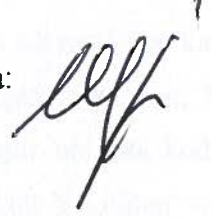


## KABUL ONAY

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı bünyesinde, Prof Dr. Nejat AKAR danışmanlığında Bio. Esin GÜNGÖR tarafından hazırlanan bu çalışma 22/01/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

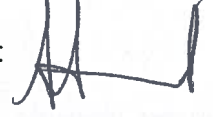
Başkan: Prof. Dr. Nejat AKAR

İmza:




Üye: Prof. Dr. Zümrüt UYSAL

İmza:



Üye: Prof. Dr. Gülhis DEDA

İmza:



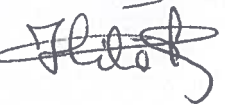
Üye: Prof. Dr. Mehmet ERTEM

İmza:



Üye: Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ

İmza:



Yukarıdaki sonuncu onaylarım.



Prof. Dr. Asuman KARAKAYA

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Faktör V, prokoagulan ve antikoagulan yolaklarda fonksiyon gösteren başlıca insan koagulasyon faktörüdür. Faktör V eksikliği, kanamaya veya tromboembolitik hastalıklara neden olabilir. Kanda bulunan koagulasyon faktörlerinden FV geninde oluşan ve fenotipte APC Rezistansı olarak adlandırılan tek nokta mutasyonu tromboz hastalığı için en sık rastlanan kalıtsal risk faktörüdür. Faktör V in APC ye bağlanma noktalarından birinde oluşan mutasyon, 1691. pozisyondaki guanin nükleotidinin adenin ile yer değiştirmesi sonucu oluşur ve 506. kodonda argininin glutamin ile yer değiştirmesiyle sonuçlanır. Mutant Faktör V, “Faktör V Leiden” olarak bilinir ve prokoagulan kapasiteye sahiptir.

Bu çalışmada, FVL 1691 G – A mutasyonu ile pediatrik tromboz oluşumu arasındaki korelasyon incelendi. Pediatrik tromboz için riskli yaş grupları tespit edildi. Trombüs atağı geçiren (n=372) ve tromboz geçirmeyen aynı yaş grubundaki (n=336) iki grup çocuk seçildi.

İstatistik analiz için Kaplan – Meier istatistik metodu kullanıldı. Faktör V Leiden mutasyonu için iki grup karşılaştırıldı. Faktör V genindeki 1691 G – A mutasyonunun tromboz üzerine etkili olduğu bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Faktör V Leiden, Light Cyclers, APC Resiztansı

## ABSTRACT

Human coagulation factor V (FV) is an essential coagulation protein with functions in both the pro - and anticoagulant pathways. Failure to express and control FV functions can either lead to bleeding, or to thromboembolic disease. The most common inherited risk factor for thrombosis is a single point mutation in the blood coagulation factor V gene (G1691A), which results in phenotype called APC Resistance. The mutation, which occurs at one of the factor V APC cleavage sites, is located at nucleotide position 1691 and substitutes a G for an A, resulting in to the replacement of arginine with glutamine at codon 506. The mutant factor V is known as “Factor V R506Q” or “Factor V Leiden (FVL)” and FVL has full procoagulant capacity.

In this study, we studied correlation between FVL 1691 G > A mutation and age alterations in pediatric thrombosis. We found the risky age groups for thrombosis in pediatric thrombosis. Two groups of children were selected, i.e with thrombus attack (n=372) and age matched non-thrombotic group (n=336).

We used the Kaplan – Meier statistical method for statistical analysis. We compare two groups for Factor V Leiden mutation. We found that, 1691 G > A mutation in factor V gene is effective on thrombosis.

**Key Words:** Factor V Leiden, Light Cyclor, APC Resistance

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince sahip olduğu bilgi birikimi ve görüşleriyle beni yönlendiren, her zaman desteğini hissettiğim ve bundan sonraki çalışma hayatım boyunca bilgi, destek ve yardımına her zaman ihtiyaç duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR' a;

Bu tezin deney aşamasından yazılmasına kadar geçen sürecin her aşamasında bana destek olan, değerli fikirleriyle ve arkadaşlığıyla her zaman yanımda olan, yaşamı boyunca kazandığı deneyimlerini tereddütsüzce paylaşan, zor anlarımda desteğini hep yanımda hissettiğim Uzm. Bio. Yonca EĞİN' e;

Sevgi ve ilgisini güler yüzüyle harmanlayarak her zaman bizlere hissettiren, yardımlarını esirgemeyen Uzm. Bio. Ece AKAR' a;

Tez çalışmalarımızın vazgeçilmez materyali olan DNA'ların izole edilmesini titizlikle sağlayan ve bizlere her zaman yardımcı olan Bio. Emel USLU' ya;

Çalışmam süresince bilgi ve önerileriyle yanımda olan Bio. Dr. Erkan YILMAZ' a; birlikte geçirdiğimiz iki yıl içerisinde birçok zorluğun üstesinden geldiğimiz ve keyifli vakit geçirdiğimiz çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Didem TORUN, Bio. Duygu SANLIDİLEK, Bio. Cennet YILDIZ, Bio. Özge CUMAOĞULLARI, Bio. Afife KARABIYIK, Bio. Zehra VELİ, Bio. Zafer ERİK, Bio. Emre HAMİT, Tek. Çiğdem ASLAN, Tek. Kadir SİPAHİ, Uzm. Bio. Ayşenur ÖZTÜRK, Uzm. Bio. Aslı SIRMACI, Uzm. Bio. İdil ASLAN, Uzm. Bio. Filiz Başak CENGİZ, Uzm. Bio. Duygu DUMAN ve ismini saymadığım tüm Pediatrik Moleküler Genetik Ailesi' ne;

Yüksek lisans eğitimim süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen S.B. Kırıkkale Karakeçili İlçe Hastanesi Başhekimi Uzm. Dr. Feridun KARAGÖZ' e ve çalışma arkadaşlarıma,

Sevgi, sabır ve desteklerini hayatım boyunca esirgemeyen aileme

TEŞEKKÜRÜ BİR BORÇ BİLİRİM...

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa No:**

KABUL VE ONAY .....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	iv
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
DİZİLER LİSTESİ.....	x
SİMGELER DİZİNİ.....	xi
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1. Hemostaz.....	3
2.1.1. Vasküler Endotel .....	3
2.1.2. Trombositler .....	4
2.1.3. Koagulasyon Sistemi .....	7
2.1.3.1. Ekstrinsik Yol .....	8
2.1.3.2. İntrensik Yol.....	9
2.1.3.3. Ortak Yol .....	9
2.2. Hemostazda Biyolojik Kontrol .....	11
2.2.1. Feed – Back İnhibisyon .....	11
2.2.2. Fibrinoliz.....	12
2.2.3. Doğal İnhibitörler .....	12
2.3. Tromboz .....	13
2.3.1. Kalıtsal Risk Faktörleri.....	17
2.3.1.1. Antitrombin (AT) III Eksikliği .....	17
2.3.1.2. Protein C (PC) Eksikliği .....	18
2.3.1.3. Protein S Eksikliği .....	19

2.3.1.4. Hiperhomosisteinemi .....	20
2.3.1.5. Faktör VIII ve FIX Yüksekliği .....	21
2.3.1.6. Lipoprotein (a) .....	21
2.3.1.7. Trombomodülin ve EPCR.....	22
2.3.1.8. Protrombin 20210 Mutasyonu .....	23
2.3.1.9. Faktör V Gen Değişimleri ve Faktör V Leiden (1691 G – A) Mut. ...	24
2.4. Moleküler Teknikler.....	28
2.4.1. Kullanılan Çözeltiler.....	28
2.4.2. DNA Ekstraksiyonu.....	28
2.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Pcr).....	28
2.5. İstatistik Yöntemler .....	30
2.5.1. İstatistik Yönteminin Seçilmesi.....	31
2.5.2. Kaplan – Meier Yöntemi .....	31
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>32</b>
3.1. Yöntem.....	32
3.1.1. DNA İzolasyonu .....	32
3.1.2. FV 1691 G – A Değişiminin Belirlenmesi .....	34
3.2. Araştırma Bulguları.....	36
3.2.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları .....	36
3.2.2. İstatistik Analizi Bulguları.....	38
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>45</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>46</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>51</b>

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b><u>Sayfa No:</u></b>
<b>Tablo 1.</b> Edinsel tromboz nedenleri.....	15
<b>Tablo 2.</b> Belirlenmiş kalıtsal risk faktörleri.....	16
<b>Tablo 3.</b> LC cihazında kullanılan FVL kiti içerikleri ve reaksiyonda kullanılan miktarlar .....	34
<b>Tablo 4.</b> LC cihazında FVL analizinde kullanılan primer dizileri ve hibridizasyon problemleri .....	35
<b>Tablo 5.</b> FVL mutasyonunun trombüs atağı geçiren bireylerde cinsiyete göre dağılımı .....	39
<b>Tablo 6.</b> FVL mutasyonunun trombüs hikayesi olmayan bireylerde cinsiyete göre dağılımı.....	39
<b>Tablo 7.</b> Trombüs atağı geçiren bireylerin cinsiyet ve hastalığı geçirme yaşına göre dağılımı ..	40
<b>Tablo 8.</b> Trombüs atağı geçiren bireylerin genotip, cinsiyet ve hastalığı geçirme yaşına göre dağılımı .....	40
<b>Tablo 9.</b> Trombüs atağı geçiren bireylerin genotip ve hastalığı geçirme yaşına göre dağılımı ..	41
<b>Tablo 10.</b> Tromboz hikayesi olmayan bireylerin genotip, cinsiyet ve hastalığı geçirme yaşına göre dağılımı .....	42
<b>Tablo 11.</b> Tromboz hikayesi olmayan bireylerin genotip ve hastalığı geçirme yaşına göre dağılımı .....	42
<b>Tablo 12.</b> Case Processing Summary (SPSS Programı Kaplan – Meier verisi).....	43
<b>Tablo 13.</b> Means and Medians for Survival Time (SPSS Programı Kaplan – Meier verisi).....	43
<b>Tablo 14.</b> Overall Comparisons (SPSS Programı Kaplan – Meier verisi) .....	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil</b>	<b><u>Sayfa No:</u></b>
Şekil 1. Trombosit içi granüllerinin içerikleri.....	6
Şekil 2. Koagülasyon Sistemi .....	8
Şekil 3. Faktör V molekülünün kesim noktalarının şematik gösterilmesi .....	25
Şekil 4. FV 1691 G – A değişimi.....	27
Şekil 5. Light Cycler mutasyon analiz yönteminin çalışma prensibi.....	29
Şekil 6. Erime Eğrisi Analizi: Dizide (Örn.FVL) oluşabilecek genotiplerin görünümü .....	30
Şekil 7. LC FVL primerlerinin bağlanarak çoğalttıkları gen bölgesi .....	35
Şekil 8. Çocuklarda trombüs geçirme yaşı dağılımı .....	43
Şekil 9. Kaplan – Meier analizi sonucunda elde edilen sağ kalım eğrisi .....	44



## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim</b>	<b><u>Resim No:</u></b>
<b>Resim 1.</b> Damar hasarlanmasına cevap olarak tıkaç oluşumu .....	10
<b>Resim 2.</b> Venöz tromboz .....	14
<b>Resim 3.</b> LC cihazında yapılan FVL mutasyonu taramasında gözlemlenen erime eğrisi analizi görüntüsü (Heterozigot (G/A) Genotip Görüntüsü).....	36
<b>Resim 4.</b> LC cihazında yapılan FVL mutasyonu taramasında gözlemlenen erime eğrisi analizi görüntüsü (Homozigot Mutant (A/A) Genotip Görüntüsü) .....	37
<b>Resim 5.</b> LC cihazında yapılan FVL mutasyonu taramasında gözlemlenen erime eğrisi analizi görüntüsü (Yabanıl (G/G) Genotip Görüntüsü) .....	38

## DİZİLERİN LİSTESİ

**Dizi**

**Sayfa No:**

**Dizi 1.** FV geni için gerçek zamanlı pcr ile çoğaltılmış dizi.....35

## SİMGELER DİZİNİ

A	:	Adenin bazı
APC	:	Aktif Protein C
APCR	:	Aktive Protein C Rezistansı
Arg	:	Arginin amino asiti
C	:	Sitozin bazı
Ca <sup>+2</sup>	:	Kalsiyum
°C	:	Santigrat derece
ddH <sub>2</sub> O	:	Deiyonize su
dNTP	:	Deoksinükleotid tri fosfat
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DVT	:	Derin Ven Trombozu
EDTA	:	Etilendiamintetraasetikasit
FVL	:	Faktör V Leiden
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
bç	:	Baz çifti
kDa	:	Kilo dalton
MgCl <sub>2</sub>	:	Magnezyum klorür
M	:	Molar
mM	:	Milimolar
ng	:	Nanogram
p	:	Kromozomun kısa kolu
pcr	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	:	Pikomol
q	:	Kromozomun uzun kolu

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kan, endotelle kaplı kan damarları içinde dolaşır. Damar zedelendiğinde, kanamayı durdurmak için tromboz olayı ile trombüs adı verilen kan pıhtısı oluşur. Tromboz olayı, kanamaya karşı verilen fizyolojik bir yanıttır. Kan pıhtılaşma akışındaki dzenleyici mekanizmalar ve antifibrinolitik mekanizmalar kan akışını engelleyebilecek rastgele pıhtılaşmaları önler. Bu mekanizmalardaki bozukluklar tromboza neden olur (Smith 2007). Normal fizyolojik koşullarda prokoagulant ve antikoagulant mekanizmalar dengededir. Dengenin bozulması halinde; tromboemboli ya da kanamayla kendini gösteren patolojik durumlar ortaya çıkar (Eskandari et al. 2002). Normal bir koagulasyon akışında hasarlı damarda kanın pıhtılaşması normal hemostazı sağlarken, sağlam damar içinde pıhtılaşmanın meydana gelmesi tromboza neden olmaktadır. Bunun dışında; pıhtının bir bölümü koparak kan akışıyla başka bölgelere sürüklenen bir emboli oluşturabilir. Hem tromboz hem de embolizm sonucunda hücre ve dokuların ölümü yani infarkt meydana gelmektedir. Beyin, kalp ve akciğerde oluşan tromboembolitik infarktlar gelişmiş ülkelerde başta gelen ölüm nedenlerindedir (Kumar et al. 1992). Amerika'da 2008 yılı ağustos ayında "National Quality Forum" (NQF) tarafından açıklanan rakamlara göre: 900.000 DVT hastasından 500.000 hasta pulmoner emboli (PE) geçirmiş, bu hastalardan 300.000'i hayatını kaybetmiştir. Bu rakamlar neticesinde Amerika'da hastane ölümlerinde en sık gözlenen nedenin PE olduğu ve bunun ölüm nedenleri arasında ilk üç arasında olduğu belirtilmiştir (Dipaola 2008).

Tüm dünyada en önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olan trombozun oluşumu multifaktoriyeldir. Çok sayıda kalıtsal ve edinsel faktörün çeşitli mekanizmalarla tromboz oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Rossendaal 1999). Arteriyel ve venöz sistemde farklı etiyolojilerin rol oynadığı düşünölmektedir. Arteriyel sistemde; endotel hasarı ve trombosit fonksiyon bozuklukları tromboz oluşumuna neden olurken, venöz sistemde çoğunlukla pıhtılaşma sistemini kontrol altında tutan doğal inhibitör mekanizmaların bozuklukları gözlenmektedir (Bucciralli et al. 1999).

Kalıtsal risk faktörlerinin başında Aktif Protein C direnci oluşturarak tromboza neden olan Faktör V Leiden (FVL) mutasyonu gelmektedir. FV geninde oluşan nokta mutasyonu

sonucunda (1691 G→A) FV molekülünün doğal antikoagulan Protein C – Protein S sistemine karşı duyarlılığı azalmakta ve aktif Protein C' ye karşı direnç oluşmaktadır. FVL sıklığı bir ülkeden diğerine, bölgeden bölgeye ve etnik gruplara göre değişkenlik gösterir (Bertina 1997). Kalıtsal trombofilili ailelerde FVL sıklığının protein C, protein S ve antitrombin eksikliğinden daha yüksek olduğu bilinmektedir (Zolle et al. 1995, Bertina 1997, Rosendaal 1997)). Sağlıklı Türk toplumunda %9 FV G1691A taşıyıcısı bulunmaktadır. Bu oran Antalya bölgesinde %17, Kıbrıs Türklerinde ise %12,2 olarak saptanmıştır. Ailesel trombofililerde ortalama %2 – 13 civarında olmakla birlikte Türkiye'de %7,1 civarında olduğu rapor edilmiştir (Akar 1997).

Pediyatrik yaş grubunda tromboz sıklığı erişkin yaş grubundan daha az olmakla birlikte son yıllarda giderek artan sıklıkta tanımlanmaktadır. FVL en sık rastlanan konjenital trombofilili nedenidir. Sıklığın yüksek olduğu toplumlarda risk altındaki bireylerin önceden bilinmesi, gerekli önlemleri alarak tromboz gelişimini engelleyebilir (<http://www.guncelpediyatri.com/yazilar.asp?yaziid=76&sayiid>).

Bu çalışma; çocukluk çağında oluşan tromboz olgularında Faktör V 1691 G – A değişiminin tromboz oluşuma etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. HEMOSTAZ

Kan; gaz taşınımı, metabolizma, immün savunma ve hormonlar yoluyla hücreler arası iletişim dahil birçok fizyolojik olayı düzenler. Kan sıvı halini korumak zorundadır. Sıvı halini korumak amacı ile yaralanma sonrasında koagülasyonu sağlar (Guyton and Hall 1996). Koagülasyon, enzimatik reaksiyonlar dizisidir. Pıhtılaşma sürecinde çok sayıda kofaktör yer alır (Ulutin T vd. 2000). Bütün bu aktivitelerin toplamı “Hemostaz” adını alır. Hemostaz 3 ana elementten oluşur (Guyton ve Hall 1996).

1. Vasküler Endotel
2. Trombositler
3. Koagülasyon Sistemi

#### 2.1.1. Vasküler Endotel

Kan damarlarının çeperi endotel hücrelerinden oluşan ince bir tabakadan oluşur. Damar endoteli, nontrombojenik iç yüzey oluşturmasının yanında seçici geçirgenlik görevini de üstlenir. Travma ve bazı damar hastalıklarında bu işlevsel yüzeyin bozulması trombositlerin ve koagülasyon sisteminin aktivasyonuna izin veren değişikliklerle sonuçlanır (Noll ve Lusner 1995).

Damar endotel hücrelerinin dış membranı antitrombotik özelliklerden sorumludur. Hücre membranının yüzeyi heparan sülfat gibi karmaşık mukopolisakkaritlerden oluşan glikokaliks tabakasıyla kaplıdır. Heparan sülfat AT-III adı verilen doğal antikoagulanı üretmektedir. AT-III, fibrinojeni fibrine dönüştürmekten sorumlu enzim olan trombini inhibe eder. Dış membran ayrıca bazı reseptörleri de içerir. Bir membran reseptörü olan

trombomodulin, trombinle etkileşir ve Protein C'yi aktif hale dönüştürür. Aktive olan Protein C, Faktör V ve Faktör VIII'i inaktive eder. Ayrıca Protein C damar endotelini uyarak "Doku Plazminojen Aktivatörü" nün (TPA) salgılanmasını sağlar. TPA, plazminojeni plazmine dönüştürür. Plazmin, fibrinin parçalanmasından sorumlu olan proteolitik bir enzimdir. Damar endoteli bunların dışında prostasiklin ve diğer antitrombotik özellikleri ileleten maddelerin üretiminden sorumludur. Prostatiklin trombosit aktivasyonunu inhibe eder ve kan damarının çapını arttırarak vazodilatasyonu uyarır (Noll ve Lusner 1995).

Endotel hücreleri hemostazda önemli kollajen tip IV gibi bileşenleri de üretir. Kollajenler, damar hasarı sonrası hasarlı olan subendotel ile trombositlerin etkileşimini sağlarlar. Fibronektin gibi nonkollajen proteinler ise hücre aglütinasyonu, agregasyonu ve adezyonunda rol oynarlar (Noll ve Lusner 1995).

Damar endotel hücreleri Faktör VIII'i de kısmen sentezler. Faktör VIII, aktive olmuş trombosit membranı üzerinde özgün bir reseptörle bağlanarak trombosit adezyonunu kolaylaştırır (Noll ve Lusner 1995).

### **2.1.2. Trombositler**

Trombositler, kanda bulunan, 2 – 4 µm çapında, yuvarlak ya da oval şekilli, nükleusu olmayan küçük hücrelerdir. Kandaki normal konsantrasyonları 150.000 – 350.000/mm<sup>3</sup>'tür (Terzioğlu vd. 1993).

Trombositler kemik iliğindeki megakaryositlerden üretilir. Megakaryositler, kemik iliği kök hücrelerinden farklılaşır. Megakaryosit olgunlaşırken, çok loblu bir çekirdek ve genişlemiş sitoplazmaya sahip bir hücre vermek üzere hücre bölünmesinin eşlik etmediği senkronize çekirdek replikasyonlarına uğrar. Yaklaşık 8 çekirdekli evreye geldiğinde sitoplazma granüllü bir yapı alır ve trombositler sitoplazmadan tomurcuklanarak ayrılır. Tek bir megakaryosit yaklaşık 4000 trombosit verir. Başlıca rolü damarın hasar noktasında mekanik tıkaçlar oluşturmak ve pıhtılaşma olayı ile damar onarımı için düzenleyiciler salgılamaktır (Smith 2007).

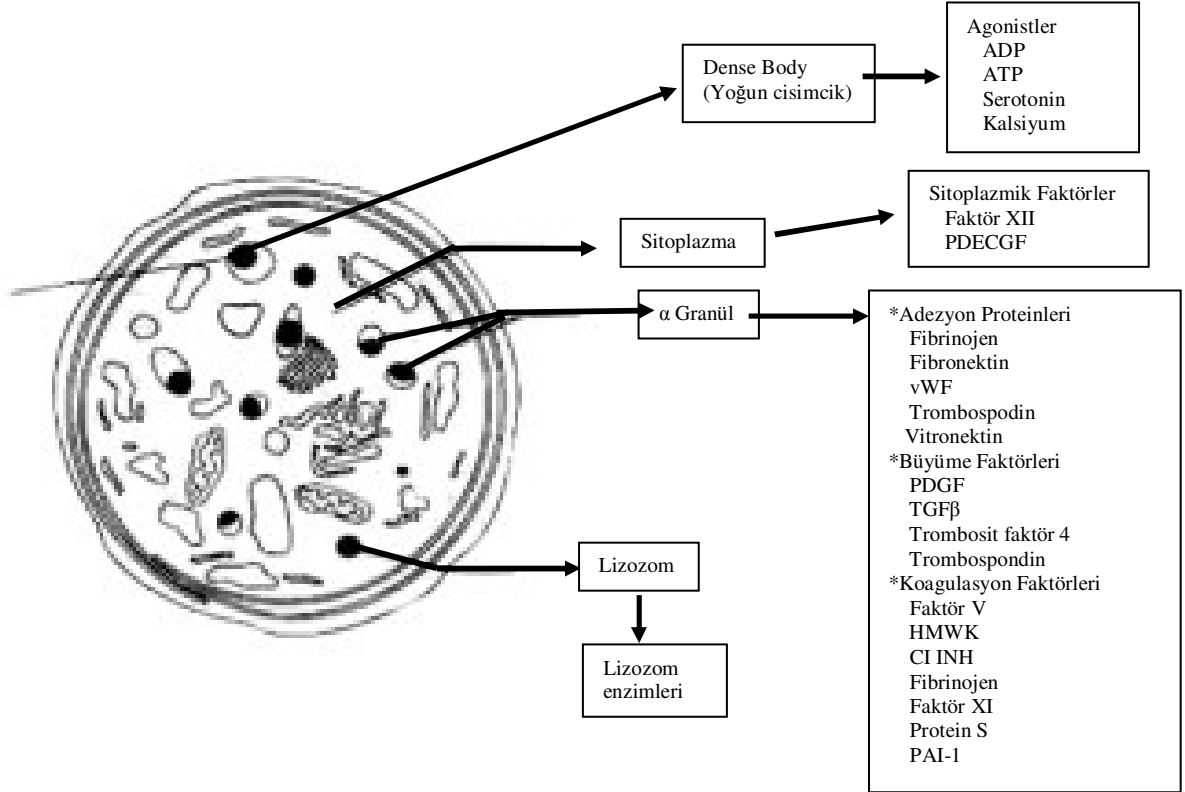
Aktive edilmemiş (pıhtı oluşumuna katılmamış) trombositte plazma zarı, hücre içine doğru ileri derecede ceplenmeler yaparak bir açık zar sistemi oluşturur. Plazma zarında pıhtılaşma olayını hızlandıran reseptör ve fosfolipitlerin bulunması nedeniyle bu zar sistemi pıhtılaşma tepkimeleri için potansiyel olarak kullanılabilir zar yüzey alanını önemli derecede artırır. Trombositin içinde mikroflamanlar ve yaygın bir aktin/ miyozin sistemi bulunur. Endotel hasarına yanıt olarak trombositin aktive olması, kontraktıl elemanlara  $Ca^{+2}$ 'un bağlanmasıyla değişim oluşur ve bunlar da plazma zarının mimarisini önemli ölçüde değiştirir. Uzun yalancı ayaklar oluşur ve bu da pıhtı oluşumu başladığında zarın yüzey alanını genişletir (Smith 2007).

Trombositler 3 tip granül içerir. Bunlardan ilki elektron yoğun cisimcikler olup Ca, adenozin difosfat (ADP), adenozin trifosfat (ATP) ve serotonin içerir. İkinci tip granül  $\alpha$  tanecik olup; heparin antagonisti, trombositin türeyen gelişme faktörü,  $\beta$ -tromboglobülin, fibrinojen, von Willebrand faktörü (vWF) ve diğer pıhtılaşma faktörlerini içerir. Üçüncü tip granül lizozomal granül olup hidrolitik enzimler taşır. Aktivasyon sırasında bu granüllerin içerikleri salgılanır (Smith 2007).

Kan pıhtılaşması sırasında trombosit işlevine 3 temel mekanizma katılır: Yapışma, Kümelenme, Salgilama. Yapışma trombosit aktivasyonu ile gelişen bir dizi reaksiyondur ve trombosit granüllerinin içeriklerinin salgılanmasına yol açar. Yapışma basamağı esas olarak; trombositlerin damardaki hasarlı noktalara yapıştığı zaman görülen trombosit – subendotel etkileşimini tanımlar. Damar hasarı; kollajeni, vWF'yi ve diğer bileşenleri açığa çıkarır. vWF, endotel hücreleri ve megakaryositlerde sentezlenen bir proteindir. Subendotelde, özgül trombosit taneciklerinde ve dolaşımında Faktör VIII'e bağlı halde bulunur. Trombosit hücre zarı, kollajen ve vWF' ye bağlanan, trombositin subendotele yapışmasına neden olan glikoproteinler içerir. Glikoprotein (integrin  $\alpha 2\beta 1$ ) yardımıyla kollajene bağlanan trombositlerin şekli yassıdan küreye değişir ve uzun yalancı ayaklar çıkarak trombosit – trombosit etkileşmelerini teşvik eder. Şekil değişikliğiyle birlikte  $\alpha$  granüller ve yoğun cisimcikler yüzey sistemi içine bileşenlerini salarlar ve bu bileşenler trombosit membranının iç kısmına ve çevresine yerleşir. Granüllerin boşalmasıyla birlikte trombosit aktivatörü olan ADP



salınımı da gerçekleşir. ADP, aktive olmuş trombositlerin şişmesini, trombosit – trombosit temasını ve yapışmasını sağlar. ADP uyarımı olmaksızın trombosit kümeleşmesi gerçekleşemez (Smith 2007). Agregasyon, trombosit ya da hemostatik tıkaçın oluşumuyla sonuçlanır ve değişiklikler koagulasyon faktörlerinin fibrin oluşturmak için etkileşeceği yüzeye destek verir. Trombosit tıkaçı daha sonra kan pıhtısına dönüşür (Lee vd. 1993).



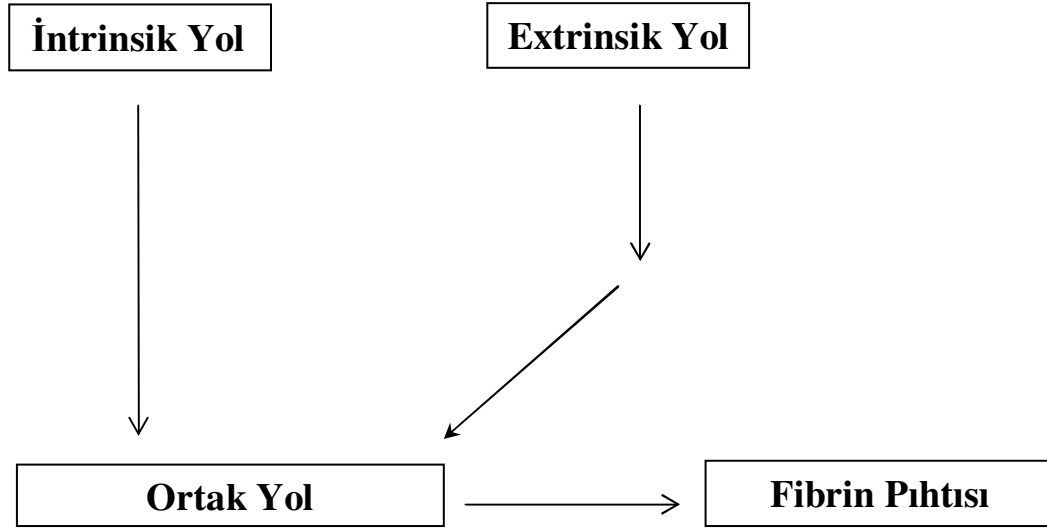
**Şekil 1.** Trombosit içi granüllerin içerikleri (Celkan 2003)

### 2.1.3. Koagulasyon Sistemi

Koagulasyon, sıvı haldeki kanın katılaşıp akamaz duruma gelmesidir. Koagulasyon akışı; esas olarak enzimler veya kofaktörler olarak etki eden proteinlerden meydana gelmiştir. Bu proteinler, plazmada zimojenler halinde bulunurlar. Söz konusu öncül proteinler polipeptit zincirinin bir veya daha fazla noktadan kesilmesi ile aktive edilir. Bu proteinlerin işlevi hasar noktasında trombin oluşmasını ve bunun bu nokta ile sınırlı kalmasını hızlandırmaktır. Başarılı ve uygun zamanda trombüs oluşumunun kilit noktası, bu zimojenleri aktive eden proteazların düzenlenmesidir (Smith 2007).

Kofaktör proteinler (doku faktörü, Faktör V ve VIII) diğer faktörler için bağlanma noktaları görevi yapar. Doku faktörü yapı olarak diğer kan pıhtılaşma faktörleri ile ilişkili değildir ve aktif işlev görmesi için kırılmaya gereksinimi olmayan yapısal bir zar proteindir. Faktör V ve VIII profaktörler olarak görev yaparlar ve kırılarak aktive edildiklerinde diğer faktörler için bağlanma noktası oluştururlar. Bu proteinlerin dışında Protein C ve Protein S düzenleyici proteinlerdir. Sadece Protein C proteolitik kırılma ile düzenlenir ve aktive olduğu zaman bir serin proteazdır (Smith 2007).

Koagulasyon reaksiyonu, intrinsik, ekstrinsik ve ortak yol olmak üzere üç sisteme bağlı olarak gelişir. İntrinsik sistem, dolaşımdaki kanda bulunan prokoagulan yapılardır. Ekstrinsik sistem, kanda bulunan ve vücut dokularından kökenlenen enzimleri kullanır. Her iki yolda da bir grup enzim, kofaktör ve iyondan oluşan ve protrombini aktif trombine dönüştüren protrombin aktivatör kompleksi adı verilen bir kompleks oluşturulur. Sonra aktive olmuş trombin, fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalizler (Altınışık 2001).



**Şekil 2.** Koagulasyon Sistemi

### 2.1.3.1. Ekstrinsik Yol

Koagulasyon mekanizması, bir transmembran proteini olan ve hücre bütünlüğü bozulunca kanla temas eden doku faktörünün Faktör VII'yi aktive ederek başlar. Başlangıç fazı olarak adlandırılan bu fazda; TF (Tissue factor), F VII/ VIIa ile çok güçlü bir bağ oluşturur. FVII plazmada inaktif enzim (zimojen) olarak dolaşırken sadece %1 veya daha az bir kısmının aktif form olan FVIIa olarak dolaştığı bilinmektedir. TF' ye bağlandığı an FVII sınırlı bir proteoliz ile FVIIa ya dönüşür. FVIIa, TF ile bağlandığında enzimatik aktivitesi çok belirgin artar. TF membran proteini olduğundan TF – FVIIa kompleksi membran yüzeyine yapışır. Bu şekilde koagulasyon mekanizması sadece lokal olarak gerektiği yerde aktive olur ve bunun sonucunda sınırlı proteoliz ile FIX'u aktive ederken; bir diğer yoldan doğrudan doğruya FX'u FXa'ya dönüştürür. FXa; FVa, FII ve Protein S hep birlikte Protrombinaz adı verilen kompleksi oluşturur ve protrombinin trombine (FIIa) dönüşümü sağlanır. Bu şekilde oluşan trombin ve onun etkisiyle fibrinojenden oluşan fibrin çok düşük düzeydedir. Trombin, fibrinojen molekülünden önce FPA ve FPB (fibrinopeptit A ve B) fragmanlarını kopararak fibrin monomerlerini daha sonra monomerlerin bir araya gelmesi ile fibrin polimerlerini

oluşturur. Trombin aynı zamanda FXIII'ü aktive ederek fibrin polimerlerinin çapraz bağlarının oluşması ve güçlü fibrin pıhtısının meydana gelmesini sağlar (Ferhanoğlu 2003).

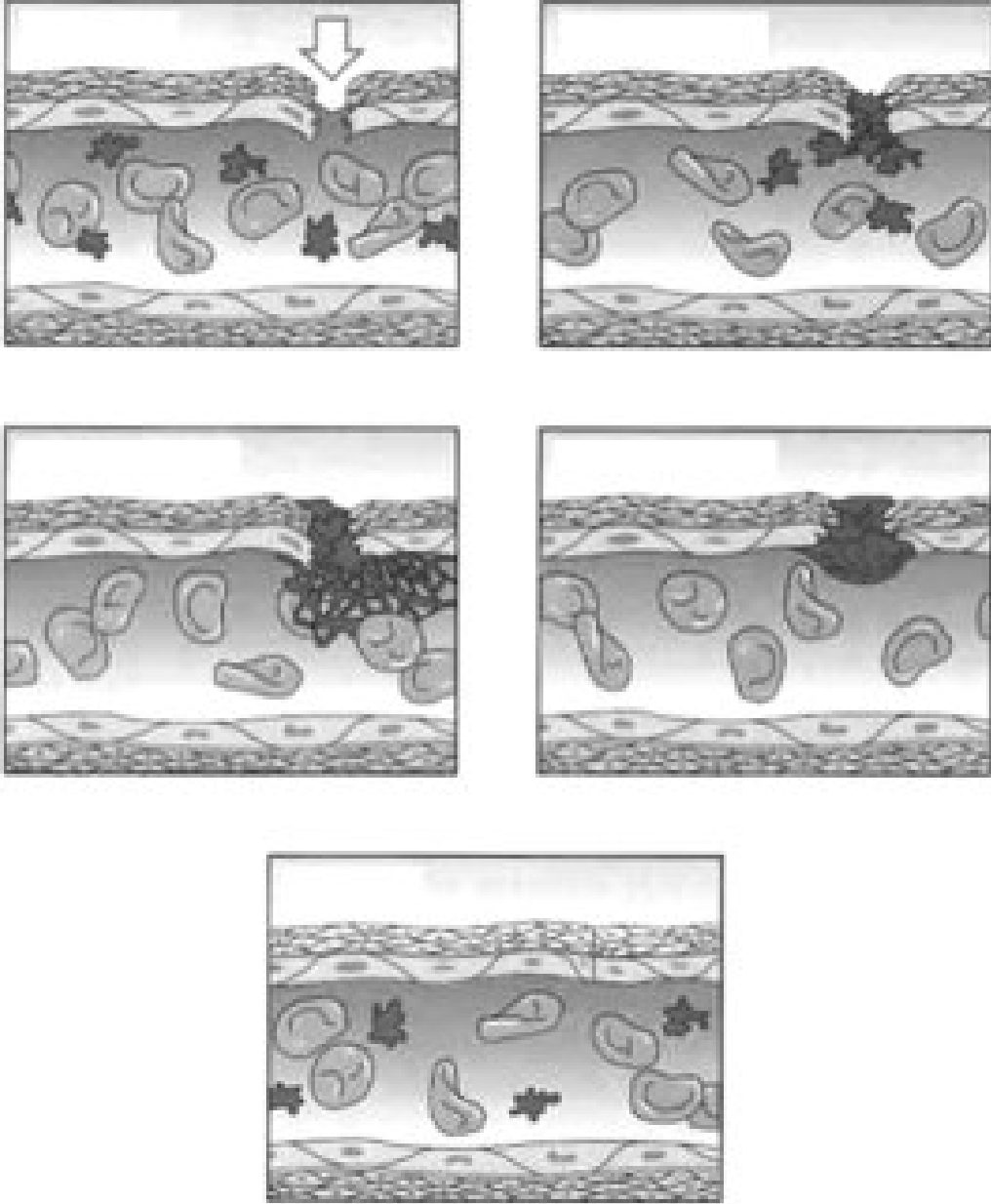
Koagülasyon sisteminde ekstrinsik yol aracılığıyla başlayan ve az miktarda fibrin oluşumu ile sonlanan ilk koagülasyon aktivasyonu endotelden salınan TFPI (Doku Faktör Yolu İnhibitörü, Tissue Factor Patway Inhibitor) aracılığı ile bloke edilir. Bu nedenle devreye intrinsik yol girer (Ferhanoğlu 2003).

### **2.1.3.2. İntrinsik Yol**

İntrinsik yol, trombin aracılığıyla FXI'in aktive edilmesiyle devreye girer. Aktive FXI (FXIa) FIX'u aktive eder. FIXa, kofaktör olarak bulunan FVIII, FX ve trombosit PS'nin TENASE kompleksini oluşturarak FX'u FXa' ya dönüştürür. Bundan sonraki aşamada protrombinaz kompleksi aracılığı ile protrombinin trombine dönüşümü ve fibrinojenden çok daha fazla fibrin oluşumu ile arzulanan düzeyde pıhtı meydana gelir. İntrinsik yolun aktivasyonu ile birlikte yeterli fibrin oluşumunun sağlandığı bu faza gelişme fazı adı verilir (Ferhanoğlu 2003).

### **2.1.3.3. Ortak Yol**

Koagülasyonda, hem intrinsik hem de ekstrinsik yolların son aktivitesi FX'un aktivasyonudur. Aktive olmuş FX, protrombinaz kompleksini oluşturmak için FII, FV, Ca iyonları ve trombosit fosfolipitleri gibi diğer prokoagulanlarla birleşir. Protrombinaz kompleksi protrombinin trombine dönüşümünü katalizler. Trombin dolaşan fibrinojeni fibrine dönüştürür. Koagülasyon süreci, FXIII'ün etkisiyle fibrin stabilizasyonu ile sonlanır (Guyton ve Hall 1996).



**Resim 1.** Damar hasarlanmasına cevap olarak tıkaç oluşumu

## **2.2. HEMOSTAZDA BİYOLOJİK KONTROL**

Koagulasyonu aktive eden her yol aynı seviyede bir inhibitör sistemle kontrol altında tutulmaktadır. Bu şekilde hemostatik mekanizmanın sadece hasar bölgesinde aktive olması ve tamir projesi tamamlanır tamamlanmaz zarar gören vasküler yapının dolaşıma açılması mümkün hale gelir (Ferhanoğlu 2003). Hemostatik cevap kontrol mekanizmalarıyla düzenlenir. En önemlileri:

1. Feed – Back İnhibisyon
2. Fibrinoliz
3. Doğal İnhibitörler

### **2.2.1. Feed – Back İnhibisyon**

Kan koagulasyonunda feed – back inhibisyonunun klasik örneği vücutta trombinin duyarlı kontrolüdür. Trombin, koagulasyonun başlangıcında çok düşük konsantrasyonlarda olduğu için, FV ve FVIII'in oluşum ve aktivitesi üzerine pozitif bir etkisi vardır. Koagulasyonu ilerletmek için bu kritik kofaktörün aktivitesini uyarır. Koagulasyon ilerledikçe, daha yüksek konsantrasyonlarda trombin oluşmaya başlar. Trombin FV ve FVIII'in oluşumunu otokatalitik olarak düzenler. Böylece trombinin oluşumu, hem pozitif hem de negatif feed – back yoluyla koagulasyonun ilerlemesini ya da inhibisyonunu sağlar (Ateş 2001).

Koagulasyondaki benzer etkileşimler FXa – FVII, FVIIa – FXII, trombin – FXIII, FXII'nin aktivasyonu ve prekallikrein'in kallikreine dönüşümü arasında gözlenir (Ateş 2001).

### 2.2.2. Fibrinoliz

Hemostatik bir tıkaçın başarı ile oluşmasından sonra bu pıhtının daha fazla ilerlemesinin önlenmesi zorunludur. Bu olay kısmen kan pıhtılaşmasının durdurulması ve kısmen fibrinoliz olayının başlatılması ile sağlanır. Fibrinoliz, pıhtı içindeki fibrinin, plazminojenden oluşturulan bir serin proteaz olan plazmin tarafından yıkılmasını içerir. Plazminojen dolaşımda yer alan bir serum proteini olup fibrine karşı yüksek bir affinite gösterir ve bu affinite plazminojenin gelişmekte olan pıhtıya yerleşmesini teşvik eder. Plazminojenin etkinliğine plazminojen aktivatörleri olarak bilinen proteinler aracılık eder. Plazminojenin plazminojen aktivatörleri tarafından plazmine çevrilmesi kanın hem sıvı kısmında hem pıhtının yüzeyinde görülür. Aktive edilmiş Protein C (APC), kan pıhtılaşma akışını durdurmasına ek olarak dokulardan plazminojen aktivatörünün salınımını da uyarır (Smith 2007).

Kan koagülasyonu sırasında, plazminojen ve trombin trombüs oluşumunda bir araya gelir. Plazminojen önce fibrine zayıf olarak bağlanır. TPA gibi aktivatörler pıhtının matriksi içine girer ve plazminojenin fibrine bağlanmasını hızlandırır. Böylece plazmine dönüşüm kolaylaşır. Bütün bu aktivite  $\alpha_2$  - antiplazmin inhibitörü tarafından plazminin nötralizasyonunu önleyen kan pıhtı alanı içerisinde lokalize olur (Guyton ve Hall 1996).

### 2.2.3. Doğal İnhibitörler

Pıhtılaşmanın başlamasıyla birlikte doğal inhibitörler ya da antikoagulanlar adı verilen çeşitli proteinler aktive edilir ve pıhtılaşmanın kontrolsüz bir şekilde devam etmesi önlenir. Bunlar; AT-III, Protein C – S Sistemi,  $\alpha_2$  – antiplazmin,  $\alpha_1$  – antitripsin,  $\alpha_2$  – makroglobulin ve C – 1 inhibitör gibi inhibisyon sistemlerini kapsar. Bu inhibitörlerin vücuttaki üretimi prokoagulant substratları nötralize etmek için yeterlidir. Bu inhibitörler sağlıklı koşullarda aşırı aktive olmuş prokoagulanları hızla ve etkin bir şekilde nötralize ederek koagülasyon sürecini düzenler. Bu inhibitörlerin kazanılmış veya konjenital yokluğu hastanın trombotik bozukluklara eğilimi olmasına neden olur (Ateş 2001).

### 2.3. TROMBOZ

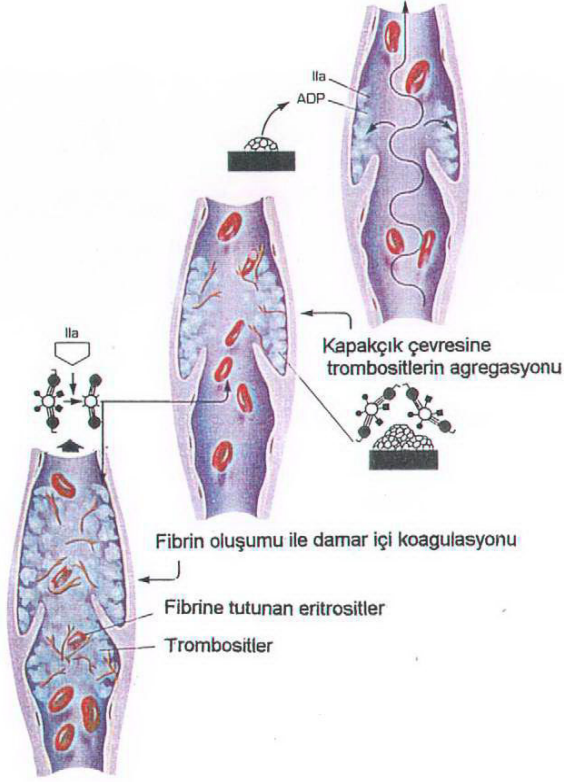
Tromboz; damar içerisinde uygun olmayan yer ve zamanda hemostazın fibrin pıhtısı oluşturmak üzere aktivasyonu ile oluşan patolojik bir olaydır (Ulutin 2000). Hemostatik dengenin korunması için gerekli 3 temel koşul Rudolph Virchow tarafından 19. yüzyılın ikinci yarısında ortaya konulmuştur. Bunlar:

1. Sağlam damar duvarı
2. Normal kan akımı (reoloji)
3. Kanın pıhtılaşma yeteneğinin normal olması (normokoagulabilite)

Virchow triadı olarak da bilinen bu faktörlerden bir ya da fazlasının bozulması hemostatik dengenin bozulmasına ve trombüs gelişimine neden olmaktadır.

Tromboz gelişimi multifaktöriyeldir, çok sayıda edinsel ve kalıtsal faktör değişik mekanizmalarla gelişime katkıda bulunur. Arteriyel sistemdeki trombozlar için temel risk faktörü endotel hasarı iken, ven trombozlarında staz ve kanın pıhtılaşma yeteneğindeki abartılı artış (hiperkoagulabilite) esas etkileyici faktörlerdir. Hiperkoagulabilite varlığında aktif pıhtılaşma faktörlerinin ortamdaki uzaklaştırılmayıp yüksek konsantrasyonlara ulaşmalarına neden olur ve bu süreç pıhtı oluşumuna yol açar. Derin ven trombozları çoğunlukla stazın en bariz olduğu saha olan ven kapakçıklarının ceplerinden başlamakta ve histolojik incelemelerde trombüs lokalizasyonunda endotel zedelenmesi izlenmemektedir. Arteriyel ve venöz sistemlerde trombozu tetikleyen faktörlerin ve trombüs morfolojisinin farklı olmasının temel nedeni vasküler sistemin iki yatakta farklı reolojik özellikler (kanın akış özellikleri ve bunlara bağlı olarak damar duvarı ve kan hücrelerinde gelişen deformasyon) göstermesidir.





**Resim 2.** Venöz tromboz (Melvin 1989)

Kanın damar içinde akışı akım yönü doğrultusundaki bir basınç gradiyentinden kaynaklanır ve değişik mekanik kuvvetler doğurur. Bunlar; damar çeperine dik doğrultuda olan kan basıncı, kan akımının aksi yönünde endotele teğet doğrultuda olan akışkanlık gerilimi ve damar duvarının elastik yapısından kaynaklanan gerilme kuvvetidir. Arteriyel sistemi oluşturan arter ve arteriyollerde, ven ve venüllerden farklı olarak bütün bu kuvvetler yüksek düzeydedir. Bu reolojik özellikler arteriyel tromboz için temel risk faktörü olan aterosklerozun gelişmesini kolaylaştırdıkları gibi, trombositleri uyararak adezyon ve agregasyon yeteneklerini arttırmaktadırlar. Dolayısıyla bir arteriyel tromboz durumunda trombositler daha potent olarak pıhtılaşma sürecine katılmaktadırlar (Büyükaşık 2005).

Özetle; venlerde kan akımı daha yavaş olduğu için venöz trombozların gelişmesi arteriyel trombozlara göre daha sıktır ve venöz trombozlarda endotel lezyonunun trombüse yol açması seyrek görülen bir nedendir. Venöz trombüsler genellikle bol fibrin, az miktarda trombosit ve birçok alyuvardan oluşur. Arteriyel trombüslerde damar çeperlerindeki stres ve turbulans çok

fazladır, endotelial değişiklikler ve ateromatoz değişiklikler vardır, trombositler kolayca agrege olur (Dünder 2005).

**Tablo 1.** Edinsel Tromboz Nedenleri (İliçin vd. 1996)

<b>Venöz Tromboz</b>	<b>Arteriyel Tromboz</b>
Şişmanlık	Ateroskleroz
Doğum kontrol hapları	Erkek cinsiyet
Varisli venler	Aşırı sigara tüketimi
İnfeksiyon	Hipertansiyon
Travma	Diabetes mellitus
Cerrahi	LDL kolesterol
Genel anestezi	Trigliserid
Gebelik	Polisitemi
Kanser	Sol ventrikül hipertrofisi
Hareketsizlik	Doğum kontrol hapları ve östrojenler
Konjestif kalp yetmezliği	Lipoprotein (a)
Nefrotik Sendrom	Kan protein bozuklukları
Kan protein bozuklukları	

**Tablo 2.** Belirlenmiş Kalıtsal Tromboz Risk Faktörleri (Akar vd. 2005)

	<b>Sıklık (Normal)</b>	<b>Sıklık (Trombozlu)</b>
AT eksikliği	0,02	1
Protein C eksikliği (PC)	0,2	3
Protein S eksikliği (PS)	0,1	1,2
APC direnci/FV 1691 G-A	7 – 10	20
FV 4070 G-A	7	
Protrombin 20210 A alleli	1 – 2	6
Disfibrinojenemi	<0,01	<0,1
Homosistinüri	<0,01	<0,1
Trombomodulin defekti	<0,01	<0,01
Plasminojen eksikliği	?	+
Heparin Kofakör II eksikliği	?	+
Faktör XII eksikliği	?	+
Faktör VIII yüksekliği	11	63
Faktör IX yüksekliği	2,5	5,5
Faktör XI eksikliği	?	?
Lipoprotein (a) yüksekliği	13	30

## 2.3.1. Kalıtsal Tromboz Risk Faktörleri

### 2.3.1.1. Antitrombin (AT) III Eksikliği

Kanın damar içerisinde pıhtılaşmasını önleyen doğal antikoagulanlardandır. 65.000 dalton molekül ağırlığında olan karaciğerde sentezlenen bir  $\alpha$ -2 globulindir. Trombin, FXa, FIXa, FXIa, FXIIa,  $\alpha$  PC ve kallikrein gibi diğer serin proteazları inaktive ederek pıhtılaşma sürecinin çeşitli aşamalarında antikoagulan etki gösterir. Heparin varlığın trombin ve FXa üzerine etkisi çok şiddetli ve ani olur (Atakan 2006).

Antitrombin geni; 1. kromozomun q 23 – 25 bölgesinde lokalize olan, 6 intron ve 7 ekzondan oluşan 16 kilobazlık (kb) bir gendir. Gende oluşan çeşitli mutasyonlar Tip I ve Tip II antitrombin eksikliğine neden olur.

Tip I Antitrombin Eksikliği: Antitrombin allellerinden birinin delesyonu ya da genin kodlama dizilerindeki anlamsız, yanlış anlam veya çerçeve kayması mutasyonları sonucu oluşur. Bugüne kadar Tip I antitrombin eksikliğine neden olan çok sayıda delesyon ve nokta mutasyonu bildirilmiştir (Bick 1998). Hastaların çoğu heterozigottur. Homozigot antitrombin eksikliği çok nadirdir ve yaşamla bağdaşmaz. 1966 -1999 yılları arasında sadece 7 vaka bildirilmiştir (Güneş vd. 2004). AT III antijeni ve aktivitesi birlikte azalmıştır (İliçin vd. 1996).

Tip II Antitrombin Eksikliği: Nokta mutasyonları sonucu oluşur. AT molekülünün serum düzeyi normaldir ancak fonksiyonu yetersizdir. Antitrombin aktivitesi düşük, antijenleri normaldir (Esmon 2001). Tip II' nin RS, HBS ve PE tipleri mevcuttur.

AT III eksikliğinin sıklığı, trombozlu hastalarda %1, genel toplumda % 0,02 dir (Akar vd. 2005).

### 2.3.1.2. Protein C (PC) Eksikliği:

İlk kez 1960' da bulunan, K vitaminine bağımlı bir protein olan Protein C, 60.000 dalton molekül ağırlığında, karaciğerde sentezlenen, pıhtılaşma sisteminin önemli bir inhibitörüdür. Pıhtılaşmayı önleyici etkisini asıl olarak FVa ve FVIIIa' yı inaktive ederek gösterir. Fibrinolizi hızlandırıcı etkisi de vardır. Bu etkileri gösterebilmesi için; önce trombin tarafından aktive edilerek aktive Protein C (aPC)' ye dönüşmelidir. Pıhtılaşma sırasında oluşan trombin, Trombomodulin adı verilen endotel hücre reseptörüne bağlanınca fibrinojeni fibrine dönüştürme (prokoagulan) özelliğini kaybeder; aksine PC'yi aktive eder, yani antikoagulan özellik kazanır. APC' nin FVa ve FVIIIa üzerindeki proteolitik etkisi, diğer bir K vitaminine bağlı faktör olan Protein S varlığında önemli derecede artar. FV' inde APC' nin FVa ve FVIIIa üzerindeki inhibe edici etkisini arttıran bir kofaktör olduğu gösterilmiştir. APC başlıca Platelet Aktivatör İnhibitörü 3 (PAI - 3),  $\alpha$ -1-antitripsin ve Antitrombin III tarafından inhibe edilir (Atakan 2006).

Protein C geni, 2. kromozomun q13 – 14 bölgesinde lokalize olan, 9 ekzon, 8 introndan oluşan 11 kb uzunluğunda bir gendir (Bick ve Kaplan 1998). Bugüne kadar Protein C geninde çok sayıda yanlış anlam mutasyonu, çerçeve kayma mutasyonu, sessiz mutasyon, anlamsız mutasyon, in-frame mutasyon, promotor bölge mutasyonu, 5' UTR (UnTranslated Region) mutasyonu ve ins/del mutasyonu bildirilmiştir (Ateş 2001, Lane 1996). Klinikte ise 2 farklı tip PC eksikliği tanımlanmaktadır.

Tip I PC Eksikliği: Delesyon, yanlış anlam ve anlamsız mutasyonlar Tip I PC eksikliğine neden olmaktadır (Bick ve Kaplan 1998). Proteinin moleküler yapısı normaldir, antijen ve aktivitesi azalmıştır (Esmon 2001).

Tip II PC Eksikliği: Yanlış anlam mutasyonları neden olmaktadır (Lane 1996). Antijenik PC miktarı normal, fakat molekül bozuk ve işlevsizdir (İlçin vd 1996).

Protein C eksikliği bulunan hastaların çoğu Tip I heterozigottur (Ateş 2001). Homozigot PC eksikliğinde; doğumdan hemen sonra arteriyel ve venöz kapillerlerde yaygın

tromboz, bir veya daha fazla ekstremitede hızla yayılan purpura, nekroz ve gangren ile seyreden, mortalite oranının %50'den fazla olduğu bir tablo olan purpura fulminansa neden olur (Güneş 2004). Geç adolesan döneminde tekrarlayan derin ven trombozu ve akciğer embolileri, warfarine bağlı deri nekrozu kalıtsal PC eksikliğini düşündüren belirtilerdir (Esmon 2001).

Kalıtsal PC eksikliğinin sıklığı trombozlu hastalarda %3, genel toplumda ise % 0,2'dir (Akar vd. 2005).

### **2.3.1.3. Protein S Eksikliği**

İlk kez 1977' de bulunan, K vitaminine bağımlı bir protein olan Protein S, 70.000 dalton molekül ağırlığındadır. Endotelde, karaciğerde, megakaryositlerde ve testis Leydig hücrelerinde sentezlenir. PC' nin FVa ve FVIIIa'yı inaktive ettiği reaksiyonların kofaktörüdür. PS, normalde plazmada ve trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinde bulunur. Plazma PS miktarının yaklaşık %40 – 50'si C4b - bağlayıcı protein (C4bBP)' e bağlı, %50 – 60' ı serbesttir. Aktif olan kısmı serbest PS' dir. Bağlı PS ile denge halindedir. C4bBP'nin yaklaşık %50'si PS' yi bağlar (Atakan 2006).

Protein S geni; 3. kromozomun p11,1 – 11,2 bölgesinde lokalize olan, 15 ekzon ve 14 introndan oluşan 80 kb uzunluğunda bir gendir. Çoğu nokta mutasyonu olmak üzere 13'den fazla mutasyon bildirilmiştir. 3 tip PS eksikliği tanımlanmıştır (Esmon 2001).

**Tip I PS Eksikliği:** Tip I eksikliğine neden olan mutasyonların çoğu nükleotid değişimi, delesyon ve insersiyonlardır. Total PS antijeni, serbest PS antijeni ve PS aktivitesi birlikte azalmıştır (İliçin vd. 1996).

**Tip II PS Eksikliği:** Tip II eksikliğine neden olan 5'i yanlış anlam, 1'i kırılma bölgesi mutasyonu olmak üzere 6 mutasyon bildirilmiştir (Altınışık 2001).Serbest PS düzeyi düşük, Total PS düzeyi normaldir (İliçin vd. 1996).

Tip III PS Eksikliği: 9'u yanlış anlam, 11'i nükleotid değişimi olmak üzere 10 mutasyonun Tip III PS eksikliğine neden olduğu bildirilmiştir (Altınışık 2001). Yalnızca PS aktivitesi düşüktür (İliçin vd 1996).

Homozigot PC eksikliğinde görülen yenidoğan purpura fulminansı Homozigot PS eksikliğinde de görülebilir. Sık görülen belirtileri; yüzeysel tromboflebit, derin ven trombozu ve akciğer embolisidir (İliçin vd 1996).

Kalıtsal PS eksikliğinin sıklığı trombozlu hastalarda %1,2, genel toplumda 0,1' dir (Akar vd. 2005).

#### **2.3.1.4. Hiperhomosisteinemi**

Homosistein, metioninden sentezlenen bir aminoasittir. Homosistein metabolizmasında rol oynayan enzimlerin aktivitelerinin eksikliği hiperhomosisteinemi ve homosistinüri ile sonuçlanır. Homosistein düzeylerinde yükselmenin gerek arteriyel, gerekse venöz tromboza eşlik edebildiği bildirilmiştir. Plazma normal değerleri 5–15 mikromol/L olmakla beraber genellikle >50 mikromol/L değerlerde tromboza yatkınlığın arttığı bildirilmiştir. Çocukluk döneminde değerler yaşa göre değişir (Altuntaş vd. 2004). Hiperhomosisteinemi; endotel hücrelerine direkt toksik etki, protein C aktivasyonunun inhibisyonu, endotelyal doku faktörü salınımının artması, endotel hücresi yüzeyindeki heparin sülfatın baskılanması, trombosit adhezivitesinin artışı, nitrit oksit sentezinin azalması, LDL-kolesterolün yoğun küçük parçalara ayrılmasına yol açarak ateroskleroz, venöz ve arteriyel tromboza yol açar.

Homosistein metabolizmasında rolü olan enzimlerin düzeylerini etkileyen genlerdeki değişimler hiperhomosisteinemi oluşmasına yol açar. Sülfhidril aminoasit olan homosisteinin metionine dönüşümünde metilentetrahidrofolatredüktaz (MTHFR) enzimi gereklidir (Güneş vd. 2004).

MTHFR (677 C – T; Ala – Val) yaygın olarak rastlanan bir mutasyondur. MTHFR 677T'yi taşımak homosistein düzeyinin yükselmesine neden olur ki, bu da tromboza yatkınlık

yaratır. MTHFR 1298 (A – C) değişiminde, glutamat yerine alanin geçerek, MTHFR aktivitesini azaltır, bu da homosistein düzeylerinin yükselmesine neden olur (Akar vd. 2005). Homozigot mutasyon sıklığı sağlıklı toplumda % 5–17 arasında değişir. Hiperhomosisteineminin tromboz riskini 2,5 kat arttırdığı bildirilmiştir. Annede olan C677T mutasyonunun spina bifida için 2,9 – 3,7 kat risk artışına yol açtığı bildirilmiştir. Yine akut lösemi, lenfoma, kolorektal kanser gibi malignitelerde tümör baskılayıcı genlerdeki DNA'nın hipometilasyonunda artış ve/veya DNA içindeki urasilin birleşmesinde hataya yol açarak malignite riskini arttırdığı düşünülmektedir (Güneş vd. 2004).

### **2.3.1.5. Faktör VIII ve FIX Yüksekliği**

Faktör VIII ve FIX düzeylerinin azalması, klinik olarak karşımıza Hemofili hastalığı olarak çıkmaktadır. Bireydeki FVIII düzeyi ile FIX düzeylerinin artmasıyla tromboza yatkınlık arasında bir paralellik kurulmuştur. Tromboza yatkınlık FVIII düzeyinin yüksekliği ile orantılı olarak artmaktadır. Avrupa'da sıklığının sağlıklı bireylerde %10 dolaylarında olduğu bildirilmektedir. Faktör V 1691 G – A mutasyonunu taşıyan bireylerde de ek bir risk faktörü olarak göze çarpmaktadır. Akut faz, FVIII düzeyini etkilemektedir. Tekrarlayan trombozlardan sorumlu olabilir. FIX düzeyinin sıklığı ise % 4 – 5 oranındadır. Her ikisinin birlikte yüksekliği ile tromboz riski artmaktadır.

Faktör VIII yüksekliği normal bireylerde %11, pediatrik trombozlu hastalarda %63; Faktör IX yüksekliği normal bireylerde %2, Türk pediatrik trombotik hastalarda %5,5' dir (Akar vd. 2005).

### **2.3.1.6. Lipoprotein (a)**

Lip (a) LDL metabolizmasının dışında karaciğerden üretilir. 6. kromozomda plasminojen genine çok yakın bir konumda bulunur (Güneş vd. 2004). Majör protein komponenti apolipoprotein (a)'dır. Aterojenik ve atrombojeniktir. Plasminojenin pıhtıya bağlanmasını plasminojen benzeri birimleri sayesinde ve fibrinolizisin gerçekleşmesini önleyerek trombozu uyarmaktadır.



Lip (a) düzeyinin yüksek olması inme riskini oluşturmaktadır. Çocukluk çağında 30 mg/dl üzerindeki Lp(a) spontan inme için riski 1,6 kez arttırmaktadır. Bu sınır düzey 30 mg/dl olarak bilinmektedir. Sıklığı normal bireylerde %13, trombozlu hastalarda %30' dur (Akar vd. 2005).

### **2.3.1.7. Trombomodulin ve EPCR**

Trombomodulin Esmon ve Owen tarafından, trombinin Protein C'yi aktive etmesini arttıran ve endotelial hücre yüzeyinde bulunan nonenzimatik bir kofaktör olarak tanımlanmıştır. Trombin trombomoduline bağlandığında, prokoagulan etkisini kaybederek antikoagulan bir enzim gibi davranır. Çünkü bu bağlanma sonucunda trombin pıhtı oluşturma ve trombosit aktivasyonu yeteneğini kaybeder.

Trombomodulin birçok bölgeden oluşan bir transmembran proteindir. Bunlar N-terminal lektin-benzeri bölge, 6 EGF (epitelial büyüme faktörü) bölgesi, serin/treoninden zengin bölge, transmembran bölge ve intraselluler C-terminal kuyruktur. EGF4 protein C' ye bağlanarak, EGF5 ve 6 ise trombine bağlanarak protein C aktivasyonunda rol alırlar. Trombomodulin geni 20. kromozomun p12 bölgesinde lokalize olup, 3.7 kb uzunluğundadır ve intron içermemektedir.

Trombomodulinin herediter eksikliğinin klinik önemi henüz tam bilinmese de, tromboz için artmış riske sebep olabilir.

EPCR (endotelial protein C reseptörü) ise ilk kez Fukudome ve Esmon tarafından 1994'te klonlanmış ve hem protein C hem de APC'yi bağlayabildiği gösterilmiştir. EPCR, CD1/MHC class 1 molekülüne homolog bir integral membran proteindir. Molekül ekstraselluler bir N - terminali, transmembran bölge ve stoplazmik arginin – arginin – sistin - COOH kuyruğundan oluşmaktadır. EPCR, trombin + trombomodulin kompleksinin protein C' yi aktive etme hızını 5 kat artırır. EPCR geni 20. kromozomun q11.2 bölgesinde lokalize olup, 6 kb uzunluğunda, 4 ekzon ve 3 introndan oluşmaktadır (Haliloğlu 2004).

### 2.3.1.8. Protrombin 20210 Mutasyonu

Protrombin molekülü; karaciğerde sentezlenen 69.000 dalton molekül ağırlığında, vitamin K'ya bağımlı, 579 aminoasit içeren, yaklaşık %10'u karbonhidrattan oluşan tek zincirli bir glikoproteindir. Hidroliz ile trombin molekülüne dönüşerek fibrinojenden fibrin oluşumunda görev alır (Stefano vd. 1998).

Protrombin FXa/Va kompleksi tarafından 271. ve 320. pozisyonlardan kesilir. Böylece katalitik bölge olan “trombin” ve plazma protrombin aktivasyonunun bir belirteci olan “protrombin fragman 1.2” oluşur. Trombin daha önce bahsedildiği gibi fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalizler, FV, VIII, XI, XIII ve trombositleri aktive eder. Ayrıca trombomoduline bağlanarak protein C'yi aktive eder ( Haliloğlu 2004).

Protrombin geni; 11. kromozomda p11 – q12 bölgesinde lokalize olan, 14 ekzon ve 13 introndan oluşan 21 kb uzunluğunda bir gendir. 5' UTR (UnTranslated Region) ve 3' UTR bölgeleri ile sınırlanmıştır. Bu bölgeler, genin ekspresyonunda regülatör olarak işlev görmektedir (Akar 1999). PT geninde 20210 pozisyonundaki G→A mutasyonu, mRNA'da 3' okunmayan poliadenilasyon bölgesini etkilemektedir (Demiralp ve Akar 2007). Protrombin geninin 3'-untranslated bölgesinin 20210. nükleotidindeki guaninin adenine değişimi, translasyonu artırır. Böylece karaciğerden daha fazla PT sentezlenir. Bu da doğal olarak artmış trombin oluşumuna dolayısıyla tromboz riskinin artmasına yol açar (Haliloğlu 2004).

PT G20210A mutasyonu, bireysel ve ailevi venöz trombozisi olanlarda %18; rastgele seçilmiş DVT'li hastalarda %6,2, sağlıklı kontrollerde %2,3 oranında bildirilmiştir. “A” allelini taşıyan bireylerde trombozun oluşma riski 2,8 kat daha fazla olarak hesaplanmıştır. Bu mutasyonun sıklığı, beyaz ırkta %2 oranında bulunurken, Japonya – Uzakdoğu ve Afrika kökenlilerde çok nadir olarak görülmektedir. Türk populasyonunda bu mutasyonun sıklığı sağlıklı bireylerde %2,7, Kıbrıslı Türklerde %8,1 ve derin ven trombozu olanlarda %6,25 olarak belirlenmiştir. Bu mutasyonun Faktör V Leiden (FV 1691 G – A) ile birlikteliği nadirdir (%0,076).

Bugüne kadar yapılan araştırmalar PT 20210 G – A değişiminin klinik bazda derin ven trombozu, serebral ven trombozu, oral kontraseptiflere bağlı trombüslerde özellikle kırk yaş altı miyokard infarktüslerinde olmak üzere elli yaş altı grupta mutlaka araştırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. FVL veya PC veya ATIII eksikliği ile birlikte PT 20210 mutasyonu varsa, venöz trombüs riski daha da artmaktadır (Akar 1999).

### **2.3.1.9. Faktör V Gen Değişimleri ve Faktör V Leiden (1691 G – A) Mutasyonu**

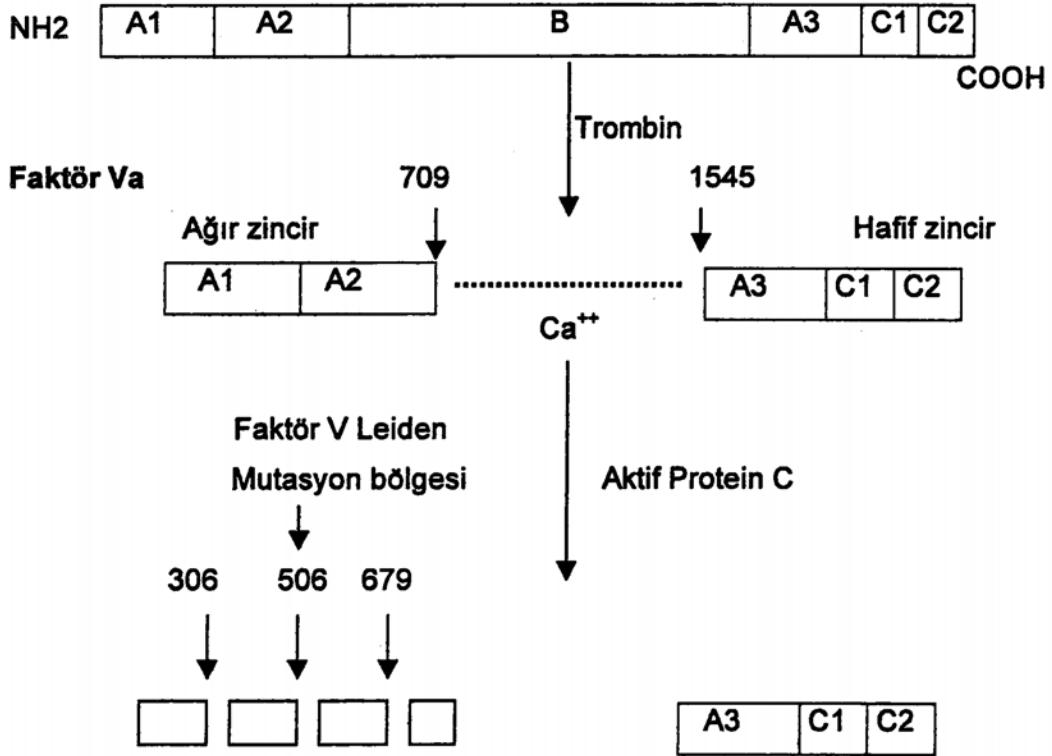
Faktör V; molekül ağırlığı 330.000 dalton olan, 2196 aminoasitten oluşan, tek zincirli bir glikoproteindir. Plazma konsantrasyonu 4 – 10 ng/ml olup, yarılanma ömrü 12 – 36 saattir. FV' in %75 - 80'i plazmada, %20 - 25'i trombositlerde bulunur. Molekül; yapısında A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, A<sub>3</sub>, C<sub>1</sub> ve C<sub>2</sub> bölgelerini bulundurur. A<sub>1</sub> ve A<sub>2</sub> bölgeleri ağır zincir olarak adlandırılan, 110.000 dalton molekül ağırlığındaki, 709 aminoasit içeren bölgeyi; A<sub>3</sub>, C<sub>1</sub> ve C<sub>2</sub> bölgeleri 651 aminoasit içeren, 78.000 dalton molekül ağırlığındaki hafif zinciri oluştururlar. B bölgesi ise; 836 aminoasitten oluşan, iki zincir arasında bulunan bölgedir. B bölgesi trombinin FV'i kesme noktalarını içerir. Ağır zincir üzerinde protrombin bağlanma bölgesi, hafif zincir üzerinde ise FXa ve fosfolipit bağlanma bölgeleri bulunur. Ağır ve hafif zincirler üzerinde ayrıca protein C' nin kesme bölgeleri de bulunur. FV, karaciğerin dışında megakaryositler ve lökositler tarafından da üretilir. Trombositlerin, endotelial hücrelerin ve monositlerin yüzeyinde bulunur. Trombositlerin içinde bulunan FV,  $\alpha$ -granülde depolanır ve trombosit aktivasyonu sırasında salınır (Uğar vd. 2001, Sılan ve Zafer 2004, Altınışık 2001).

FV proteini, koagulasyon mekanizmasının hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarında kofaktör olarak görev yapar. İntrinsik mekanizmada FXa ve trombosit fosfolipitleri ile, ekstrinsik mekanizmada ise doku tromboplastinin bir paręası olarak sentezlenen fosfolipit ve FXa ile birleşerek protrombin aktivatörünü oluşturur, bu kompleks de Protrombini (FII) trombine dönüştürür. Pıhtılaşma kaskadının aktive olmasıyla ortaya çıkan trombin bir yandan fibrinojeni fibrine dönüştürürken, diğer yandan endotelial bir membran proteini olan trombomoduline bağlanır. Bu olay trombinin prokoagulan formdan antikoagülan bir forma dönüşmesine yol açar. Daha sonra trombin, protein C'yi aktive eder. Protrombin aktivatör

kompleksi içinde FV tek zincirli ve inaktiftir. Pıhtılaşma başlayınca FV molekülü; trombin tarafından, B bölgesindeki, Arg709 – Ser710, Arg1018 – Thr1019, Arg1545 – Ser1546 noktalarından kesilerek aktive edilir. Tek zincirli FV molekülü, birbirlerine  $Ca^{+2}$  iyonları ile bağlı olan çift zincirli aktif molekül haline dönüşür (Haliloğlu 2004, Guyton 1991, İliçin 1996).

Aktive protein C (APC), kofaktör protein S varlığında FVa'yı ilk olarak 506. pozisyondan kestiğinde FVa $\alpha$  oluşur. Bu form, %70 oranında prokoagülan aktiviteye sahiptir. FVa'nın tam inaktivasyonu için 306. pozisyondan da kesilmesi gerekir. Bu reaksiyon protein S tarafından 20 kat hızlandırılır, ayrıca HDL (high density lipoprotein) de bu reaksiyonu artırıcı etkiye sahiptir. APC tarafından son olarak FVa 679. pozisyondan, F VIIIa' da özgül bölgelerden kesilerek inaktive edilir (Haliloğlu 2004). Böylelikle APC, FVa'yı yıkarak pıhtılaşmayı kontrol eder (Sılan ve Zafer 2004).

### Faktör V



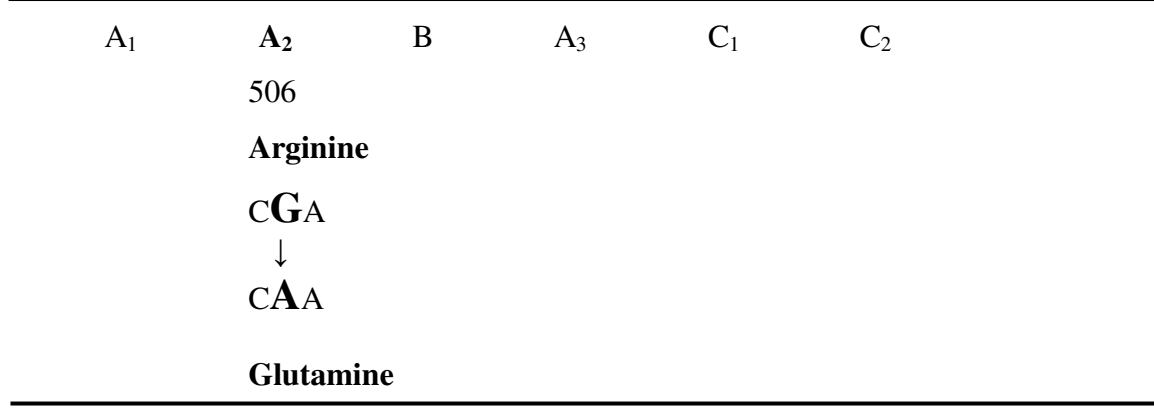
Şekil 3. Faktör V molekülünün kesim noktalarının şematik gösterilmesi (Esmon 2001)

Faktör V geni, ilk kez 1992 yılında Cripe ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. 1. kromozomun q21 -25 bölgesinde lokalize olan, 25 ekzon ve 24 introndan oluşan 80 kb uzunluğunda bir gendir. Faktör V eksikliği nedeni olarak 2 mutasyon bildirilmiştir. Bunlar; 13. ekzonda 4 baz çiftlik bir delesyon ve Faktör V Stanford olarak adlandırılan yine 13. ekzonda 2856. nükleotitte 4 baz çiftlik insersiyondur. Faktör V üzerinde APC' nin kesim yerlerini kodlayan nükleotitlerdeki mutasyonlar, FV' in APC' ye karşı direnç oluşturmaya neden olur. APC direnci (rezistansı), faktör V in değişik bölgelerinde oluşan farklı mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar. Faktör V Cambridge olarak adlandırılan mutasyon, 1998 yılında Willimson tarafından tanımlanan, faktör V geninin 7. ekzonunda, Arg 306 kesim bölgesindeki tek baz değişimi sonucu arginin aminoasidini treonin aminoasidine dönüştürür ve APC direncine neden olur. FV geninin 13. ekzonunun 4070. pozisyonundaki tek baz değişimi sonucunda 1299. aminoasit olan histidin arginine dönüşür ve oluşan APC direnci nedeniyle tromboz oluşumu tetiklenir (Akar vd 2000, Atakan vd 2000).

Faktör V genindeki mutasyonlar arasında en iyi bilinen ve yaygın olanı "Faktör V Leiden Mutasyonu" dur. Bu mutasyon 1994 yılında Bertina tarafından APC direncinin en önemli nedeni olarak tanımlanmıştır (Bertina vd. 1994). APC direncinin yaklaşık %85'ini FVL mutasyonu oluşturmaktadır.

APC, FVa ve FVIIIa' yı inaktive ederek pıhtılaşmayı kontrol eder. APC, FVa proteinini 679, 506 ve 306. pozisyonundaki arginin bölgelerinden keserek inaktive eder. FVa ilk önce 506'dan daha sonra 306'dan kesilerek inaktive olur. Fakat Faktör V Leiden mutasyonu, Faktör V geninin 10.ekzonundaki 1691. nükleotidin guaninden adenine dönüşmesine neden olur. Bu dönüşüm de 506. argininin glutamin olmasıyla sonuçlanır. Böylece 506'daki kesim engellenmiş olur. Mutant FV, 306.arginin bölgesinden kesilmesiyle inaktive olabilir. Fakat bu işlem yaklaşık 10 kat daha yavaştır. Böylece FV molekülü proteolitik inaktivasyona dirençli (resistant) olur. Bu durum trombin konsantrasyonunda yükselmeye ve hiperkoagülasyona neden olur. FV prokoagulan olmaya devam eder (Sılan ve Zafer 2004). Bu mutasyon sonucunda oluşan mutant FV' in, doğal antikoagulan protein C – protein S sistemine karşı

duyarlılığı azalır ve FVa, APC tarafından inaktive edilmeye karşı dirençli hale gelir ve koagülasyona yatkınlık ortaya çıkar (Sılan ve Zafer 2004, Rosen ve Sturk 1997).



**Şekil 4.** FV 1691 G→A değişimi (Akar 1999)

## **2.4. MOLEKÜLER TEKNİKLER**

### **2.4.1. Kullanılan Çözeltiler**

Bu çalışmada DNA izolasyonunda kırmızı kan hücrelerini lize etmek için RBC (Red Blood Cell) lizis çözeltisi [155 mM Amonyum Klorid (Applichem, Almanya), 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (Applichem, Almanya)] ve fenol/kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), izoamil alkol (Merck, Almanya)] karışımı kullanılmıştır.

### **2.4.2. DNA Ekstraksiyonu**

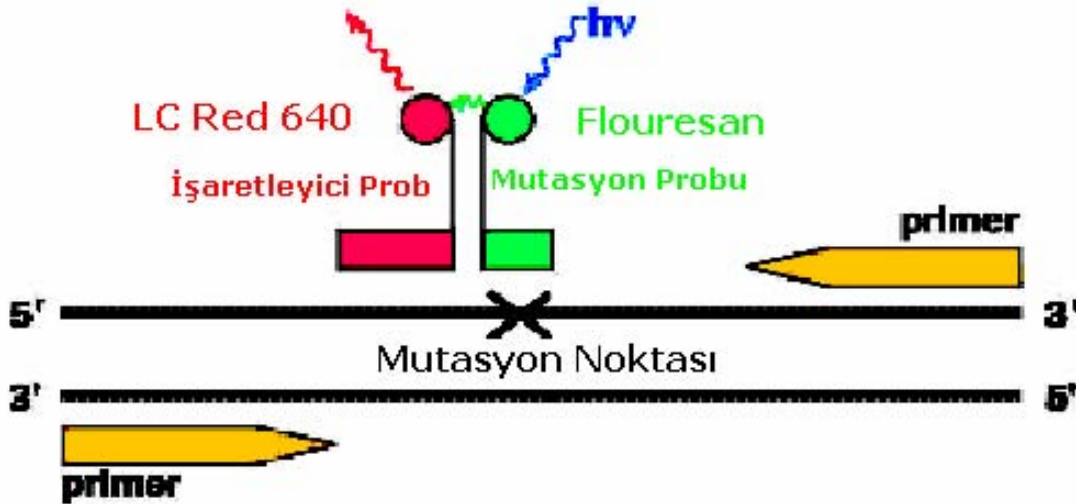
Genomik DNA'lar, kan örneklerinden proteinaz K, fenol/kloroform yöntemiyle izole edilmiş ve etanol ile muamele edilerek çöktürülmüştür.

### **2.4.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Pcr)**

Mutasyon saptamalarında yaygın olarak kullanılan Light Cycler cihazı, erime eğrisi prensibine göre çalışır. İlk basamak olarak; insan genomik DNA' sında bulunan 220 baz çiftlik Faktör V Leiden gen bölgesi spesifik primerlerle amplifiye edilerek çoğaltılır. Daha sonra, amplifikasyonun yapıldığı kapiller tüp içerisine spesifik hibridizasyon problemleri eklenir. Amplifikasyon ve hibridizasyon problemlerinin genomik DNA'ya bağlanması aynı kapiller içerisinde ve aynı zamanda gerçekleşir. Light Cycler – Red 640 işaretli hibridizasyon problemleri, mutasyon olmayan hedef sekansı hibridize ederek işaretleyici prob olarak fonksiyon kazanmasını sağlar. Diğer hibridizasyon probu, floresan ile işaretli olup, mutasyon probuna sıkı olarak bağlanır. Kalıp DNA' ya hibridize olduktan sonra, bu iki prob çok yakın olacak şekilde yan yana araya gelirler. Ve bu iki floresans arasında Resonance Energy Transferi (FRET) gerçekleşir. Erime eğrisi analizi sırasında, ısı yavaş yavaş yükselirken, hibridizasyon problemleri erir ve birbirine çok yakın duran iki floresan boya birbirinden ayrılır, böylelikle floresan ışınım miktarı düşer.

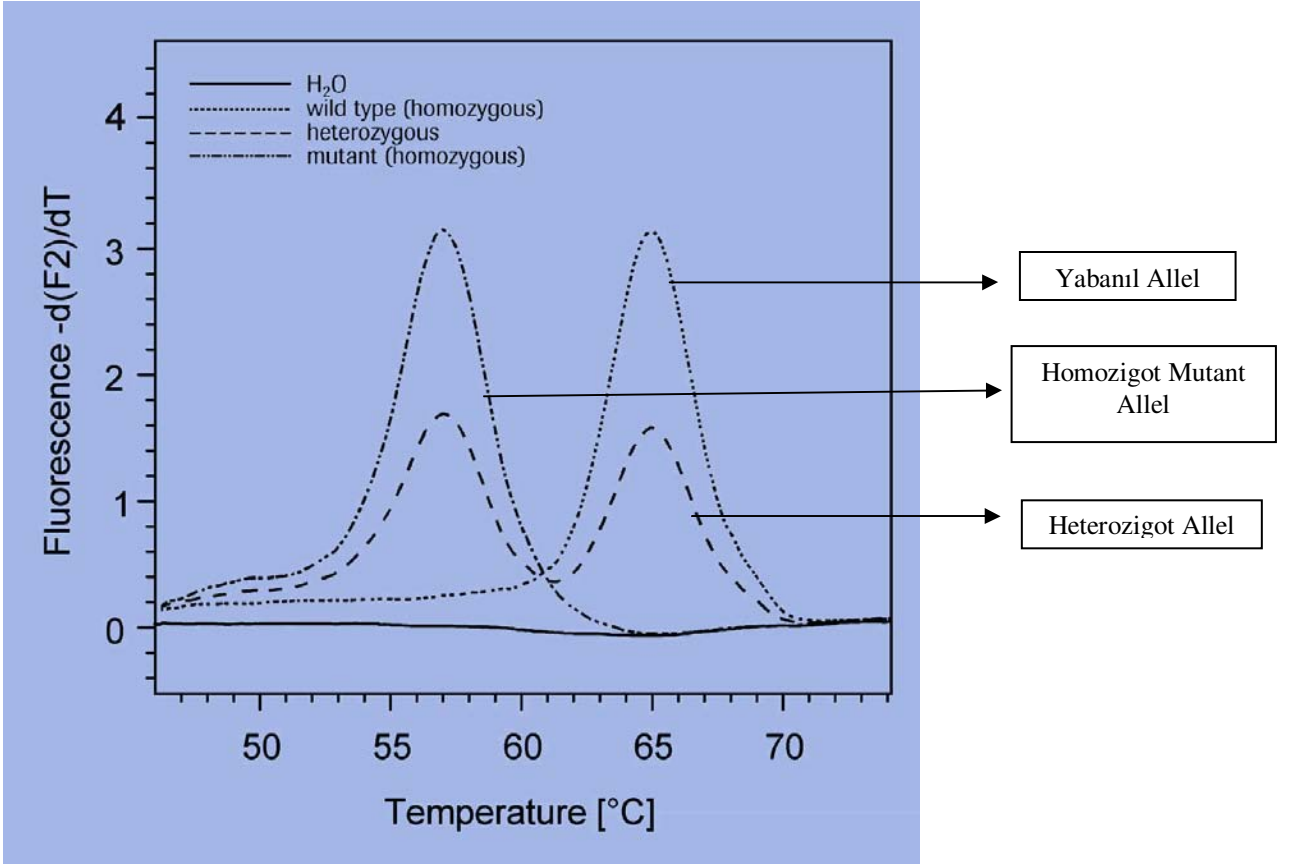
Mutasyon probunun erime ısı (T<sub>m</sub>), sadece üzerine bağlandığı fragmentin uzunluğuna ve G – C oranına bağlı değildir. Bunların yanında kalıp DNA ve mutasyon probu arasındaki homoloji oranı da etkilidir.

Eğer bir mutasyon varsa; mutasyon probu ile hedef DNA arasındaki uyumsuzluk hibridin stabilizasyonunu bozar. Yabancıl tip genotipte ise uyumsuzluk oluşmaz ve hedef DNA ile birbir örtüşen hibrit daha yüksek erime ısısına sahip olur. Mutant genotiplerde ise; hedef DNA ile hibrit birbir örtüşemediğinden bazılar arasında oluşan bağlar daha gevşek olur ve bunun sonucunda ise düşük erime ısısına sahip olur. Erime eğrisi analizi sonucu elde edilen pikler; homozigot (yabancıl tip veya mutant) genotip ile heterozigot genotip arasındaki farkın ayırt edilmesini sağlar. İşaretleyici prob (anchor prob) mutasyon probunun erime ısısından daha yüksek erime ısısına sahiptir. Bunun nedeni, erime eğrisi analizi sırasında oluşan sinyalin sadece mutasyon probundan gelmesini sağlamaktır. ([https://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/BIOCHEMI/no3\\_99/PG12.PDF](https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/BIOCHEMI/no3_99/PG12.PDF)).



Şekil 5. Light Cycler mutasyon analiz yönteminin çalışma prensibi





Şekil 6. Erime Eğrisi Analizi: Dizide (Örn. Faktör V Leiden) oluşabilecek genotiplerin görünümü

## 2.5. İSTATİSTİK YÖNTEMLER

### 2.5.1. İstatistik Yönteminin Seçilmesi

Yapılan çalışmaya uygun olan istatistik yönteminin belirlenebilmesi amacıyla çalışma verileri sorgulanmıştır. Bu sorgulama da öncelikle sorulacak sorular;

“Analiz yapılacak veri setinin yapısı nedir?” ve

“Analizin amacı nedir?” olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen analize tabi tutulacak veriler, normal populusyona aittir ve elde edilen sonuçlar binomiyaldir (iki olası sonuç). Analizin amacı ise kullanılan veri

grubunda tanımlayıcı istatistik yapmaktır (Akkuş vd. 2006). Bu sorgulama sonucunda verilen cevaplara göre kullanılacak en uygun yöntemin “Kaplan – Meier Yöntemi” olduğu görülmektedir.

### **2.5.2. Kaplan – Meier Yöntemi**

Özellikle olgu sayısının çok yüksek olduğu durumlarda araştırmacının kendi öngöreceği süre aralıkları için değerlendirmeler yapılabilir. Bu durum araştırmacı için önemli bir avantajdır ([www.tuik.gov.tr/ias/ias06/poster/hayriniSademircibiçerdüzlt.doc](http://www.tuik.gov.tr/ias/ias06/poster/hayriniSademircibiçerdüzlt.doc)). Bu yöntem en çok kullanılan “sağ kalım hesaplama yöntemi”dir. Analiz, sabit zaman aralıklarına bağlı olmaksızın yapılır. Analiz sonucu “adımsal (step) fonksiyon” biçiminde ortaya çıkar. Literatürde Product – Limit (P - L) olarak bilinir (Topçu 2007).

Sağ kalım terimi, geniş anlamda kullanılmaktadır. Mutlaka sağ kalmak/ ölmek çiftli seçeneğinin bulunma zorunluluğu yoktur. Sağ kalımdan anlaşılan; belli bir başlangıç noktasından sonra (bir ameliyat, bir tedavinin başlangıcı ya da bir hastalığın başladığı kabul edilen an, vs.) bir izleme süreci içerisindeki olgunun, araştırmanın ana konusu olan özel bir konuma erişmesi durumudur. Bu özel konum ölüm olabileceği gibi, tedaviye yanıt vermek ya da tümörsüz geçen süre gibi diğer özellikler de olabilir (Şenocak M: Sağkalım Çözümlemesi İlkeleri.Cerrahpaşa Tıp Dergisi [www.ctf.istanbul.edu.tr/dergi/online/1999v30/s4/994s1.htm](http://www.ctf.istanbul.edu.tr/dergi/online/1999v30/s4/994s1.htm)).

Yapılan çalışmanın içeriğine göre çiftli seçenek belirlenir. Moleküler biyolojik çalışmalarda bu çiftli seçenek mutasyonun olması/olmaması şeklinde belirlenir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı; Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. 1996 – 2008 yılları arasında bölümümüze gen değişimleri açısından incelenmek üzere gönderilen çocukluk çağı trombozlu olgularda, trombüs atağı geçirme yaşının Faktör V 1691 G – A değişimi ile ilişkisi araştırılmıştır. Trombüs hikâyesi olmayan 336 çocuk ile trombüs atağı geçirmiş 372 çocuk çalışma grubu olarak belirlenmiştir. DNA örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı “DNA Bankası”ndan temin edilmiştir. Çalışmaya katılan tüm ailelere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır.

Bu çalışmada; Çalışma grubuna ait ilgili mutasyon tarama sonuçları mevcut olup, bu sonuçların yaş ve cinsiyet dağılımları belirlenmiştir.

Bölümümüze başvuran hastalardan alınan kan örneklerinden Fenol – Kloroform yöntemiyle DNA elde edilmiş, elde edilen DNA’lardan FVL 1691 G-A mutasyonu Light Cycler “Factor V Leiden” Mutation Detection System (Roche Diagnostics, USA) kitleri kullanılmıştır. Bu örnekler veri bankasından çıkarılmış, yaş ve cinsiyet dağılımları belirlenmiştir. Proje, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen “tromboz” konulu projeler bağlamında desteklenmiştir.

#### 3.1. YÖNTEM

##### 3.1.1. DNA İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan 1 ml 0,5 M etilendiamintetraasetikasit (EDTA) (Sigma, ABD) içeren polietilen tüp içerisine 9 ml kan örneği alınır. Alınan kan örneği 50 ml lik flakon 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. Soğumalı santrifüjde (Hettich, Almanya) +4 °C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülür, çökelek üzerine tekrar 25 ml RBC Lizis solüsyonu eklenir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000 µL RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800 µL'si ependorf tüpüne alınarak -20 ° C'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200 µL bir ependorf 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 ependorf 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. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20 °C' de bir gece bekletilir.

Üçüncü gün tüpler +4 °C' de 4000 rpm' de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant dökülerek tüpe 500 µL %70' lik alkol eklenerek +4 °C' de 4000 rpm' de 20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında alkol dökülür ve tüpler kuruma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüplerin içerisine Tris EDTA (10 mM Tris – HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenir 37 °C' de bir gece bekletilerek DNA' nın çözünmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4 °C' de veya -20 °C' de saklanır.

### 3.1.2. FV 1691 G – A Değişiminin Belirlenmesi

FV geninde ortaya çıkan, 1691. pozisyondaki G – A baz değişiminin belirlenmesinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu prensibine uygun olarak tasarlanmış özel bir cihaz olan Light Cycler (Roche Diagnostics, USA) ile gerçekleştirilir. FV Leiden gen mutasyonunu belirlemek için LC Factor V Leiden Mutation Detection (Roche Diagnostics, USA) kiti kullanılmıştır. Faktör V geninin 222 baz çiftlik fragmanı insan genomik DNA' sından sağlanan spesifik primerler ile amplifiye edildi. Reaksiyon karışımı insan genomik DNA' sı kullanılarak cam kapiller tüplerde hazırlandı ve real time pcr cihazı (Light Cycler, Roche Diagnostics, USA) kullanılarak analiz edildi.

Light Cycler cihazında FVL mutasyonu analizinde kullanılan kit içerikleri tabloda gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Light Cycler cihazında kullanılan FVL kiti içerikleri ve reaksiyonda kullanılan miktarlar  
(FVL Kit for use with the Light Cycler 1.2 Instrument manuel: page1-8)

Reaktifler	Reaktif İçerikleri	Kullanılan Miktar
FVL MD Mix (FVL Mutation Dedection Mix)	<0,01% FVL primer forward and reverse <0,01%FVL HybProbe Probe Red 640 <0,01%FVL HybProbe Probe Fluorescein Brij35 MgCl <sub>2</sub>	2µL
FVL R Mix (FVL Reaction Mix)	Tris – HCl Buffer <0,01%Taq DNA polimerase, GMP grade <0,07% dATP,dCTP,dGTP,dUTP,dTTP Brij35 MgCl <sub>2</sub>	2µL
FVL DIL (FVL Diluent)	H <sub>2</sub> O, PCR - grade (also used negative control)	11µL
DNA		5 µL
Toplam Hacim		20 µL

Light Cycler cihazında FVL mutasyonu analizinde kullanılan primer ve problemler tabloda gösterilmiştir.

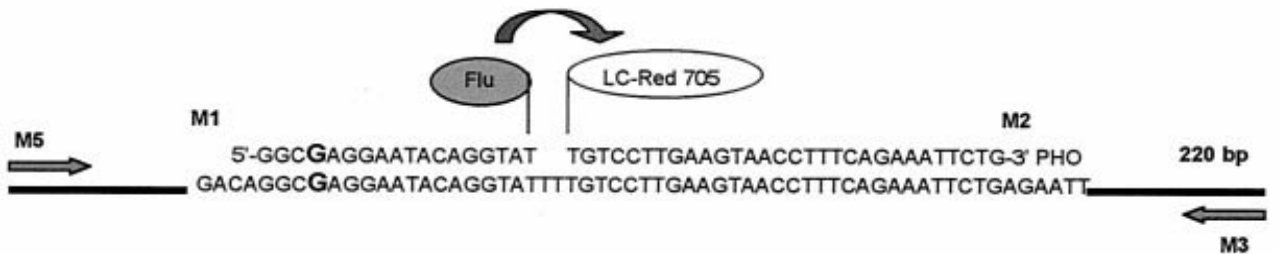
**Tablo 4.** Light Cycler cihazında FVL analizinde kullanılan primer dizileri ve hibridizasyon problemleri (Frank 2000)

Primer sequences and hybridization probes for factor V genotyping.

<u>Primer Sequence</u>	<u>Orientation</u>	<u>PCR product</u>
Factor V G1691A		220 bp
5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3'	Sense	
5'-CTTGAAGGAAATGCCCCATTA-3'	Antisense	
5'-GGCGAGGAATACAGGTAT-3'-fluorescein	Sense (Mutation probe)	
5'-LC-Red705-TGTCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTG-3'-PHO	Sense (Anchor probe)	

**TGCCCAGTGCTTAACAAGACC**ATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACATCGCCTCTGGGC  
 TAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGC**G/A**AGGAATACAGGTATTTTG  
 TCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCTAGAACATGTTAGGTCTCCTGGCT  
 AAA**TAATGGGGCATTTCCTTCAAG**

**Dizi 1.** FV geni için gerçek zamanlı pcr ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir. (GenBank accession no. L32764)



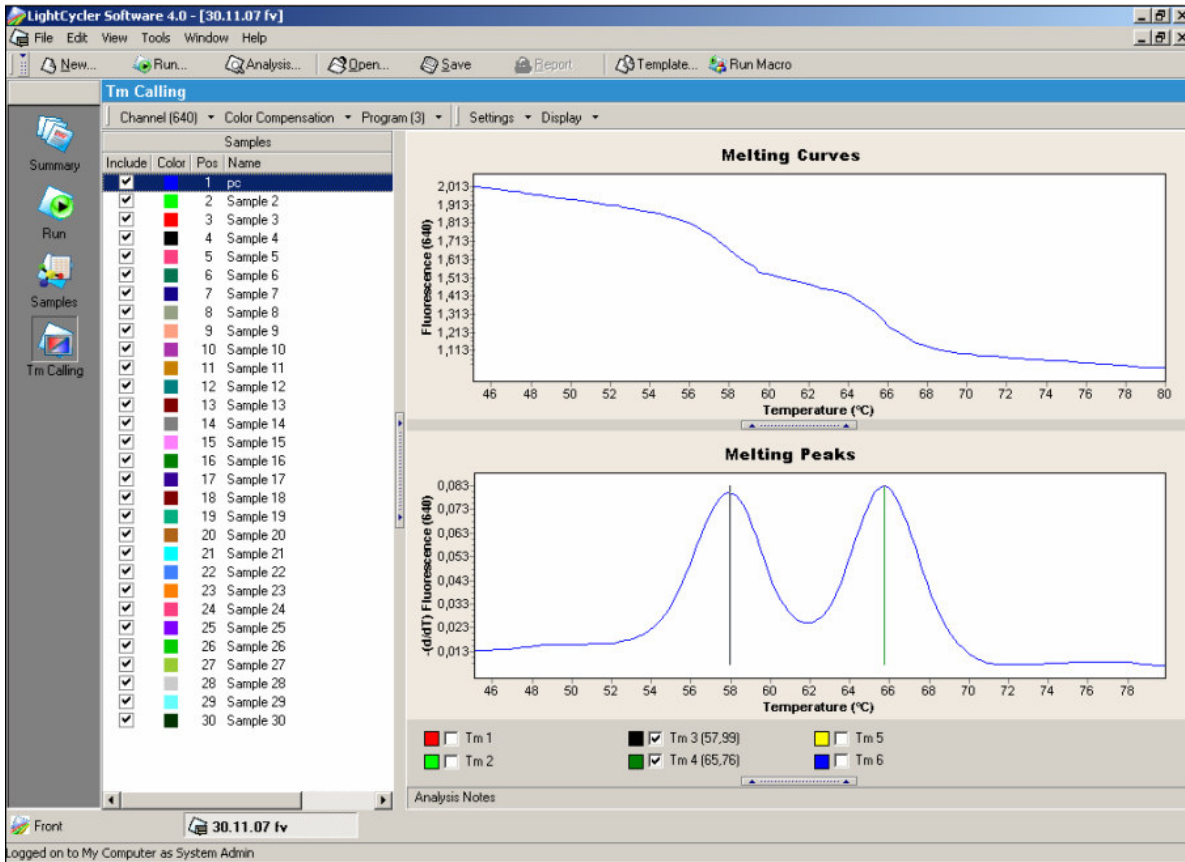
**Şekil 7.** LC FVL primerlerinin bağlanarak çoğaltıkları gen bölgesi

## 3.2. ARAŞTIRMA BULGULARI

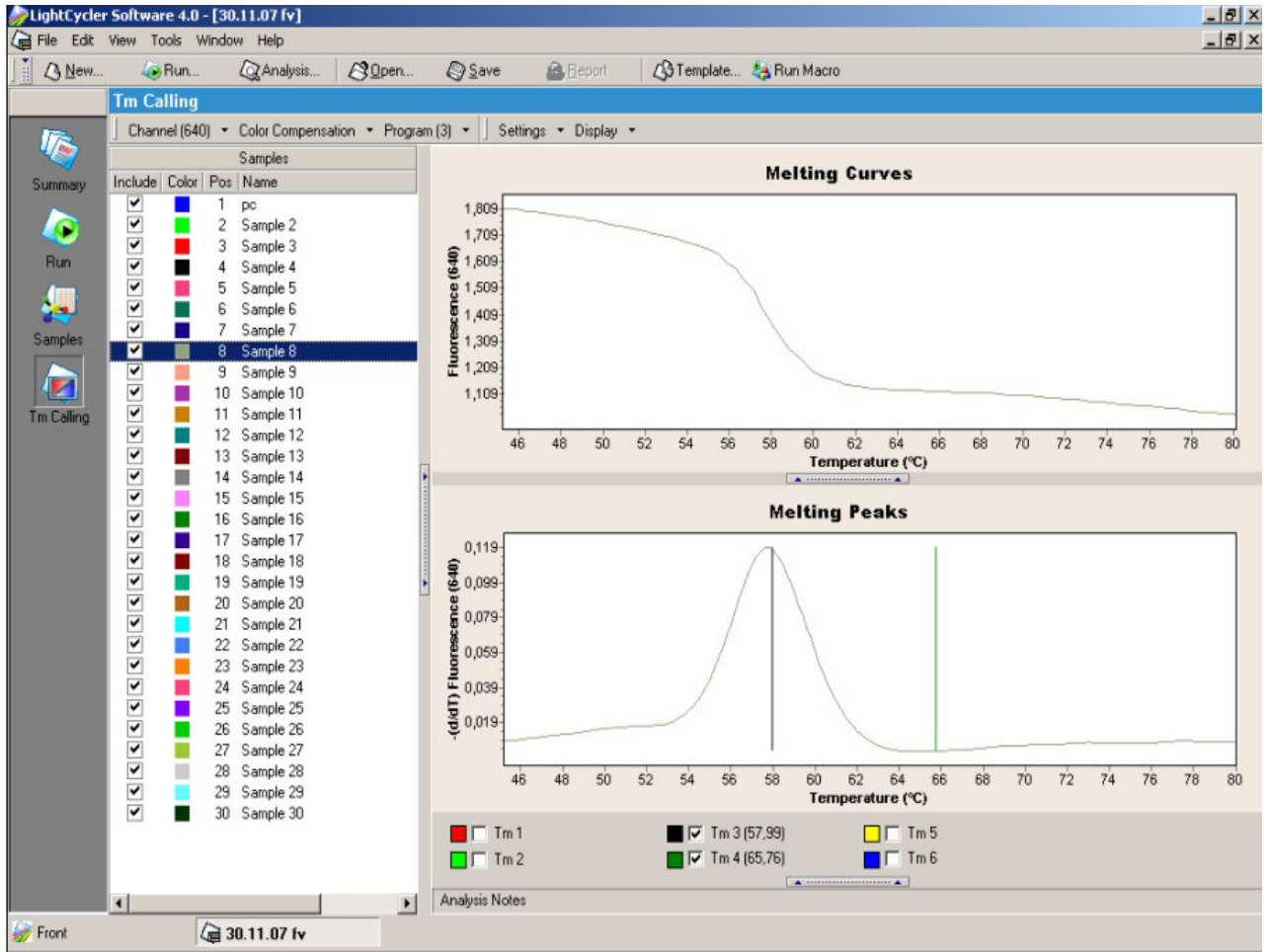
Yaptığımız çalışmada tromboz geçirmiş 372 pediatrik yaş grubundaki hasta ve tromboz öyküsü olmayan 336 çocuk çalışmaya dahil edilmiştir. FV genindeki 1691 G – A baz değişimi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tekniği kullanılarak taranmıştır.

### 3.2.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, Roche Diagnostics firması tarafından üretilen Light Cycler cihazında yapılmıştır. 372 hasta ve 336 tromboz hikayesi olmayan çocukta alınan DNA örnekleri kit protokolüne göre hazırlanarak cihazda okutulmuştur.

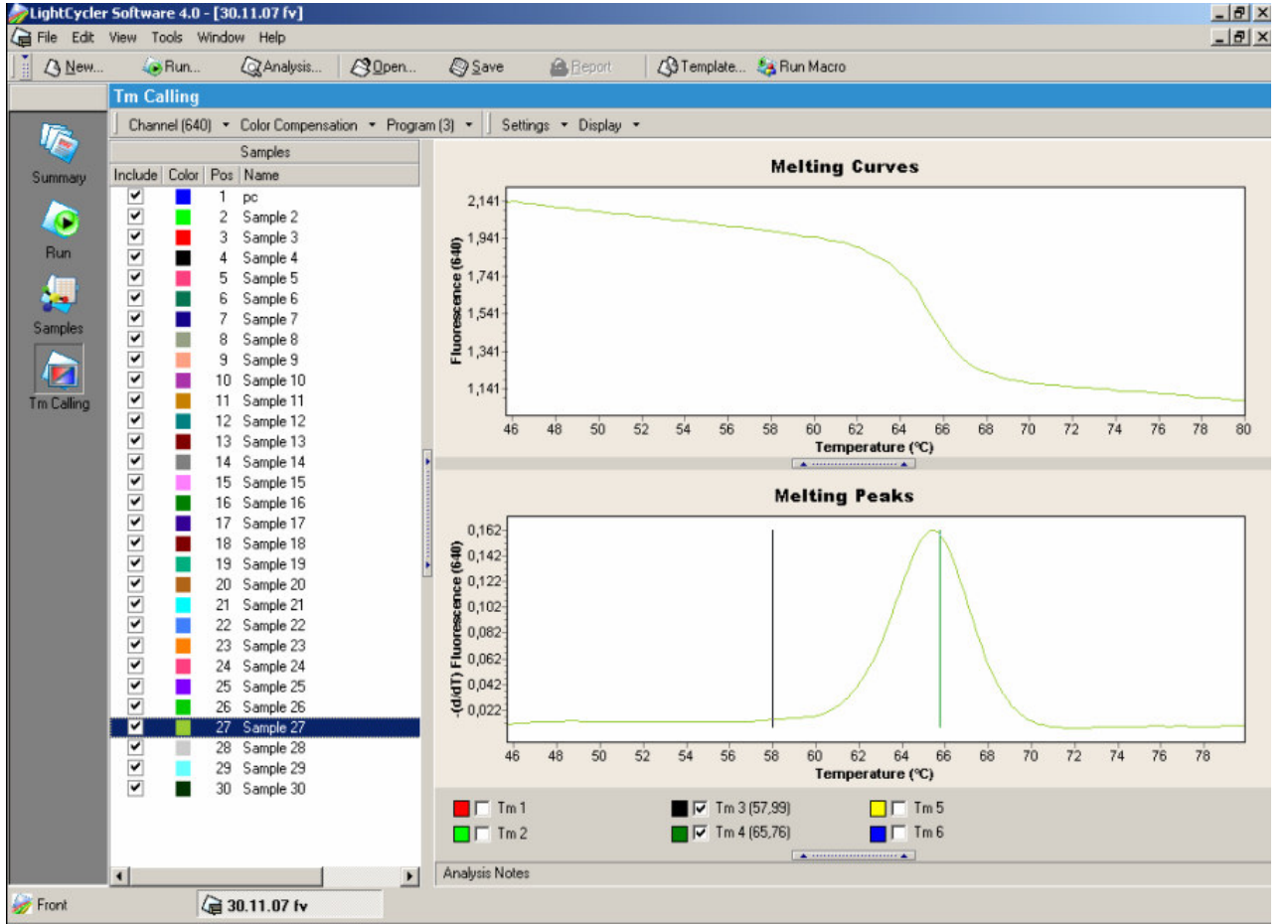


**Resim 3.** Light Cycler cihazında yapılan FVL mutasyonu taramasında gözlemlenen erime eğrisi (melting curve) analizi görüntüsü (Heterozigot (G/A) genotip görüntüsü)



**Resim 4.** Light Cycler cihazında yapılan FVL mutasyonu taramasında gözlemlenen erime eğrisi (melting curve) analizi görüntüsü (Homozigot mutant (A/A) genotip görüntüsü)





**Resim 5.** Light Cyler cihazında yapılan FVL mutasyonu taramasında gözlemlenen erime eğrisi (melting curve analizi görüntüsü (Yabancıl genotip (G/G) görüntüsü)

### 3.2.2. İstatistik Analizi Bulguları

Çalışmamıza dahil edilen 372 hasta ve 336 sağlıklı çocukta FVL mutasyonu incelenmiştir.

FVL 1691 G – A mutasyonunun trombüs atağı geçiren bireylerde cinsiyete göre dağılımı belirlenmiştir. 204 erkek ve 168 kız olmak üzere toplam 372 birey FVL mutasyonu taramasına alınmıştır. Erkek bireyler arasında G/G genotipi 169, G/A genotipi 35 kişide görülmüş olup A/A genotipine rastlanmamıştır. Kız bireyler arasında G/G genotipi 143, G/A genotipi 20 ve A/A genotipi 5 kişide bulunmuştur (Tablo 5).

**Tablo 5.** FVL mutasyonunun trombüs atağı geçiren bireylerde cinsiyete göre dağılımı

FVL 1691	Erkek (Hasta)	Kız (Hasta)
G/G	169	143
G/A	35	20
A/A	0	5

FVL 1691 G – A mutasyonunun trombüs hikayesi olmayan bireylerde cinsiyete göre dağılımı belirlenmiştir. 155 erkek ve 181 kız olmak üzere toplam 336 birey FVL mutasyonu taramasına alınmıştır. Erkek bireyler arasında G/G genotipi 139, G/A genotipi 15 ve A/A genotipi 1 kişide bulunmuştur. Kız bireyler arasında G/G genotipi 157, G/A genotipi 22 ve A/A genotipi 2 kişide bulunmuştur (Tablo 6).

**Tablo 6.** FVL mutasyonunun trombüs hikayesi olmayan bireylerde cinsiyete göre dağılımı

FVL 1691	Erkek (Kontrol)	Kız (Kontrol)
G/G	139	157
G/A	15	22
A/A	1	2

Trombüs geçirme riskini belirlemek üzere iki grup karşılaştırıldı. Trombüs geçiren grupta FVL sıklığı 60/372 (0,161); trombüs geçirmeyen grupta ise 40/336 (0,119) olarak belirlenmiştir. Aradaki fark  $p=0,042$  bulunmuş olup istatistiki olarak anlamlıdır.

Trombüs atağı geçiren bireyler yaşlarına göre 3 gruba göre sınıflandırıldığında; Yenidoğan – 5 yaş grubunda 101 erkek 83 kız birey olmak üzere 184 birey, 6 yaş – 12 yaş grubunda 68 erkek 61 kız birey olmak üzere 129 birey, 13 yaş – 18 yaş grubunda 35 erkek 24 kız olmak üzere 59 birey olduğu bulunmuştur (Tablo 7).

**Tablo 7.** Trombüs atağı geçiren bireylerin cinsiyet ve hastalığı geçirme yaşına göre dağılımı

Yaş Aralıkları	Erkek (Hasta)	Kız (Hasta)
Yeni Doğan – 5 yaş	101	83
6 yaş-12 yaş	68	61
13 yaş -18 yaş	35	24

Trombüs atağı geçiren bireyler genotip, cinsiyet ve hastalığı geçirme yaşına göre 3 gruba ayrıldığında;

Yenidoğan – 5 yaş grubunda G/G genotipi 82 erkek ve 71 kız bireyde, G/A genotipi 19 erkek ve 11 kız bireyde görülmüş, A/A genotipi 1 kız bireyde görülmüştür.

6 yaş – 12 yaş grubunda G/G genotipi 56 erkek ve 50 kız bireyde, G/A genotipi 12 erkek ve 9 kız bireyde, A/A genotipi 2 kız bireyde görülmüştür.

13 yaş – 18 yaş grubunda G/G genotipi 31 erkek ve 19 kız bireyde, G/A genotipi 4 erkek ve 3 kız bireyde, A/A genotipi 2 kız bireyde görülmüştür (Tablo 8).

**Tablo 8.** Trombüs atağı geçiren bireylerin genotip, cinsiyet ve hastalığı geçirme yaşına göre dağılımı

Yaş Aralıkları (Hasta)	Erkek			Kız		
	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A
Yeni Doğan – 5 yaş	82	19	0	71	11	1
6 yaş – 12 yaş	56	12	0	50	9	2
13 yaş – 18 yaş	31	4	0	19	3	2

Aynı veriler cinsiyet ayırımı yapılmadan tablo üzerine yerleştirilirse;  
Yenidoğan – 5 yaş grubunda G/G genotipi 153 bireyde, G/A genotipi 30 bireyde görülmüş, A/A genotipi 1 bireyde görülmüştür.  
6 yaş – 12 yaş grubunda G/G genotipi 106 bireyde, G/A genotipi 21 bireyde, A/A genotipi 2 bireyde görülmüştür.  
13 yaş – 18 yaş grubunda G/G genotipi 50 bireyde, G/A genotipi 7 bireyde, A/A genotipi 2 bireyde görülmüştür (Tablo 9).

**Tablo 9.** *Trombüs atağı geçiren bireylerin genotip ve hastalığı geçirme yaşına göre dağılımı*

Yaş aralıkları(hasta)	G/G	G/A	A/A
Yeni Doğan – 5 yaş	153	30	1
6 yaş – 12 yaş	106	21	2
13 yaş – 18 yaş	50	7	2

Tromboz hikayesi olmayan bireyler genotip, cinsiyet ve yaşlarına göre 3 gruba ayrıldığında;  
Yenidoğan – 5 yaş grubunda G/G genotipi 38 erkek ve 43 kız bireyde, G/A genotipi 2 erkek ve 5 kız bireyde, A/A genotipi 1 kız bireyde görülmüştür.  
6 yaş – 12 yaş grubunda G/G genotipi 64 erkek ve 82 kız bireyde, G/A genotipi 7 erkek ve 11 kız bireyde, A/A genotipi 1 erkek bireyde görülmüştür.  
13 yaş – 18 yaş grubunda G/G genotipi 37 erkek ve 32 kız bireyde, G/A genotipi 6 erkek ve 6 kız bireyde, A/A genotipi 1 kız bireyde görülmüştür (Tablo 10).

**Tablo 10.** Tromboz hikayesi olmayan bireylerin genotip, cinsiyet ve yaş dağılımı

Yaş Aralıkları	Erkek			Kız		
	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A
(Kontrol)						
Yeni Doğan – 5 yaş	38	2	0	43	5	1
6 yaş – 12 yaş	64	7	1	82	11	0
13 yaş- 18 yaş	37	6	0	32	6	1

Aynı veriler cinsiyet ayırımı yapılmadan tablo üzerine yerleştirilirse;

Yenidoğan – 5 yaş grubunda G/G genotipi 81 bireyde, G/A genotipi 7 bireyde, A/A genotipi 1 bireyde görülmüştür.

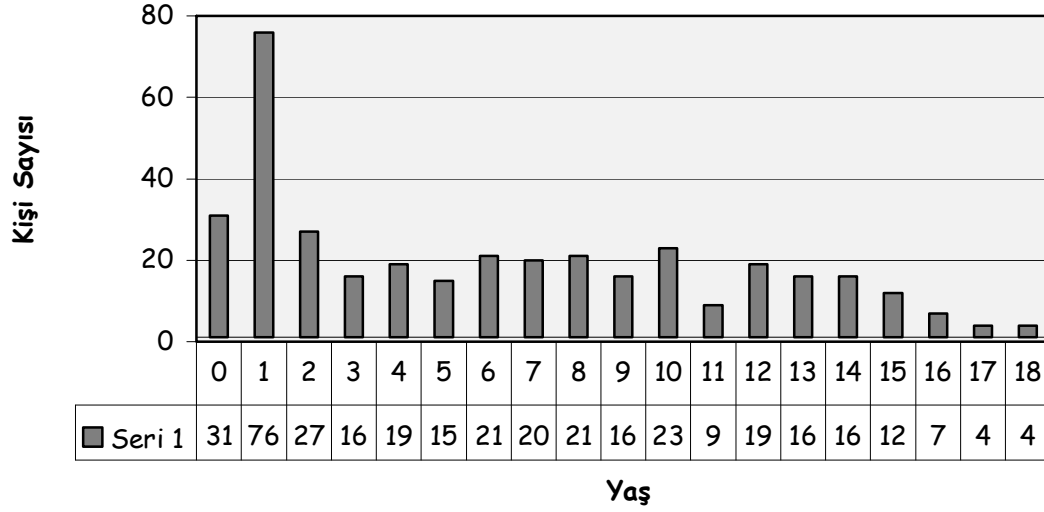
6 yaş – 12 yaş grubunda G/G genotipi 146 bireyde, G/A genotipi 18 bireyde, A/A genotipi 1 bireyde görülmüştür.

13 yaş – 18 yaş grubunda G/G genotipi 69 bireyde, G/A genotipi 12 bireyde, A/A genotipi 1 bireyde görülmüştür (Tablo 11).

**Tablo 11.** Tromboz hikayesi olmayan bireylerin genotip ve yaş dağılımı

Yaş aralıkları(kontrol)	G/G	G/A	A/A
Yeni Doğan – 5 yaş	81	7	1
6 yaş – 12 yaş	146	18	1
13 yaş – 18 yaş	69	12	1

## Çocuklarda Trombüs Geçirme Yaşı Dağılımı



Şekil 8. Çocuklarda trombüs geçirme yaşı dağılımı

Bu verilerden elde edilen bilgiler doğrultusunda; Yeni doğan, 1 ve 2 yaş grubu çocuklarında trombüs atağı geçirme riski daha yüksek bulunmuştur.

Bu verilerin, Kaplan – Meier İstatistik Yöntemi ile yapılan analizi sonucunda;

Tablo 12. İşlem Durumunun Özeti(Kaplan – Meier Survival Analizi)

Hasta	Total N	Olay Sayısı N	Sansürlen	
			N	Yüzde
0 (kontrol)	336	296	40	11.9%
1 (hasta)	372	314	58	15.6%
Hepsi	708	610	98	13.8%

Tablo 13. Sağkalım Zamanı için hesaplanmış Medyan ve Ortalamalar(Kaplan – Meier Survival Analizi)

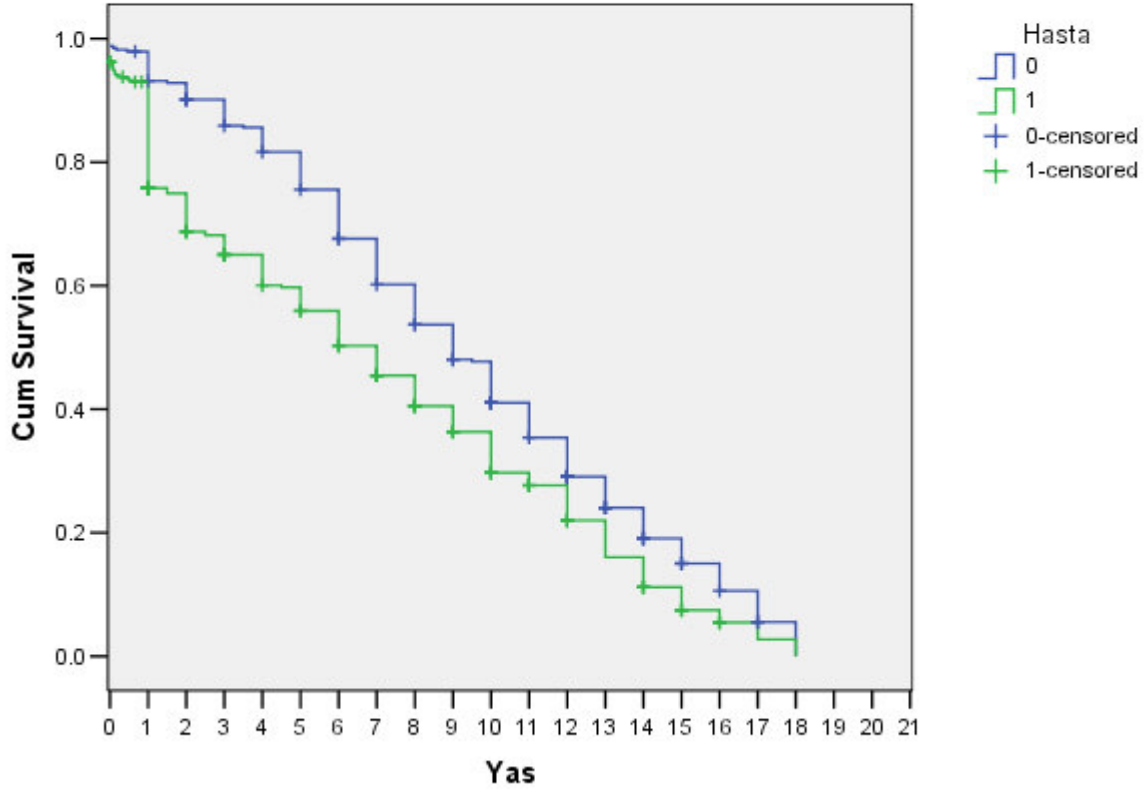
Hasta	Ortalama				Medyan			
	Değer	Std. Sapma	95% Güven Aralığı		Değer	Std. Sapma	95% Güven Aralığı	
			Alttan Engellenen	Üstten Engellenen			Alttan Engellenen	Üstten Engellenen
0 (kontrol)	9.334	.278	8.788	9.880	9.000	.434	8.150	9.850
1 (hasta)	7.132	.293	6.557	7.706	7.000	.520	5.981	8.019
Hepsi	8.191	.207	7.785	8.597	8.000	.347	7.320	8.680

**Tablo 14. Bütün Karşılaştırmalar(Kaplan – Meier Survival Analizi)**

	Ki - Kare	df	Sig.
Log Rank Testi	19.580	1	.000

\* Hasta grubunun farklı alt grupları için sağkalm dağılımlarının eşitlik testi

### Survival Functions



**Şekil 9.** Kaplan – Meier analizi sonucunda elde edilen sağ kalım eğrisi. Yatay ekseninde yıl olarak süre, dikey ekseninde ise sağ kalım olasılığı bulunmaktadır.

Bu grafiğe göre; mutasyondan sağ kalım (G/G gözlenmesi) oranları **kontrol grubunda** (hasta=0) **hasta grubuna** (hasta=1) oranla daha yüksektir. Örneğin, kontrol grubu için 5 yıllık sağ kalım oranı %76 iken, hasta grubu için bu oran %56 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ortalama sağ kalım yaşı 9,33 (8,79 – 9,88) olarak gözlenirken, hasta grubu için ortalama sağ kalım 7,13 (6,56 – 7,71) yaştır. Log-rank testi sonucu da, hasta ve kontrol gruplarının sağ kalımları arasında anlamlı bir fark olduğunu kanıtlamaktadır (p değeri=0).

## 4. TARTIŞMA

FVL mutasyonunun tromboz gelişiminde etiyolojik olarak önemi bilinmektedir. Heterozigot bireylerde tromboz riskini yaklaşık olarak 5 kat, homozigot bireylerde ise 20 – 80 kat arttırır (Pelle ve Dahlback 2008). Ülkemizde FVL mutasyonunun sıklığı sağlıklı popülasyonda % 9 oranında olduğu bilinmektedir(Akar vd. 1997).

Yenidoğan döneminde normal popülasyona göre FVL mutasyonunun varlığı daha yüksek oranda olduğu bulunmuştur (Akar 2009). Yenidoğan dönemi, kanda bulunması gereken doğal antikoagulan proteinlerin (Protein S, Protein C) düşük seviyede olması nedeniyle tromboz oluşumu için uygun bir dönemdir. Yenidoğan ile sağlıklı toplum arasında, istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile sıklık farkının bulunması nedeniyle FVL mutasyonunu taşımanın çocukluk döneminde yaşa bağlı olarak artan bir risk getirip getirmediğini belirlemek üzere bu çalışma planlanmıştır.

Tromboz geçiren, FVL taşıyan ya da taşımayan iki grup çalışmaya dahil edilmiştir. Yaşa bağlı riskin olup olmadığını göstermek üzere en uygun istatistiksel yöntem olarak Kaplan – Meier Yöntemi seçilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar; FVL taşımanın, istatistiksel olarak morbiditeye anlamlı ölçüde etki ettiğini göstermiştir.

Elde ettiğimiz bulgunun daha net bir sonuç verebilmesi için daha fazla sayıda hasta örneklemesinin yapılması ve diğer bazı gen değişimlerinin (PT, MTHFR) benzer şekilde etkili olup olmadıklarının saptanmasında yarar vardır.

Ayrıca, bu çalışma sonucunda; annelerde koruyucu olduğu düşünülen FVL mutasyonunun varlığı, yenidoğan ve çocukluk döneminde yüksek tromboz riski getirdiğinden koruyucu olmadığı saptanmıştır. Bu sonuç evrimsel süreçte FVL mutasyonu taşıyan bireylerin bir bölümünün elimine edilerek doğal seleksiyona maruz kaldığını düşündürmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Akar N, Akar E, Dalgın G, Sözüöz A, Ömürlü K, Cin S. Frequency of factor V 1691(G-A) mutation in Turkish population. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1527-8.
2. Akar N, Akar E, Yılmaz E. Factor V (his1299arg) in Turkish patients with venous thromboembolism. *Am J Hematol* 2000; 63:102
3. Akar N, Yılmaz E, Deda G, Sipahi T. Factor V (His1299Arg) in young Turkish Patients with Cerebral İnfarct. *Hemostasis* 2000 May – June; 30(3):118 – 122
4. Akar N. FV 1691 G – A Distrubition in Turkish Population, *Turkish J. Hematology*, 2009 in press.
5. Akar N, Arsan S, Deda G, Fitöz S, Soneltur B, Uysal Z. 2005, *Pediatric İnme*. Ankara: Çocuk Hakları Araştırma Vakfı, Baran Ofset.
6. Akar N. 1999, *Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş* (Genişletilmiş ikinci baskı). Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi An Tıp A.Ş. Yayınları
7. Akkuş Z, Sanisoğlu S.Y, Akyol M, Çelik M.Y. Değişken yapılarına göre istatistiksel yaklaşım. *Dicle Tıp Dergisi*, Cilt:33, sayı 2 (101-104),2006.
8. Altınışık J. Trombozlu Hastalarda Faktör V Leiden (G1691A) ve Protrombin G20210A Mutasyonlarının Araştırılması. T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2001
9. Altuntaş N, Soylu K, Suskan E, Akar N. Homocystein levels in Turkish children. *Turkish J. Hematology*.2004,21(2); 79-82.
10. Atakan M. Kütanoz Lökositoklastik Vaskülitli Hastalarda Hiperkoagülasyon Faktörlerinin Değerlendirilmesi. T.C. S.B. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Kliniği, Deri ve Zührevi Hastalıkları Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2006
11. Ateş H.Ö. Trombozlu Hastalarda Protein C Geninde Mutasyon Taraması.T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul 2001.
12. Bertina R, Koeleman B, Koster T, Rosendaal F, Dirven R, De Ronde H, Van Der Velden P, Reitsma P. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.

13. Bertina RM. Factor V Leiden and other coagulation factor mutations affecting thrombotic risk. *Clinical chemistry* 43: 9; 1678–1683, 1997
14. Bick R.L, Kaplan H. Syndromes of Thrombosis and hypercoagulability Congenital and acquired Causes of Thrombosis. *Medical Clinics of North America* may 1998; 338; 25: 1840 – 1841.
15. Bucciralli P, Rosendaal F.R, Tripodi A, Manucci P.M. Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antitrombin, protein C, protein s deficiency or activated protein C resistance: A multicenter collaborative family study. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1999; Apr.19; 1026 – 34.,
16. Büyükaşık Y. Arteriyel Tromboz ve Trombositler. *Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi: Hematoloji* 1(2/Özel Sayı: Kanama Ve Pıhtılaşma Bozuklukları) 2005; 60 – 70.
17. Celkan T. Trombosit Fonksiyon Bozuklukları ve Vasküler Nedenli Kanamalar. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Kanama ve Tromboza Eğilim Sempozyum Dizisi No: 36 • Kasım 2003; s. 37-60.
18. Chris A Dipaola. Preventing Deep Vein Thrombosis: A Perioperative Nursing Imperative. *Association of Operating Room Nurses. AORN Journal*. Denver: Aug 2008. Vol. 88, Iss. 2; p. 283.
19. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 1004-8.
20. Demiralp D.Ö, Akar, N. Prothrombin G20210A Gen Değişimi İle Protrombin Kompleks Proteinleri Ve Plazma Proteinleri Değişimlerinin Proteomik Analizler Değerlendirilmesi. XXXIII. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı,2007.
21. Dündar, S.M. Tromboz Tedavisi. *Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi: Hematoloji* 1(2/Özel Sayı: Kanama Ve Pıhtılaşma Bozuklukları) 2005; 82 – 90).
22. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica* 1965; 13: 516-520.
23. Eskandari G, Demirkan F, Eskandari M M, Yazar M, Sucu N, Aydın S, Atik U: Cerrahi Girişim Yapılacak Hastalarda Factor V Leiden ve Protrombin G20210A Mutasyonlarının Prevalansı. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 4: 389–392, 2002.

24. Esmon C.T. Anticoagulant Protein C/Thrombomodulin Pathway, ch.170, p:4327-4338, Tollefsen D.M. Antithrombin Deficiency, ch.176, p:4455-4465, Greenberg D.L., Devie E.W. Introduction to Hemostasis and the Vit K-Dependent Coagulation Factors, ch.169,p:4293-4341. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., Childs B., Kinzler K.W., Vogelstein B. The Mc Graw-Hill Companies Inc, 8. Edition, USA,2001.
25. Faioni EM, Franchi F, Asti D, Sacchi E, Bernardi F, Mannucci PM. Resistance to activated Protein C in nine thrombophilic families: interference in a protein S functional assay. Thrombosis and Haemostasis 1993; 70: 1067-1071.
26. Ferhanoğlu B. Hemostaz Metabolizması. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakóltesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Kanama ve Tromboza Eğilim Sempozyumu Dizisi, No:36, Kasım 2003: 9 – 16.
27. Frank A.J.T.M. van den Bergh,\*Arletta M. van Oeveren-Dybicz, and Michelle A.M. Bon. Rapid Single-Tube Genotyping of the Factor V Leiden and Prothrombin Mutations by Real-Time PCR Using Dual-Color Detectio., Clinical Chemistry 46, No. 8, 2000)
28. Griffen JH, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA. Anticoagulant protein C pathway defective in a majority of thrombophilic patients. Blood 1993; 82: 1989-93.
29. Guyton and Hall: Hemostaz ve Kan Pıhtılaşması. Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevi, 1996:463–73.
30. Guyton, A.C: Hemostasis and Blood Coagulation. Textbook of Medical Physiology, 8th. Edition. Ch.36,p: 390 – 99.An ABJ International Edition, W.D. Saunders Company, Philadelphia,1991.
31. Güneş A.M, Baytan B, Günay Ü. Çocukluk Çağında Kalıtsal Tromboz. The Journal of Current Pediatrics. Cilt:2, Sayı:2,2004.
32. Haliloğlu B. Açıklanamayan Tek Bir 3.Trimester Fetal Kayıp Olgularında Faktör V Leiden Ve Protrombin Gen Mutasyonunun Yeri. T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul 2004.
33. İliçin G, Ünal S, Biberöğlu K, Akalın S, Süleymanlar G. Pıhtılaşma Bozuklukları. Temel İç Hastalıkları. Güneş Kitapevi, Ankara, 1996:s: 1350 – 1370.

34. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated Protein C. *J Biol Chem* 1994; 269:1869-80.
35. Koster T, Rosendaal FR, De Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to a poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342:1503-6.
36. Kumar, Cotran, Robbins. *Temel Patoloji (Basic Pathology)*. W.B.Saunders Company. 5th Ed. Çeviri editörü: Prof.Dr. Uğur Çevikbaş. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti,1992.
37. Lane D.A, Mannucci P.M, Baver K.A. Inherited Thrombophilia. *Thrombosis Haemostasis* 1996; 76: 824 – 829.
38. Lee R.G, Bithell T.C, Foerster J, Athens J.W, Lukens J.N. Platelets hemostasis and coagulation. *Wintrobe's clinical Hematology*, 9. Edition, 1993; 511 – 16.
39. Lindqvist PG, Dahlback B. Carriership of factor V Leiden and evolutionary selection advantage. *Current Medical Chemistry* 2008; 15(15):1541 – 4.
40. Melvin J.R. The Body's Response to Vascular Injury: An overview of hemostasis. A detailed examination of hemostasis p:2-31, *Thrombosis: Causes and Treatment* p:64-82. *Introduction to Hemostasis*, Melvin J.R. Walenga J.M., Horowitz R.N. (eds) *Ortho Diagnostic Systems Presents*, USA,1989
41. Noll G, Luschner T.F. Influence of lipoproteins on endothelial function. *Thrombosis Resarch*, 1995;74(suppl.): 45 – 54
42. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma H, 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. *Thromb Haemost* 2001; 86: 374 – 85.
43. Rosen S.B, Sturk A. Activated protein C resistanse – A major risk factor for thrombosis. *Eur J. Clin.Chem.Clin Biochem* 1997, 35(7): 501-516.
44. Rosendaal F.R. Venous thrombosis: a multicausal disease. *The Lancet* April 1999; 353;3: 1167 – 1173.
45. Silan, F., Zafer, C.: Faktör V Leiden Mutasyonu. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2004: 1: 33 -36.
46. Smith C, Marks A, Lieberman M. *Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach*. Lippincott Williams & Wilkins.2. edition,2007.

47. Stefano V.D, Chiusolo P, Casorelli I, Mario A.D, Rossi E, Leone G. Prevalance of the factor II G21210A mutation in symptomatic patients with inherited thrombophilia. *Thrombosis Haemostasis*, 1998; 80: 342 – 43.
48. Terzioğlu M, Yiğit G, Oruç T. Kan Pıhtılaşması ve Kanamanın Durdurulma Mekanizmaları (Koagulasyon ve Hemostaz) sy:177–225 *Fizyoloji Ders Kitabı Cilt II*, İ.Ü.C.T.F Fizyoloji A.D. İstanbul, 1993.
49. Uar F, Ovalı E, Önder E, Değer O, Özdemir F. Faktör V Leiden Biyokimyası, Genetiği, Risk Grupları ve Moleküler Düzeyde Tayini. *İbni Sina Tıp Dergisi* 2001;6: 60 -65.
50. Ulu A. FV 4070 A – G Mutasyonunun Pediatrik Trombozlu Olgularda Önemi. T.C. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2003.
51. Ulutin T, Cengiz M, Yüksel A, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü Tıbbi Biyoloji Ders Notları 1, Nobel Tıp Kitapevleri, 45 – 109,2000.
52. Yılmaz E, Akar E, Avcu F, Yaın A, Deda G, Sipahi T, Sözüöz A, Cin Ő, Akar N. FV His 1299 Arg (4070 G→A) Mutasyonunun Türk Trombozlu Olgulardaki Önemi. IV. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 3 – 6 Mayıs 2000,İzmir. Sf: 235.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı: Esin GÜNGÖR

Doğum Yeri: ANKARA

Doğum Tarihi: 24/08/1979

Yabancı Dili: İngilizce

e-posta: esin\_gungor@mynet.com

### Eğitim Bilgileri:

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2001 – 2005)

Ön Lisans: Akdeniz Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Laboratuvar Bölümü (1999 – 2001)

Lise: Ankara Anadolu Kimya Teknik Lisesi (1993 – 1997)

Çalıştığı Kurumlar: Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Sitogenetik Laboratuvarı (2000 – 2001)

Sağlık Bakanlığı Kırıkkale Karakeçili İlçe Hastanesi Laboratuvarı (2004 - ....)