75)	5 (2.27)	1.47	0.34-6.25	0.86

FV 1691 G-A ve FV 4070 A-G değişimlerinin birlikteliğinin değerlendirilmesi için 70 yaş ve üstü, hasta ve kontrol gruplarına bakıldığında, FV 1691 gen değişiminin olmadığı durumda R2 allelini heterozigot olarak taşımak 1.05 OR değeri ile belirlenmiştir. FVL bakımından heterozigot olup ve R2 allelinin olmadığı durumda, trombozla ilişkili risk katsayısı değeri 2.24 olarak hesaplanırken, elde edilen p değeri 0.01 olarak bulunmuş ve sonuç anlamlandırılmıştır. Her iki değişimin heterozigot olarak bulunduğu kombinasyon 0.32, FVL bakımından homozigot, R2 allelinin bulunmadığı bir diğer kombinasyon ise 3.84 OR değerleri olarak hesaplanmıştır ancak her iki kombinasyon için de p değerlerinin anlamlılığından söz edilemez (Çizelge 4.6).

Çizelge 4. 6. 70 yaş üzerindeki gruplarda, FV 1691 G-A ve FV 4070 A-G değişimlerinin birlikteliğinin, tromboz riski açısından değerlendirilmesi

FV 1691 G-A	FV 4070 A-G	70 yaş ve üzeri Kontrol n=211(%)	70 yaş ve üzeri Hasta n=181(%)	OR	CI (%95)	P
G/G	R1R1	173 (81.99)	135 (74.5)	1		
G/G	R1R2	17 (8.05)	14 (7.73)	1.05	0.51-2.48	0.88
G/A	R1R1	16 (7.58)	28 (15.46)	2.24	1.19-4.99	0.01
G/A	R1R2	4 (1.89)	1 (0.55)	0.32	0.05-5.83	0.54
A/A	R1R1	1 (0.47)	3 (1.65)	3.84	0.31-126.27	0.53

FV 1691 G-A ve 4070 A-G değişimlerinin birlikteliğinin, hasta gruplarında kendi içinde yaşa bağlı olarak değerlendirilmiştir. Hasta grubunu oluşturan 0-18 yaş ve 70 yaş ve üzeri bireyler, bu iki mutasyon bakımından yaşa bağlı olarak değerlendirilmiş, R2 allelini veya 1691A değişimini tek başına taşımanın herhangi bir risk getirmediği (O.R 0.78, %95 CI 0.38-1.60, O.R 0.96, %95 CI 0.55-1.68) belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Her iki mutasyonu heterozigot olarak taşımanın, mutasyon taşımayan bireylere göre yaşa bağlı olarak 2.35 (%95 CI 0.07-70.76) kat risk getirdiği saptanırken, FVL bakımından homozigot durumda olan bireylerin, normal bireylere göre yaş bakımından risk taşımadığı görülmüştür (O.R 0.70, %95 CI 0.16-3.01). Ancak bu grup için yapılan risk hesaplamalarının tamamında p değerinin anlamsız olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4. 7. 0-18 ve 70 yaş ve üzeri hasta gruplarında FV 1691 G-A ve FV 4070 A-G değişimlerinin birlikteliğinin, yaş bakımından değerlendirilmesi

FV 1691 G-A	FV 4070 A-G	0-18 Yaş Hasta n=220(%)	70 yaş ve üzeri Hasta n=181(%)	OR	CI (%95)	P
G/G	R1R1	159 (72.27)	135 (74.58)	1		
G/G	R1R2	21 (9.27)	14 (7.73)	0.78	0.38-1.60	0.51
G/G	R2R2	1 (0.45)	-	0.58	0.01-17.69	0.15
G/A	R1R1	34 (15.45)	28 (15.46)	0.96	0.55-1.68	0.90
G/A	R1R2	-	1 (0.55)	2.35	0.07-70.76	0.31
A/A	R1R1	5 (2.27)	3 (1.65)	0.70	0.16-3.01	0.90

Tromboza neden olduğu bilinen risk faktörlerinden FV 1691 G-A veya PT 20210 G-A değişimlerini taşıyan örneklerin olmadığı, hasta ve sağlıklı grupların karşılaştırılması, FV 4070 gen değişiminin trombozla olan ilişkisinin daha net bir biçimde ortaya konmasını sağlayabilir.

0-18 yaş aralığında, FVL veya PT değişimlerinin görülmediği kontrol ve hasta grupları birbirleriyle kıyaslandığında, R2 allelinin heterozigot olarak taşınmasının, 1.6 gibi bir risk getirdiği (Çizelge 4.8); 70 yaş ve üzeri hasta ve kontrol grupları arasında, FVL veya PT gen değişimlerini taşıyan bireylerin olmadığı durumda, R2 allelinin heterozigot taşınması, 1.04 OR değerine sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 4.9). 0-18 yaş grubunda hesaplanan p değeri 0.17 iken, 70 ve üzeri yaş grubu için p değeri 0.89 olarak saptanmış ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Çizelge 4. 8. FV 1691 G-A veya PT 20210 G-A değişimlerinin olmadığı 0-18 yaş grubunda, FV 4070 A-G gen değişiminin dağılımı ve tromboz riski açısından değerlendirilmesi

FV 4070 A-G	0-18 Yaş Kontrol n=152(%)	0-18 Yaş Hasta n=168(%)	O.R (CI %95)	P
R1R1	140 (90.04)	147 (91.71)	1	
R1R2	12 (9.95)	21 (8.28)	1.6 (0.79-3.51)	0.17

Çizelge 4. 9. FV 1691 G-A veya PT 20210 G-A değişimlerinin olmadığı 70 ve üzeri yaş grubunda, FV 4070 A-G gen değişiminin dağılımı ve tromboz riski açısından değerlendirilmesi

FV 4070 A-G	70 Yaş ve üzeri Kontrol n=181(%)	70 yaş ve üzeri Hasta n=143(%)	O.R (CI %95)	P
R1R1	164 (90.60)	129 (91.71)	1	
R1R2	17 (9.39)	14 (8.28)	1.04 (0.49-2.2)	0.89

FV 1691 G-A veya PT 20210 G-A değişimlerinin olmadığı bireylerden oluşan 0-18 ve 70 yaş grubunda, hasta ve kontrol grupları kıyaslandığında, R2 allelinin dağılımı ve frekansı, 0-18 yaş grubundaki OR değeri olarak 1.62 (CI %95, 0.78-3.35) iken, 70 yaş grubundaki değeri 1.09 (CI %95, 0.5-2.25) olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4. 10. FVL veya PT gen değişimlerinin taşıyan bireylerin bulunmadığı, 0-18 ve 70 yaş hasta ve kontrol gruplarında, R1 ve R2 alleleri için allel dağılımları ve frekansları

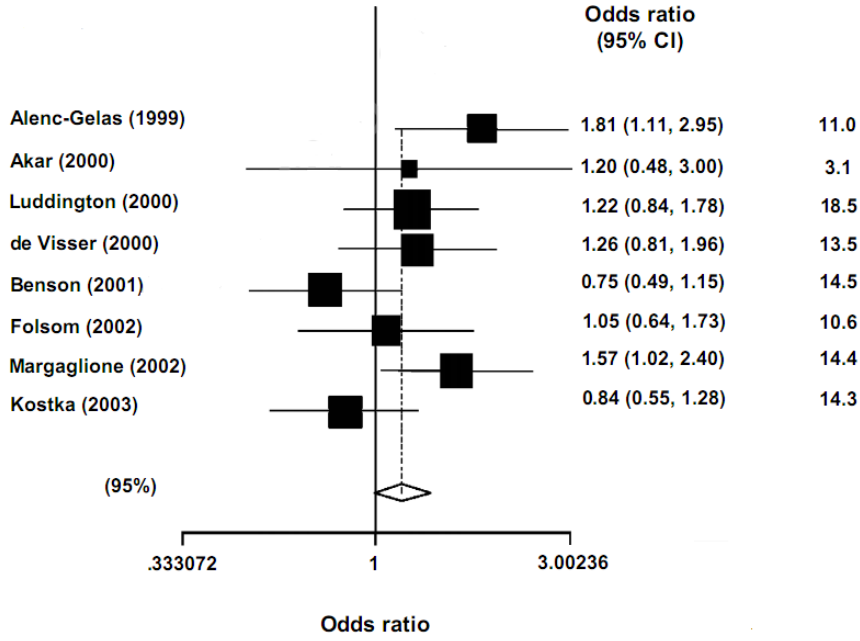
FV 4070 A-G	0-18 Yaş Kontrol n=152 (%)	0-18 Yaş Hasta n=168 (%)	OR CI(%95)	P	70 Yaş üstü Kontrol n=185 (%)	70 Yaş üstü Hasta n=181 (%)	OR CI(%95)	P
R1	292 (0.95)	315 (0.94)	1		361 (0.95)	272 (0.95)	1	
R2	12 (0.04)	21 (0.05)	1.62 (0.78- 3.35)	0.18	17 (0.04)	14 (0.04)	1.09 (0.5- 2.25)	0.80

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hemostaz, damar sistemindeki prokoagulan ve antikoagulan faktörler arasındaki dengenin korunduğu fizyolojik bir sistemdir. Prokoagulan ve antikoagulan sistemler arasındaki doğal dengede ortaya çıkabilecek edinsel veya genetik bozukluklar, kanama hastalıkları ya da tromboz ile sonuçlanabilir. Özellikle pıhtılaşmayı önleyen doğal sistemlerdeki defektler sonucu ortaya çıkan trombozun en sık rastlanan kalıtsal risk etmenlerinden biri FV 1691 G-A (FVL) mutasyonudur (Bertina et al. 1994). FV geninde bulunan, 4070 A-G değişimi ile birlikte diğer polimorfizmlerin de yer aldığı HR2 haplotipi, glikozillenmiş ve daha trombogenik olan FV molekülünün (FV1) yapımına neden olur (Castoldi et al. 2000).

FV genindeki HR2 haplotipi, ilk kez 1996 yılında tanımlanmış ve plazmadaki düşük faktör V düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir (Lunghi et al. 1996). Kısa bir süre sonra yapılan başka bir çalışmada, bu haplotipin, FVL mutasyonun olmadığı durumlarda da, APC direncinde hafif bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (Bernardi et al. 1999). HR2 haplotipi, FVIII' in APC bağımlı degradasyonunda kofaktör görevi yapan FV' in aktivitesini düşürür. Buna bağlı olarak artan FVIII düzeyleri, FV HR2' ye bağlı hafif protrombotik rolü açıklamaktadır (Martinelli et al.2007). Ardından, bu haplotipin, venöz tromboz için bir risk faktörü olup olmadığı sıklıkla çalışılan konulardan biri haline gelmiştir.

FV R2 polimorfizminin, tromboz riski ile ilişkilendirildiği çalışmaların sonuçları birbirinden farklıdır. Bir çalışmada FV R2 allelinin venöz tromboz için 1.8 kat risk getirdiği belirtilirken (Alhenc-Gelas et al. 1999), R2 allelinin tek başına venöz tromboz için bir risk faktörü olmadığı ise Akar ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda trombozla ilişkili risk katsayıları hesaplandığında, elde edilen O.R değerlerinin 2' nin altında kaldığı, istatistiksel olarak anlamlı tek bulgunun, 1,8 risk katsayısı ile Alhenc-Gelas ve ark. tarafından yapılan çalışma olduğu görülmektedir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. FV R1/R2 gen değişimi ve tromboz riski arasındaki ilişki (Castaman et al. 2003)

Çalışmamızda, R1 ve R2 allellerinin trombozlu bireylerdeki etkisinin araştırılması için gerçekleştirilen bu çalışmada, R1 allelinin tromboza karşı koruyucu bir etkisinin olmadığı, R2 allelinin ise 0-18 yaş grubunda kontrol ve hasta bireyler arasında, tromboz açısından risk getirmediği (O.R 1.22, CI %95 0.6-2.45), 70 yaş ve üzeri kontrol ve hasta grubunda ise yine tromboz riski ile ilişkilendirilmediği (O.R 0.83, CI %95 0.41-1.66) ve her iki grup için p değerlerinin istatistiksel olarak anlamsız olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçta, R2 alleli dışında tromboz riski ile ilişkilendirilmiş başka mutasyonların veya edinsel etmenlerin olduğu düşünülebilir. Bunun yanı sıra, örnek sayısının artırılması, sonuçların istatistiksel olarak anlamlı düzeye gelmesini sağlayabilir.

FVL ve R2 değişimlerini heterozigot durumda taşıyan bireylerde, yalnızca FVL değişimini heterozigot olarak taşıyan bireylere göre APC direncinin daha yüksek olduğu ve tromboz riskinin 3-6 kat arttığı Margaglione ve ark.(2002) tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmadan hareketle, FV Leiden ve R2 polimorfizmlerinin aynı allel üzerinde bulunamayacağını ve çift heterozigotluk durumunda artan tromboz riskinin, FVL mutasyonunun heterozigot durumda tek başına getirdiği riske göre daha fazla olmasının, bu şekilde bir kalıtım modeli ile mümkün olabileceği öne sürülmüştür (Bernardi et al. 1997). Bu hipotezi destekleyen çalışmalar arasında, Faioni ve ark. (1999) tarafından yapılan aile

çalışmaları gelmektedir. Yalnızca FV Leiden taşıyıcısı olan bireylerde tromboz riski 4.2 (%95 CI, 1.6-11.3) iken, FV Leiden/R2 birlikteliğindeki çift heterozigotluk durumunda, hastalık riskinin 10.9 (%95 CI, 2.9-40.6) olduğu bildirilmiştir.

İki farklı yaş aralığındaki hasta ve kontrol grupları için yaptığımız, çift heterozigotluk durumunda ortaya çıkan tromboz riski hesaplamalarında, FVL/R2 birlikteliğinin, FVL heterozigotluğu ile karşılaştırıldığında, tromboz için bir risk faktörü olmadığı belirlenmiştir. Hasta grupları arasında yaşa bağlı olarak R2 alleli için yapılan risk hesaplamalarında, 0-18 ve 70 yaş grubu arasında, FVL ve R2 değişimlerini birlikte taşımamanın, hastalıkla ilişkili yaşa bağlı bir risk getirdiği belirlense de anlamlı bir değere ulaşılamamıştır. Ancak, 0-18 yaş grubunda genellikle arteriyel tromboz, 70 yaş grubunda ise venöz tromboz görülüyor olması elde edilen sonucu açıklayabilir.

R2 allelinin homozigot olarak taşınmasının, tromboz açısından getirdiği riskle ilgili yapılan çalışmalar arasında Folsom ve ark.(2002) tarafından yapılan çalışma yer almaktadır. R2R2 genotipine sahip 3 homozigot bireyin de tromboz hastası ve 5.5 risk katsayısına sahip olduğu belirtilmiştir. Akar ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada da HR2 homozigotluğunun tromboz açısından risk getirebileceği belirtilmiştir. HR2 haplotipi homozigotluğunun sıklığının normal popülasyonda, %0.5 'ten düşük olduğu gösterilmiştir (Bernardi et al. 1997). Japon popülasyonu üzerinde yapılan son çalışmada da, FV HR2 haplotipi homozigotluğuna bağlı olarak aktive protein C direncinin ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (Okada et al. 2010).

FV 4070 A-G değişimi bakımından GG genotipini taşıyan 0-18 hasta grubuna ait bir birey saptanmıştır (1/220). Homozigot R2 alleli taşıyıcısı olan ve FVL taşımayan bu bireyin tromboz hastası olması ve nadir bulunması nedeniyle elde edilen sonuç, önemli ve literatürü destekler niteliktedir. Tromboz riski ile ilişkilendirilen bu alleli homozigot taşıyan bireylerin dahil edildiği çalışmaların artırılması, mutasyonun rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için gereklidir.

Sonuç olarak, mutasyon taşınmasına rağmen, uzun yıllar tromboz geçirmeyen bireylerde, R1 allelinin koruyucu etki göstermediğini, R2 allelinin ise tek başına 0-18 yaş ve 70 yaş gruplarında trombozla ilişkili bir risk faktörü olmadığını göstermiştir. FVL taşıyan, R1R1 genotipine sahip bireylerin, 0-18 yaş ve 70 yaş üstü hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre tromboza yatkınlığı arttırdığı istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir. Bu iki yaş grubuna ait hasta bireyler arasında risk hesaplaması yapıldığında, FVL ve FV R2

allellerini heterozigot olarak taşıyan bireylerde, yaşa bağı olarak riskin artabileceği görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan bu sonucu, anlamlı düzeye getirebilmek için örnek sayısı arttırılabilir. Güçlü genetik risk faktörlerine sahip bireyleri uzun yıllar tromboz geçirmekten koruyan bu etkenin ve incelenen değişimin hastalıkla ilişkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için fonksiyonel analizlerin yapılması gereklidir.

KAYNAKLAR

- Adams LCR, Bird RJ. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology* 2009; 14, 462–47
- Aird WC. Vascular bed-specific thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 283-91.
- Akar N, Akar E, Yilmaz E. Factor V (His 1299 Arg) in Turkish patients with venous thromboembolism. *Am J Hematol* 2000; 63:102-7.
- Akar N. Klinik Moleküler Patoloji' ye Giriş. 2. Baskı. ANTIP, 1999.
- Akar N. FV 1691 G-A frequency in Turkey. *Turk J Hematol* 2009; 26: 9-11.
- Alhenc-Gelas M, Nicaud V, Gandrille S, Van Dreden P, Amiral J, Aubry ML, Fiessinger JN, Emmerich J, Aiach M. The factor V gene A4070G mutation and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 81:193-7.
- Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, et al. A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood*. 1997;90:1 552-1557.
- Bertina R. Molecular risk factors for thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 82: 601-607.
- Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369: 64-7.
- Bouma BN, Mosnier LO. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2004; 33: 375–81.
- Bungay S. Modelling the effect of amplification pathway factors on thrombin generation: A comparison of hemophilias. *Transfus. Apher. Sci.* 2008; 38: 41–7.
- Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995; 74: 90–3.
- Castaman G, Faioni EM, Tosetto A, Bernardi F. The factor V HR2 haplotyoe and risk of venous thrombosis: a meta- analysis. *Haematologica* 2003; 88: 1182-1189.
- Castoldi E, Rosing J, Girelli D, Hoekema L, Lunghi B, Mingozzi F, Ferraresi P, Friso S, Corrocher R, Tans G, Bernardi F. Mutations in the R2 FV gene affect the ratio between the two FV isoforms in plasma. *Thromb Haemost* 2000;83:362-5.
- Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 2001; 86: 189-97.

- Dahlback B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med.* 2005; 257(3):209-223.
- Dahlback B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol* 2004; 79: 109–16.
- Dahlback B, Stenflo J. The protein C anticoagulant system. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H, eds. *The Molecular Basis of Blood Disease*, 3rd edn. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001; 614–56.
- Davie EW, Ratnoff SI. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145: 1310–12.
- De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 1996; 87: 3531- 3544.
- De Visser MCH, Guasch JF, Kamphuisen PW, Vos HL, Rosendaal FR, Bertina RM. The HR2 haplotype of factor V: effects on factor V levels, normalized activated protein C sensitivity ratios and the risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 577-582.
- Duga S, Asselta R, Tenchini ML. Coagulation factor V. *Int J Biochem & Cell Biol* 2004; 36: 1393-1399.
- Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Reviews* 2009; 23: 225-229.
- Esmon CT. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1343–8.
- Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003; 124(Suppl. 3): 26S–32.
- Faioni EM, Franchi F, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, et al. Coinheritance of the HR2 haplotype in the factor V gene confers an increased risk of venous thromboembolism to carriers of factor V R506Q (factor V Leiden). *Blood* 1999;94: 3062-6.
- Fay PJ. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Rev* 2004; 18: 1-15.
- Folsom AR, Cushman M, Tsai MY, Aleksic N, Heckbert SR, Boland LL, et al. A prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors. *Blood* 2002;99: 2720-5.
- Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med* 1992; 326: 800–6.
- George JN. Platelets. *Lancet.* 2000; 355: 1531-9.
- Greenfield, L. (1994). "Venous and lymphatic disease." *Principles of surgery* 6:9891014.
- Greer P, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B (eds). *Wintrob's Clinical Hematology*, 11th, edn. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins, 2004.

- Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 2002; 88: 186-93.
- Hoekema L, Castoldi E, Tans G, et al. Functional properties of factor V and factor Va encoded by the R2-gene. *Thromb Haemost*. 2001;85:75-81.
- Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: A modern view of hemostasis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2007; 21: 1–11.
- Ichinose A. Physiopathology and regulation of factor XIII. *Thromb Haemost* 2001; 86: 57–65.
- Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD, Mann KG. Characterization of the molecular defect in factor V R506Q. *J Biol Chem* 1995; 270: 4053- 4057.
- Kalafatis M, Swords NA, Rand MD, Mann KG. Membranedependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1227: 113–29.
- Kato H. Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 539–48.
- Krishnaswamy S, Nesheim ME, Pryzdial EL, Mann KG. Assembly of prothrombinase complex. *Methods Enzymol* 1993; 222: 260–80.
- Kotska H, Schwarz T, Schellong S, Mix C, Kuhlisch E, Temelkova-Kurtktschiev, et al. Coagulation factor V G allele and HR2 haplotype: factor V activity, activated protein C resistance and risk of venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 49-56
- Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 2000; 95: 1517-32.
- Lefkowitz JB, Coagulation Pathway and Physiology. In: *Hemostasis Physiology*, 2007.
- Lunghi B, Iacoviello L, Gemmati D, Dilasio M, Castoldi E, Pinotti M, Castaman G, Redaelli R, Marianni G, Marchetti G, Bernardi F. Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: Association with factor V levels in plasma. *Thromb Haemost* 1996;75:45-8.
- MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1994; 202: 98–9.
- Mann KG, Kalafatis M. (2003). Factor V: a combination of Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Blood*, 101, 20–30.
- Mann KG, Lorand L. Introduction: blood coagulation. *Methods Enzymol* 1993; 222: 1–10.
- Mann KG, van't Veer C, Cawthern K, Butenas S. The role of the tissue factor pathway in initiation of coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: S3–7.
- Margaglione M, Bossone A, Colaizzo D, D' Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, et al. FV HR2 haplotype, as additional risk factor for deep vein thrombosis in individuals with high risk profile. *Thromb Haemost* 2002; 87: 32-6.

- Martinelli N, Girelli D, Ferraresi P, Olivieri O, Lunghi B, Manzato F, Roberto Corrocher R, Bernardi F. Increased factor VIII coagulant activity levels in male carriers of the factor V R2 polymorphism. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2007; 18: 125–129.
- Michiels C. Endotelial cell functions. *J Cell Physiology*. 2003; 196(3): 430-443.
- Middeldorp S, Buller HR, Prins MH, Hirsh J. Approach to the thrombophilic patient. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:1085–1100.
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1381-9.
- Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 66-74.
- Nicolaes GA, Dahlback B. (2002). Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22, 530–538.
- Nicolaes, G. A., Villoutreix, B. O., & Dahlback, B. (1999). Partial glycosylation of Asn2181 in human factor V as a cause of molecular and functional heterogeneity. Modulation of glycosylation efficiency by mutagenesis of the consensus sequence for N-linked glycosylation. *Biochemistry*, 38, 13584– 13591.
- Okada H, Toyoda Y, Takagi A, Saito H, Kojima T, Yamazaki T. Activated protein C resistance in the Japanese population due to homozygosity for the factor V R2 haplotype. *Int J Hematol* (2010) 91:549–550
- O’Shaughnessy D, Makris M, Lillicrap D, eds. Basic principles underlying the coagulation system. In: *Practical Hemostasis and Thrombosis*. Blackwell, 2005.
- Öner C. Genetik Kavramlar. 6. Baskı, 2000
- Ulu A, Yilmaz E, Akar E, Akar N. Homozygosity for the HR2 Haplotype: Is It a Risk Factor for Thrombosis? *Turk J Haematol* 2003;20(4):213-215.
- Paiement, G. (1998). "DVT prophylaxis after total joint arthroplasty." *Medscape Orthopaedics and Sports Medicine* 2: 67.
- Pérez-Gómez F, Bover R. The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage. *Rev. Esp. Cardiol.* 2007; 60: 1217–19.
- Perry, D. Hemostasis: Components and Processes. In: *Hemostasis and Thrombosis Protocols Methods in Molecular Medicine*. Humana Press, 1999.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3’ untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698-3703.

- Rauch U, Nemerson Y. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 139–43.
- Roberts HR, Monroe MD, Escobar AM. Current Concepts of Hemostasis. *Anesthesiology* 2004; 100:722–30
- Rosendaal FR, Reitsma PH. Genetics of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl. 1): 301-304.
- Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 353: 1167, 1999.
- Rosing J, Tans G. Coagulation factor V. An old star shines again. *Thromb Haemost* 1997; 78: 427-33.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2. Baskı, 1989
- Scanavini D, Girelli D, Lunghi B, Martinelli N, Legnani C, Pinotti M, et al. Modulation of factor V levels in plasma by polymorphisms in the C2 domain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:200–206.
- Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001; 344: 1222-1231.
- Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 69: 381–7.
- Stenflo J, Dahlback B. Vitamin K-dependent proteins in blood coagulation. In: Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H, eds. *The Molecular Basis of Blood Disease*, 3rd edn. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001; 579–613.
- van Boven HH, Lane DA. Antithrombin and its inherited deficiency states. *Semin Hematol* 1997; 34: 188–204.
- Vinay Kumar ve Ramzi S. *Cotran. Basic Pathology* 7. Baskı, 2007
- Weitz JI. Heparan sulfate: antithrombotic or not? *J Clin Invest* 2003; 111: 952–4.
- Woodside DG, Liu S, Ginsberg MH. Integrin activation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 316-23.
- Yamazaki T, Nicolaes GAF, Sorensen KW, Dahlback B. Molecular basis of quantitative factor V deficiency associated with factor R2 haplotype. *Blood* 2002; 100: 2515-2521.
- Yılmaz E, Akar E, Sözüöz A, Akar N. Frequency of FV 1299 His- Arg (A4070G) in Turkish Cypriots. *Turk J Haematol* 2001; 18 (4): 243-244.
- Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1998; 10: 433–53.

<http://www.kanbilim.com/kanPih.htm>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sezen BALLI
Doğum Tarihi : 20.10.1987
Doğum Yeri : Bulgaristan
Medeni Durumu : Bekar
İletişim Adresi : İlkyerleşim Mah. Saygınlar Sitesi A/ 56 Batıkent ANKARA
Telefon : 0312 256 28 19
e- Posta Adresi : sezenballi@yahoo.com

Yabancı Dili:

İngilizce (İleri Seviyede)
Almanca (Başlangıç)

Eğitim Durumu:

2004-2008 Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
2001-2004 Aydınlıkevler Anadolu Lisesi
1998-2001 Jale Tezer Koleji

Staj:

2005 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, Genetik Laboratuvarı

Katıldığı Kongreler:

30 Ağu- 4 Eyl 2009 1st BIOMics Workshop & Conference, Weizmann Institute of Science Rehovot, İsrail
11-12 Mayıs 2009 Horizons in Molecular Biology and Genetics, Bilkent Üniversitesi
30 Nisan 2009 2. Ankara Tıp Biyokimya Günü, Ankara Üniversitesi
25 Mart 2009 I.Prof.Dr Orhan Ulutin Trombogenetik Sempozyumu, Marmara Üniversitesi
13-14 Kasım 2008 VII. Biyoteknoloji Günleri- Ankara Üniversitesi

Bildiriler:

Akin D, **Balli S**, Gulbahar G, Akar N. 2010 Effects of thrombotic risk factors on longevity in Turkish population. Pathophysiol Haemos Thromb 2009/2010;37 (Suppl.1) :A125-P97

Balli S, Ozturk A, Akar N. 2010 Factor V A4070G Mutation in Patients with Homozygous Factor V Leiden. Pathophysiol Haemos Thromb 2009/2010;37 (Suppl.1): A169-RBT94

Balli S, Ozturk A, Akar N, 2009. Factor V A4070G mutation in patients with homozygous FV Leiden. 1st BIOmics Hands on Workshop & Conference Syf 30, 30 Aug-4 Eyl 2009, Weizmann Institute of Science, Rehovot, İsrail (Poster Sunumu)

Ödüller ve Burslar:

2010 Staj Hareketliliği Bursu (Milan Üniversitesi Tıp Fakültesi, A. Bianchi Bonomi Hemofili ve Tromboz Merkezi , Milan- İtalya)

Ankara Üniversitesi Avrupa Birliği Ofisi, Hayat Boyu Öğrenme Programı

2009 TeachSG & Israel National Commission for UNESCO's Yol Bursu

1st BIOmics Hands on Workshop & Conference, Weizmann Institute of Science Rehovot Israel