

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VENÖZ TROMBOEMBOLİZME PROTEOMİK YAKLAŞIM

Afsar ABBASİ TAGHİDİZAJ

DANIŞMAN

Yrd.Doç.Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP

**ANKARA
2010**

KABUL ONAY

Yrd.Doç.Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP danışmanlığında, Afsar ABBASİ TAGHİDİZAJ tarafından hazırlanan bu çalışma 10/07/2010 tarihinde aşağıdaki jri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Cüneyt KOKSOY
(Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Üye: Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ
(Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü)

Üye: Yad. Doç. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP
(Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Danışman)

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof.Dr. Mustafa AKÇELİK
Enstitü Müdürü

Venöz Tromboembolizme Proteomik Yaklaşım

ÖZET

Venöz tromboembolizm (VTE) morbidite-mortalite oranları yüksek olabilen ve batı toplumlarında 1-2/1000/yıl sıklığında görülen bir klinik tablodur. Derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner emboli (PE) aynı klinik tablonun farklı evreleri olarak değerlendirildiğinden, genellikle venöz tromboembolizm olarak (VTE) adlandırılmaktadır. Faktör V Leiden (FVL) ve Faktör II Protrombin G20210A heterozigot gen mutasyonları beyaz ırkta sırasıyla %5-10 ve %2 oranında görülmektedir ve VTE'ye neden olan en sık genetik defektlerdir. Literatüre göre; inflamasyon ile ilişkili bazı abundant proteinlerin ve polimorfik akut faz proteinlerinin serumdaki konsantrasyonlarının artışı inflamasyon ile ilişkisi olan; aterosklerosis, eklem iltihabı, kalple ilgili hastalıklarda ve VTE'de tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasının amacı, venöz tromboembolizm için risk faktörü olarak bilinen FVL ve Protrombin 20210 gen değişimlerinin, hasta ve kontrol gruplarında plazmadaki özellikle inflamasyona duyarlı abundant (bol) protein profiline etkisinin belirlenmesi ve bu gen değişimlerinin miyokard infarktüs (kalp krizi, MI) öyküsü ile ilişkisinin proteomik olarak araştırılmasıdır.

Bu amaçla yapılan çalışmada; 1/9 ml EDTA'lı tüp içerisine alınan kan örneklerinden proteom çalışmalarında kullanılacak plazma kısmı ayrılmış ve kalan kısım üzerinden geleneksel fenol-kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile hasta (130) kontrol (130) grupları Faktör V Leiden ve protrombin 20210 nükleotid değişimleri açısından taranmıştır. Mutasyon taşıyan ve taşımayan hasta/kontrol gruplarında iki boyutlu jel elektroforezi ile protein profillenmesi ve MALDI-TOF kütle spektrometresiyle proteinlerin kimliklendirilmesi (PMF) yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen farklı hasta ve kontrol grupları arasında altı farklı abundant proteinin ifadesinin genotipe bağlı değişim gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Venöz tromboembolizm, Faktör V Leiden, Protrombin G20210A, 2 boyutlu jel elektroforezi, MALDI-TOF kütle spektrometresi.

A Proteomic Approach To Venous Thromboembolism

ABSTRACT

Venous thromboembolism (VTE) is a disease with high morbidity and mortality rates with an incidence of 1-2/1000 in Western societies. Deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE) are considered as the clinical stages of the same disorder, and are collectively called as venous thromboembolism. The prevalence of Factor V Leiden and Factor II prothrombin gene mutations was reported at about 5-10% and 2% respectively (as heterozygous mutations), in whites. The factor V Leiden allele and prothrombin allele are the most common cause for hereditary thrombophilia. According to the literature, increased serum concentrations of some abundant plasma proteins related with inflammation and polymorphic acute phase proteins have been associated with inflammation-related atherosclerosis, arthritis, heart-related disorders and also VTE diseases.

The aim of this study is to determine the effect of the FVL and Prothrombin 20210 gene mutations, which are known as a risk factor for venous thromboembolism, to the inflammation-sensitive abundant plasma proteins in control and patient groups and also to investigate the relationship between these mutations and MI history by proteomic methods.

In this preliminary work, plasma was separated from whole blood samples collected in tubes with EDTA (1/9 ml) and the remaining sample was used for DNA isolation with conventional phenol-chloroform method. Genetic analysis were done for patient (130) and control (130) individuals in terms of FVL and Prothrombin 20210 gene mutations by RT-PCR. Protein profiling by two dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting (PMF) by MALDI-TOF MS were done for patient and control groups. Six abundant proteins were found differentially expressed depending on the genotype between the different patient and control groups.

Key Words: Venous Thromboembolism, factor V Leiden, prothrombin, 2D gel electrophoresis, MALDI-TOF mass spectrometry.

TEŞEKKÜR

Teşekkürler Türkiye
Teşekkürler SARIKAMIŞ Şehitleri
Teşekkürler ÇANAKKALE Şehitleri
Teşekkürler ATAM, Teşekkürler E.PAŞAM

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca güler yüzü, çalışma azmi ve öz güveni ile bana her zaman destek olan ve yeni bir bakış açısı veren danışmanım Yrd. Dr. Duygu ÖZEL DEMİRALP'a teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında gerek bilgi ve önerileriyle gerek yardımseverlikleri ve hoşgörülerıyla katkılarını esirgememiş olan, Naşit İĞCI'ye, Ziba BAZMANI'ye Şafak MERT'e, Beycan AYHAN'a, Dr. Erkan YILMAZ'a, Yrd.Doç.Dr. E. Doruk ENGİN'e, Cevahir ALTINKAYNAK'a, Başak ÇINAR'a ve Selen PEKER'e çok teşekkür ederim.

Manevi destek ve sevgileriyle her zaman yanımda olduğunu hissettiğim merhum olan babam Safar ABBASİ'ye ve babamın yokluğunu hissettirmeyen, hayatını evlatlarının eğitimi büyümesine adanmış annem Surayya NURİ'ye çok teşekkür ederim.

3 yıldan uzun süren eğitimim boyunca kardeş komşu ülkede eğitim almam konusunda manevi desteklerini esirgemeyen abim Dr. Resul ABBASİ ve diğer kardeşlerim Tayyip ve Mehdi ABBASİ'ye çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmayı proje olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)'ne teşekkür ederim.

Afsar ABBASİ TAGHİDİZAJ

Ankara, Haziran 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Tromboz.....	3
2.1.1. Trombozun sebepleri	4
2.2 Hemostaz ve damar yapı fonksiyonu	5
2.3 Koagülasyon	8
2.3.1 Trombinin işlevleri.....	9
2.3.2 Ekstremssek yol.....	9
2.3.3 İntrensek yol.....	10
2.3.4 Ortak yol	11
2.3.5 Koagülasyon inhibisyonu	12
2.3.6 Fibrinolizis	13
2.4 Venöz tromboembolizm	14
2.4.1 Derin ven trombozu ve Pülmoner emboli.....	14
2.4.2 İnme	15
2.5 Trombofilik Hastalıklarda Risk Faktörleri.....	15
2.5.1 Çevresel risk faktörleri	16
2.5.2 Kalıtsal risk faktörleri	18
2.6 Etiyoloji-Epidemiyoloji	23
2.7 Patofizyoloji.....	24
2.8 Proteomik Yaklaşımlar	25
3. MATERYAL ve ÖNTEM	27
3.1 Materyal	27
3.2 Yöntem.....	27
3.2.1 Örneklerin Elde Edilmesi.....	27

3.2.2 RT-PCR tekniği ile mutasyon değerlendirmesi	28
3.3 Proteomik Teknikler	29
3.3.1 Abundant protein filtrelenmesi	29
3.3.2 Bradford protein miktar tayini	32
3.3.3 İki boyutlu jel elektroforezi	33
3.3.4 Jellerin boyaması, görüntülemesi ve analizi	34
3.3.5 Protein kümelerinin kesimi ve jel içinde tripsin sindirimi (tripsinizasyon).....	35
3.2.6 Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI) ile peptit Analizi.....	36
3.3.7 Kütle spektrometresi verilerini kullanarak protein Tanımlanması.....	38
3.4 İstatistik analiz	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	40
4.1 Plazma Abundant (Bo) Proteinlerin Filtrelenmesi.....	40
4.2 Faktör V Leiden ve Protrombin G20210A Nükleotit Değişimleri Açısından gen tarama sonuçları	42
4.3 Oluşturululan Gruplar ve İki Boyutlu Jel Elektroforezi Sonuçlarının değerlendirilmesi.....	43
4.3.1 Kontrol set grubu değerlendirmeleri.....	44
4.3.1.1 Grup içi standardizasyonları	44
4.3.1.2. Farklı genotipte gruplar arası genel protein profilinin değerlendirmesi	47
4.3.1.3. Farklı genotipte gruplar arası abundant proteinlerin değerlendirilmesi.....	48
4.3.2. Hasta set grup değerlendirmeleri	57
4.3.2.1 Grup içi standardizasyonları	57
4.3.2.2 Farklı genotipte Grup arası Abundant protein değerlendirme	59
4.4 Protein Tanımlanması	66
4.4.1. MALDI-TOF kütle spektrometresinin m/z kalibrasyonun yapılması.....	66
4.4.2. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin spektrumları ve veri tabanından alınmış peptit kütleleri	67
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR	84
EKLER.....	88
ÖZGEÇMİŞ	97

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Oluşan trombus ve emboli	3
Şekil 2.2. Hemostaz dengesinin şematik olarak gösterilmesi	5
Şekil 2.3. Damar zedelenmesinden sonraki kasılma.....	6
Şekil 2.4. Trombosit tıkaçının oluşumu.....	7
Şekil 2.5. fibrin oluşumu.....	7
Şekil 2.6. Fibrinin oluşması	8
Şekil 2.7. Trombinin geniş çaplı etki mekanizması	9
Şekil 2.8. Koagülasyon kaskadı.....	11
Şekil 3.1. RT-PCR hibridizasyon prob yöntemi	28
Şekil 3.2. 20 abundant protein için filtreleme sistemi; Kolon I.....	30
Şekil 3.3. Albümin ve IgG için filtreleme sistemi; kolon II	31
Şekil 3.4. Rehidratasyon tamponunun tabla kanalı boyunca uygulanması.....	33
Şekil 3.5. Tablanın kanallarına wicks kağıdının uygulanması	33
Şekil 3.6. Şeritlerin toplama jeline kadar itilerek, sabitlenmesi	34
Şekil 3.7. İnsan plazma protein profili.....	35
Şekil 3.8. MALDİ kütle spektrometresi hazırlık şeması.....	36
Şekil 3.9. MALDİ lazer ışınının katı matriksi uyarması ve analitleri iyonize etmesi	38
Şekil 3.10. Dedektöre çarpan farklı kütlelerdeki iyonlar	38
Şekil 4.1. Taze kan örneğinden kit I kullanarak filtreleme yapıldıktan sonra elde edilen 2 boyutlu jel elektroforezi görüntüsü	41
Şekil 4.2. Abundant proteinlerin kit I ve kit II ile filtrelenmesiyle.....	41
Şekil 4.3. Kontrol grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grub içi standardizasyonun gösterimi.....	45
Şekil 4.4. FV grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grub içi standardizasyonun gösterimi.....	46
Şekil 4.5. Protrombin grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grub içi standardizasyonun gösterimi.....	47
Şekil 4.6. kontrol grubu jellin 3D örnekleri.....	52
Şekil 4.7. Kontrol, FV ve protrombin gruplar arasında ekspresyonu artan spotların SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri	53
Şekil 4.8. Fibrinojen beta'nın Kontrol ve FVL de 3 boyutlu ifadelerinin gösterimi	53

Şekil 4.9. Fibrinojen beta'nın Kontrol ve protrombin de 3 boyutlu ifadelerinin gösterimi	54
Şekil 4.10. 3 grup arasında Fibrinojen beta ifade farklılıklarının 2Djel elektroforezi protein profilinde 3D gösterimi	54
Şekil 4.11. Haptoglobin'nın kontrol ve FV de 3 boyutlu ifadelerinin gösterimi	55
Şekil 4.12. Haptoglobin'nın kontrol ve protrombin de 3 boyutlu ifadelerinin gösterimi	55
Şekil 4.13. 3 grup arasında Hafif haptoglobin zincirinin ifade farklılıklarının 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D gösterimi	56
Şekil 4.14. MI geçiren grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grub içi standardizasyonun gösterimi.....	57
Şekil 4.15. MI geçirmeyen grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grub içi standardizasyonun gösterimi	58
Şekil 4.16. FV grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grub içi standardizasyonun gösterimi	59
Şekil 4.17. Retinol binding protein 4 spotunun 3D protein ifadesi	62
Şekil 4.18. Alpha-1-antitripsin spotunun 3D protein ifadesi	63
Şekil 4.19. Fibrinogen beta chain spotunun 3D protein ifadesi	64
Şekil 4.20. Fibrinojen gama ve Albumin spotlarının 3D protein ifadesi	65
Şekil 4.21. Maldi kalibrasyon spektrumu	66
Şekil 4.22. Fibrinojen beta için elde edilmiş kütle spektrumu.....	67
Şekil 4.23. Haptoglobin için elde edilmiş kütle spektrumu	69
Şekil 4.24. Fibrinojen gama için elde edilmiş kütle spektrumu.....	71
Şekil 4.25. α -1 antitripsin için elde edilmiş kütle spektrumu	72
Şekil 4.26. Serotransferin için elde edilmiş kütle spektrumu	73
Şekil 4.27. Albumin için elde edilmiş kütle spektrumu.....	74
Şekil 4.28. IgG hafif için elde edilmiş kütle spektrumu	76
Şekil 4.29. IgG ağır için elde edilmiş kütle spektrumu.....	76
Şekil 5.1. Abundant protein konumları.....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 koagülasyon faktörlerinin yolağı ve işlevleri	12
Çizelge 3.1 Peptit karışımının kütle değerleri.....	37
Çizelge 4.1 Hasta-kontrol grubu içinde gen taraması sonuçları	42
Çizelge 4.2 kontrol ve hasta setlerindeki deney gruplarını gösteren	43
Çizelge 4.3 PDQuest jel kantitatif analiz sonuçları	48
Çizelge 4.4 20 abundant protein	49
Çizelge 4.5 Kontrol set grubunda spotların kantitatif değerlerine göre SPSS 9.0 programi ile istatistik analizi.....	50
Çizelge 4.6 Hasta set grubunda spotların kantitatif değerlerine göre SPSS 9.0 programi ile istatistikanalizi.....	50
Çizelge 4.7. 5 peptid karışımı ile elde edilmiş spektra	66
Çizelge 4.8 Fibrinojen beta için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri	68
Çizelge 4.9 Haptoglobin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri.....	70
Çizelge 4.10 Fibrinojen gama için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri	71
Çizelge 4.11 α -1 antitripsin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri.....	72
Çizelge 4.12 Serotransferin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri.....	73
Çizelge 4.13 Albumin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri	75
Çizelge 4.14 Maldi-Tof kütle spektrometresi ile tespit edilen proteinlerin pI ve MI.....	77

SİMGELER DİZİSİ

AP	Aktive protein
Arg	Arjinin
Aps	Amonyum per sülfat
BSA	Bovin serum albumin
Bç	Baz çifti
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
DNA	Deoksiribonükleik acit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
GpI	GlikoproteinIb
G	Guanin
HED	Hiroksietildisülfid
IPG	İmmobilize PH gradyeni
K ⁺	Potasyum
FV	Proakselerin
FVII	Faktör VII
FVIIa	Aktif Faktör VII
FVIII	Faktör VIII
FVIIIa	Aktif Faktör VIII
FIX	Faktör IX
FIXa	Aktif Faktör IX
FX	Faktör X
FXa	Aktif Faktör X
FXI	Faktör XI
FXII	Faktör XII
FXIII	Faktör XIII
M	Molar
MALDI	Matriks Yardımcı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
ml	Mililitre
mM	Milimolar
PTS	Post trombotik sendrom
vWF	Von Willebrand factor
TAFİ	Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PAI 1	Plazminojen aktivatör inhibitörü 1
PI	İzoelektrik nokta
PA	Plazminojen aktivatör
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Rpm	Rotation per minute
SSP	Örnek spot proteini (Sample Spot Protein)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TF	Doku Faktörü
TM	Trombomodolin
T	Timin
Tof	Uçuş zamanı
VWF	Von Willebrand Faktörü
2D-PAGE	İki boyutlu Poliakrilamid jel elektroforezi
2D	İki boyutlu

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Venöz tromboz ve komplikasyonlarının en sık morbidite ve mortalite nedeni olması; hem venöz trombozun önlenmesinin, hem de tromboembolik olayların tekrarlanma olasılığı açısından yüksek riske sahip olan hastalar için daha etkin koruyucu tedavilerin geliştirilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca gen değişimlerini taşıyan hasta grupları içerisinde ilaç tedavisi veya cerrahi müdahale sonrasında prognozun farklı olması, kontrol grubu asemptomatik bireylerde de genetik trombotik risk faktörlerinin bulunması gibi açıklanamayan durumların günümüzde proteomik yöntemler gibi daha hassas ve güvenilir tekniklerle açıklanması gerekliliği doğmuştur. Venöz Tromboembolizm (VTE) için kişiye özel risk faktörlerinin önceden belirlenebilmesini sağlayabilecek yeni hedef moleküllerin bulunması tedaviye yön verebilecek olması nedeni ile önem taşımaktadır. Ayrıca bulunan yeni hedef molekülleri sayesinde, görülme sıklığı yüksek olan post trombotik sendrom (PTS)'li hastaların yaşam kalitesi üzerine olan olumsuz etkileri azaltılmış olacaktır (Demiralp 2009).

İnsan genom projesi, yaklaşık 20-25.000 genin olduğunu ortaya koymuş ve projenin tamamlanmasının ardından, genlerin fonksiyonel ürünü olan proteinlere ait bilgi birikimi artmadığı sürece genetik bilginin tek başına yeterli olamayacağı görülmüştür. Bu nedenle proteinlerle ilgili çalışmalara ağırlık verilerek “*proteomiks*” alanı doğmuş, hatta genomik, transkriptomik, metabolomik ve biyoinformatiğin de proteomik çalışmalara eklendiği sistem biyolojisi çalışmaları ağırlık kazanmıştır. Proteomiks alanında yapılan çalışmalar dört ana başlıkta toplanabilir: (1) Protein izolasyonu, (2) proteinlerin ayrımı (elektroforetik, kromatografik vs.) ve ifade analizleri, (3) protein tanımlaması (kütle spektrometreleri, Edman), (4) protein etkileşimleri ve yapısal analizler. Bu şekliyle proteomik yöntemler tıpta erken teşhis ve tedavi seçimi için kullanılabilir, güvenilir veri üretmekte ve bu amaçlarla yeni biyobelirteç tanımlanması için kullanılmaktadır.

Bazı genler, birden çok proteini şifreleyebilir (splicing). Fosforilasyon, glikozilasyon ve proteolitik yıkımları da içeren birçok post-translasyonel modifikasyon sonucu proteinlerin yapısı ve fonksiyonu değişir. Benzer şekilde oligosakkaritler ve lipitler gibi moleküller proteinlere eklenerek hücre kompartmanlarındaki yerleri belirlenir.

Sonuç olarak, vücutta çeşitli şekillerde onbinlerce farklı proteinin sentezi yapılmaktadır. Proteomiks teknolojisi ile sağlık ve hastalık gibi farklı koşullarda bulunan hücre, doku ve vücut sıvılarındaki proteinlerin birbirleri ile ilişkileri, yapı ve fonksiyonları sistematik olarak incelenmekte ve nicel (kantitatif) analizleri yapılmaktadır. Son yıllarda, bu teknoloji biyolojik belirteçlerin (biomarker) tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Biyolojik belirteçler, bir biyolojik sistemin fizyolojik durumunu yansıtır ve bu durum hastalık süresince değişebilir. Bu nedenle biyolojik belirteçler özellikle farklı kanser tiplerinde, inflamasyonla seyreden metabolik hastalıklarda, trombozda ve nörodejeneratif hastalıklarda teşhis ve tedavide önemli rol oynamaktadır (Güneştutar et al 2009).

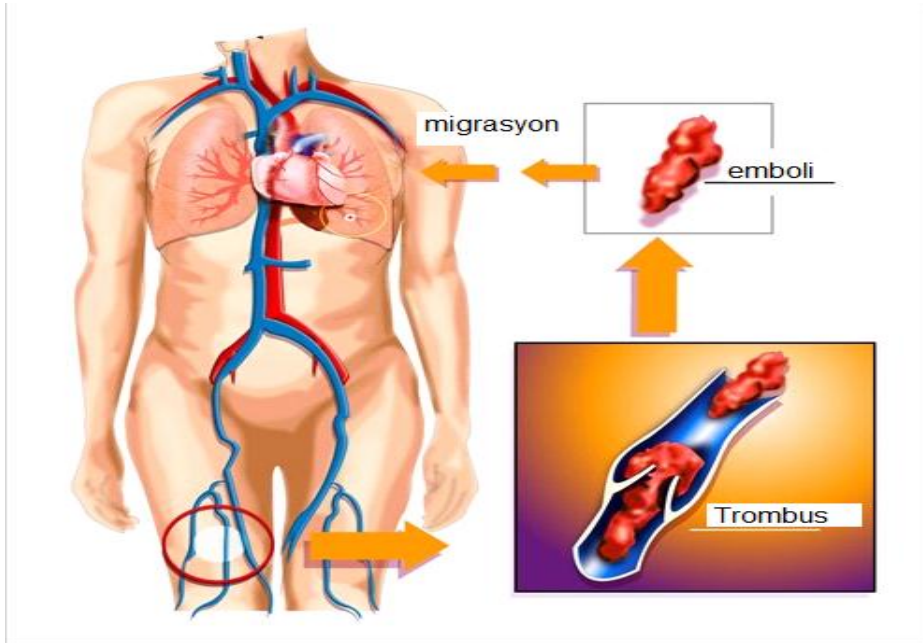
Genom projesi ile elde edilen bilgilerin klinik çalışmalara uygulanması ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacı ile proteomiks kavramı hızla gelişmeye başlamıştır. Hastalıkların tanımlanması ve tedavi geliştirmede yaygın olarak kullanılan genetik tekniklere ek olarak gelişen proteomik teknikler araştırmacılar için büyük bir umut ışığı olmuştur. Proteomiks çalışmalarının gen çalışmalarına ek olarak sunduğu avantajlardan en önemlileri vücut sıvılarında, hücrelerde ve doku biyopsilerinde diyagnostik ve prognostik hastalık belirteçlerinin tanımlanmasına ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine olanak sağlamasıdır. Ayrıca genetik yatkınlık gösteren hastalıkların tanımlanması doğru bir genetik teste gereksinim duyduğu kadar fenotipin de doğru saptanmasını gerektirir. Çünkü bir organizmadaki proteom genomdan farklı olarak daha dinamiktir ve organizmanın bulunduğu koşula (örneğin patolojik durum) ve zamana bağlı olarak değişebilir (Güran 2005).

Dolayısıyla bu tez çalışmasında; genomik ve proteomik yöntemler birleştirilerek, plazma protein profil değişimleri, Protrombin G20210A ve FV G1691A nükleotit değişimi olan ve tromboza yatkınlık gösteren hasta-kontrol grubu örneklerinde özellikle inflamasyona duyarlı abundant (bol) protein düzeyleri açısından incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Tromboz

Damar içinde kan pıhtısının oluşması ve bu pıhtının kan akışını engellemesine **tromboz** denir. Kan akışını engelleyen pıhtı kitlesi ise **trombus** olarak tanımlanır (Şekil 2.1). Pıhtı şeklindeki bu kitle bir kez oluştuğundan sonra, kan akımıyla yerinden koparılıp akımla birlikte sürüklenme eğilimindedir ve dolaşım sistemi içinde böyle serbest dolaşan pıhtılara ise **emboli** denir. Kan akımıyla birlikte sürüklenen bu parçalar dar bir bölgeye geldiğinde tıkanmaya sebep olur ise **tromboembolizm** oluşturur. Büyük arterlerden veya kalbin sol yarısından kaynaklanan emboli; beyin, böbrekler veya başka bir bölgedeki daha küçük sistemik arterler ve/veya arteriollerini tıkar. Venöz sistemden ve kalbin sağ yarısından kaynaklanan emboli ise akciğer damarlarına doğru sürüklenerek pulmoner arter embolizmine yol açabilir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Tromboz>).



Şekil 2.1. Oluşan trombus ve emboli (<http://www.wellsphere.com/general-medicine-article/warfarin-part-1/743626>)

2.1.1. Trombozun sebepleri:

Rudolf Virchow tarafından hastalığın sebepleri teşhis edildiğinden Virchow's triası, yani Virchow'un üçlüsü diye anılır (Blann 2006). Virchow'a göre trombozun üç ana sebebi vardır:

a) Kan akışının yavaşlaması

Uzun süre yatakta yatmayı gerektiren bazı uzun süreli hastalıklar, alçı atel uygulanması, ağır ameliyatlar, konjestif kalp yetersizliği, uzun yolculuklar, şişmanlık veya az hareket etme, kan akışını yavaşlatarak tromboza neden olabilir.

b) Kan yapısının bozulması

Pıhtılaşma bozukluğu olanlarda, tromboz eğilimi artar. Antitrombin III, protein C ve S, fibrinojen, plazminojen gibi pıhtılaşmada rol oynayan bazı faktörlerin eksikliği veya azalması tromboza eğilim yaratır (örneğin doğum kontrol hapı kullanımı, gebelik, nefrotik sendrom, yumuşak doku travmaları, ameliyatlar, kanserler gibi).

c) Damar içyapısının bozulması

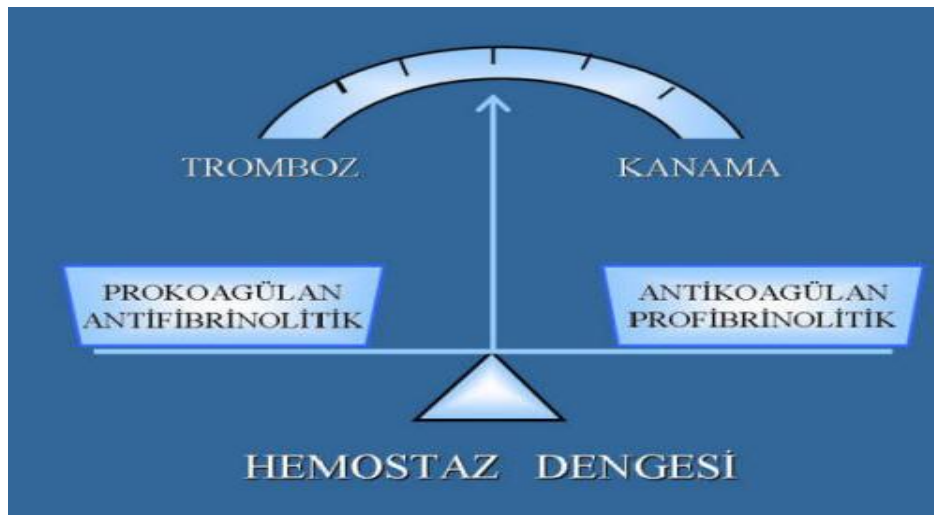
Damarın iç yüzeyinde ortaya çıkan bozukluklar da tromboza eğilimi artırır (aterom plakları, tanı ve tedavi amaçlı vasküler girişimler, enfeksiyon ve travma).

Trombofili (thrombo-philia: trombozu seven) genellikle hemostatik mekanizmaların trombozise yatkınlık sağlayan kalıtsal ya da kazanılmış bozukluklarını ifade etmektedir. Daha çok toplar damarlar (ven) tromboza eğilimlidir. Ama trombofili nedenleri (örn.

antifosfolipid sendromu, hiperhomosisteinemi) venöz trombozun yanında, arteriyel tromboza da yol açabilir (Saymalp 2007).

2.2. Hemostaz ve Damar Yapı Fonksiyonu

Hemostaz, kanın dolaşımında sıvı halde kalmasını sağlayan bir fizyolojik mekanizmadır. Bu fizyolojik mekanizma hem kanın sıvı halde kalmasını sağlar hem de kan damarlarında herhangi bir travma sonucu oluşan kanamayı durdurur ve daha sonra aynı damarın fonksiyonunu devam ettirmesi için damarın pıhtıdan temizlenerek açılmasını sağlar. Bu fonksiyonu da hemostaz-fibrinolitik aktivitelerin bir denge içinde çalışması aracılığı ile (Şekil 2.2) gerçekleştirildiği bilinmektedir (Goodnight and Hathaway 2001).



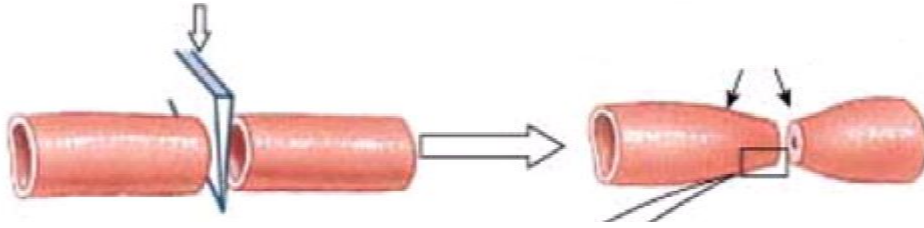
Şekil 2.2. Hemostaz dengesinin şematik olarak gösterilmesi

(www.kanbilim.com/Trombofili.htm)

Bütünlüğü bozulan damar veya damarlardan meydana gelen kanamayı durdurmak için organizma hemostaz mekanizmasını harekete geçirir. Burada 4 ana fizyolojik olay meydana gelir:

a- Damar duvarının büzüşmesi (Vazokstriksiyon)

Damar zedelenmesini izleyen erken dönemde; trombositlerden kaynaklanan Tromboxan A2 ve Serotonin aracılığı ile kasılma (kontraksiyon) oluşur, damar daralır ve kan akımı azalır. (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Damar zedelenmesinden sonraki kasılma

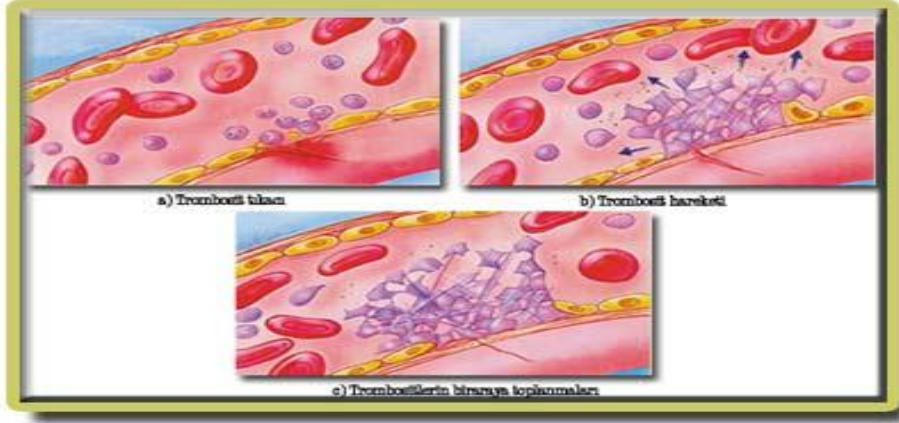
(www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=g)

b- Trombosit fonksiyonu (plak oluşumu)

Hemostazın ikinci fazında yaralanma yerinde gevşek bir trombosit veya beyaz trombüs oluşur (Şekil 2.4). Trombosit fonksiyonu adhesyon, aktivasyon ve agregasyon ile sağlanır. Yaralanma sonucunda trombositler reseptör glikoproteinIb (GpIb) yoluyla endotel altında (intima) açığa çıkan kollajen ve von Willebrand Faktör (vWF)'e bağlanır (GpIb trombosit yüzeyinde Faktör IX ile kompleks yapan bir glikoproteindir). Trombositler ilk 15 saniyesinde buraya yapışmaya başlar. Trombosit tıkaçı oluşuncaya kadar geçen süre klinikte kanama zamanı (KZ) olarak bilinir. Trombosit sayısı $75000/\text{mm}^3$ 'ün altına inmedikçe KZ uzamaz. Trombosit agregasyonu aşamasına kadar olan kısım iki taraflıdır ve birincil hemostazis olarak bilinir. Bu olay heparinle durdurulamaz (<http://www.kanbilim.com/kanp1h.htm>).

c- Pıhtı oluşumu (koagülasyon)

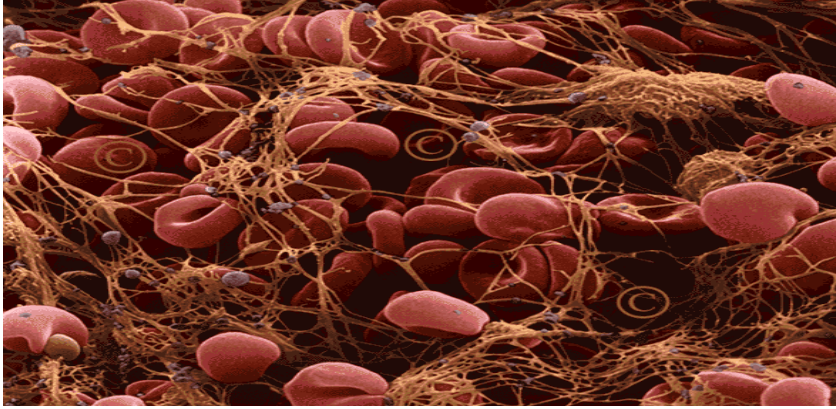
Koagülasyon, hemostazın üçüncü aşamasıdır ve endotele yapışan trombositlerin



Şekil 2.4. Trombosit tıkaçının oluşumu

(www.muhteva.com/pihtilasmanin-ilkadimlari-tr)

oluşturduğu 'primer tıkaç'ın stabil hale gelmesi için eritrosit ve fibrin bağlarından zengin olan kırmızı trombusun oluşumudur. Koagülasyon, plazma pıhtılaşma sistemi reaksiyonlarını kapsar ve sonuçta fibrin oluşur (İkincil hemostaz) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. fibrin oluşumu (dersetkinliklerii.blogcu.com/.../7137406)

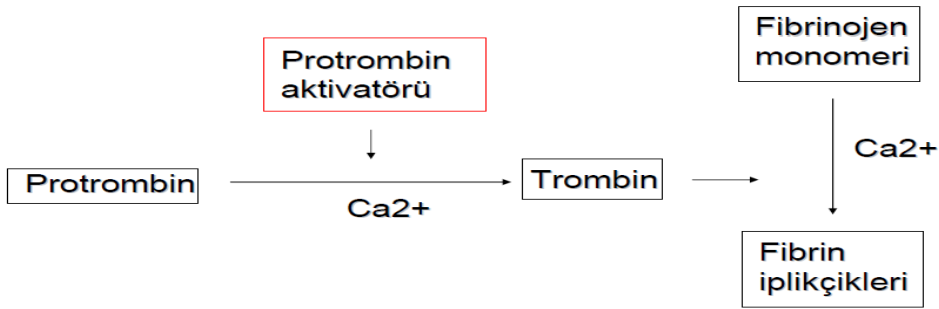
d- Pıhtı oluşumunun durdurulması ve pıhtının erimesi (fibrinolizis).

Pıhtılaşmada bir proenzim olan protrombin, fibrin pıhtısını oluşturacak olan trombin'e dönüşür, fibrinolizisde ise, aynı şekilde bir proenzim olan plazminojen, aktivatörlerin etkisiyle fibrin pıhtısını eritecek plazmin'e dönüşmektedir (<http://www.kanbilim.com/kanpıhtı.htm>).

2.3. Koagülasyon

Koagülasyon; protrombinin proteolitik bir enzim olan trombine dönüşümüdür. Trombin enziminin oluşması ve bu enzimin çözünebilir halde bulunan fibrinojeni (Faktör I) parçalayarak katı haldeki fibrin pıhtısına çevirmesi şeklinde özetlenebilir (Şekil 2.6). Normal koşullarda dolaşan kanda trombin yoktur. Kanda proenzim şeklinde Protrombin (FII) bulunur. Protrombinin trombine çevrilebilmesi için öncelikle Faktör X'un aktive edilmesi gerekir (FXa). Eskiden FX'un birbirlerinden bağımsız iki ayrı yolla aktive edildiği kabul edilirdi: ekstrinsek ve entrensek yollar. Günümüzde bu iki yolun birbirlerinden bağımsız olarak ilerlemedikleri anlaşılmıştır. Ayrıca her iki yolağında koagülasyon başlatabileceği ileri sürülür iken bu günkü anlayışa göre esas başlatıcı olan yolağın ekstrinsek yolak olduğu düşünülmektedir. İntrensek yolak ise indükleyici olarak rol almaktadır. FXa'nın oluşmasından sonra, pıhtılaşma ortak yol' da ilerleyerek sonlanır (Şekil 2.8).

Pıhtılaşmayı oluşturan olaylar zincirinin, pıhtılaşmanın plazmadaki (intrinsik) veya dokudaki (ekstrinsik) başlatıcı sistemlerinin aktivasyonu ile başlatılmasında yalnızca ilk kısım farklıdır. Sonraki kısım her iki durum için de ortaktır (Weitz 1997).

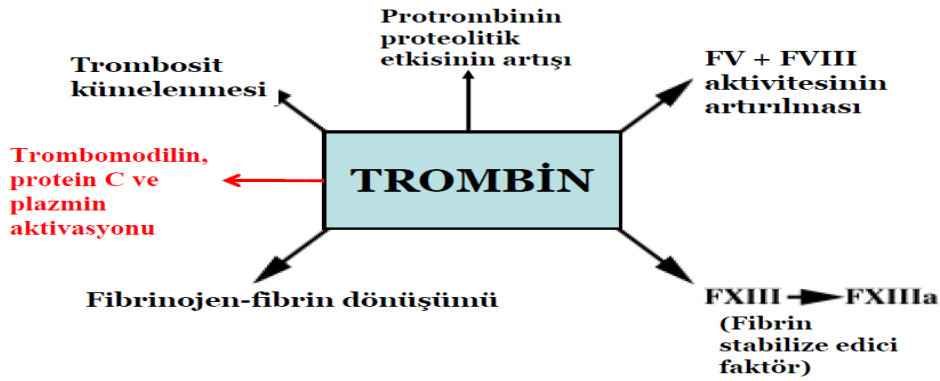


Şekil 2.6. Fibrinin oluşması

2.3.1. Trombinin işlevleri

Trombin kan pıhtılaşma mekanizmasının adeta orkestra şefidir (Gülen 2008). Etkilerini özetleyecek olursak (Şekil 2.7):

1. Trombositleri (PLT) aktive eder.
2. Fibrinojeni fibrine çevirir.
3. Faktör V, VIII ve XI'i aktive eder.
4. Faktör XIII'ü aktive eder.
- 5 Trombomoduline bağlanarak protein C'yi aktive eder.
6. Trombomoduline bağlanarak ThrombinActivatable-Fibrinolysis-Inhibitor (TAFİ)'yi aktive eder.



Şekil 2.7. Trombinin geniş çaplı etki mekanizması

2.3.2. Ekstresek yol

Ekstresek yol X faktörünü aktive eden doku faktörü ve faktör VII kompleksini kapsar. Bu yolda TF, FVII ve ortak yoldan FX, FV, FII (protrombin) ve FI (fibrinojen) yer alır. Koagülasyon kaskadı yaralanmayı izlerken, monosit, endotel hücreler ve endotel altında açığa çıkan doku faktörü ile başlamaktadır. Doku faktörü faktör VII'ye bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu komplekste faktör X'u aktive eder. Faktör X, faktör V, kalsiyum

ve trombosit fosfolipidi ile birlikte 'protrombinaz kompleksi' oluşturarak protrombini trombine çevirir. Bu yol doku faktör inhibitör yolağı (TFPI) vasıtasıyla hızla inhibe edilebilir. İnhibisyon öncesi bu yolak sonucu ortaya çıkan az miktarda trombin intrensek yoldaki faktör XI'i aktive edebilir, bu da koagülasyonun büyümesine neden olur (<http://www.kanbilim.com/kanp1h.htm>).

Damar duvarı lezyonu sonucu açığa çıkan doku faktörünün (TF) pıhtılaşmayı başlattığı yoldur. Protrombin zamanı (PT: prothrombin time) ekstrensek ve ortak yolak patolojilerini gösteren bir testtir. Ayrıca olarak doku tromboplastini kullanılır. Kandaki total protrombin miktarı ve fibrinojen anomalileri hakkında bilgi verir.

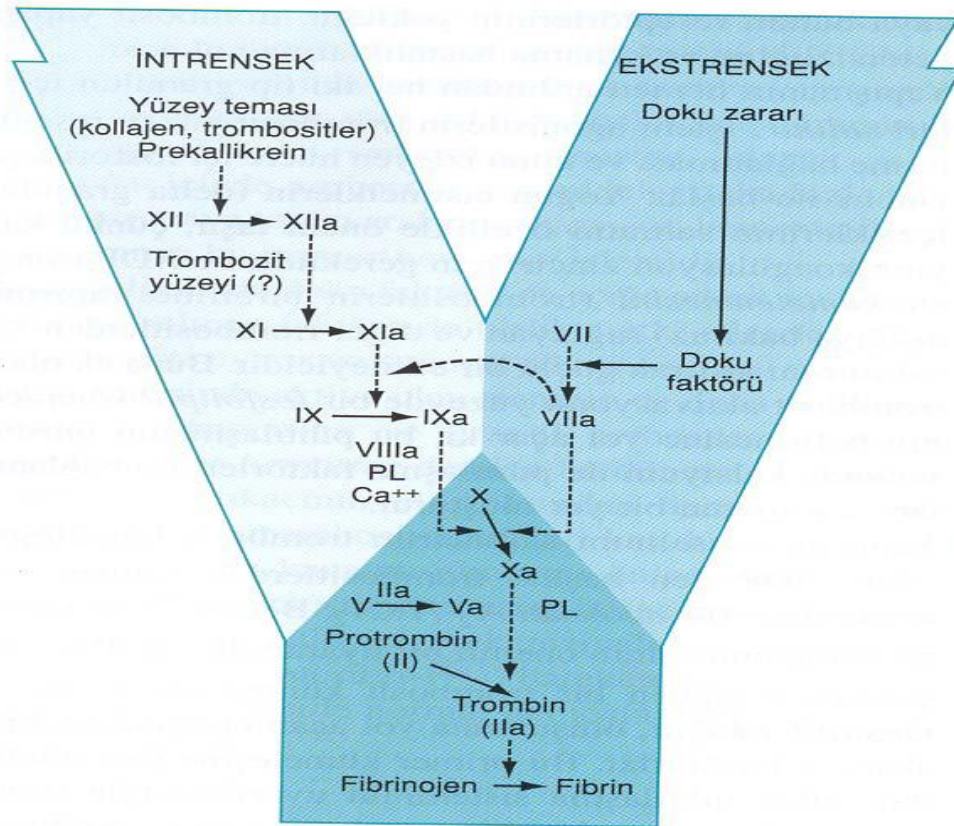
2.3.3. İntrensek yol

İntrensek yol yüksek mol ağırlıklı kininojen, prekallikrein, XII, XI, IX ve VIII'inci faktörleri kapsar. Koagülasyon ekstrensek yoldan elde edilen düşük miktarda trombin yoluyla amplifiye edilebilir. Bu işlem trombinin, faktör XI ve VIII'i aktive etmesiyle birlikte görülür. Aktif olan faktör IX, faktör VIII, kalsiyum ve fosfolipid serin birlikte makromoleküler olan tenaz kompleksini oluşturur, oluşan kompleks faktör X aktivasyonunu arttırarak çok miktarda protrombin oluşumuna yol açar. Trombin ise fibrinojeni parçalayarak solubl fibrin monomerleri meydana getirir, bunlarda daha sonra spontan olarak polimerize olur. Trombin, kalsiyum ile birlikte aynı zamanda faktör XIII'ü aktive ederek bu faktörün fibrin polimerlerinin arasında çapraz bağların oluşmasını sağlayarak daha sağlam ve kalıcı fibrin meydana gelmesini sağlar. İntrensek yol için bir diğer uyarıcı sistem olup doku faktörü-faktör VII kompleksinin doğrudan faktör IX'u uyarması sonucu meydana gelir. Ancak bu minör bir rol oynar esas olarak intrensek yolun uyarımı yukarıda söylendiği gibi trombin yoluyla faktör XI'in uyarılmasıdır (<http://www.kanbilim.com/kanp1h.htm>).

Entrensek yol aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT) ile test edilir. 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 enterensek yolu ölçer ancak günümüzde yerini APTT'ye bırakmıştır

2.3.4. Ortak yol

Ortak yol faktör X aracılığıyla protrombinden trombin oluşumunu sağlar. Bu olay faktör V, kalsiyum ve trombosit fosfolipidi tarafından kolaylaştırılır. Ortak yolun son ürünü fibrinojenden fibrin oluşumuna yol açar.



Şekil 2.8. Koagülasyon kaskadı (yolağı) (Ermiş ve Ark 2006)

Çizelge 2.1. koagülasyon faktörlerinin yolağı ve işlemleri

Faktör	Adı	Yapım yeri	Fonksiyon	Yolak
I	Fibrinojen	Hepatosit	Fibrin prekürsörü	Ortak yol
II	Protrombin	Hepatosit	Serin proteaz	Ortak yol
III	Doku Faktörü	EH+bir çok hücre	Kofaktör	Ekstresek yol
V	Labil faktör	Hepatosit EH,Trombosit	Kofaktör	Ortak yol
VII	Prokonvertin	Hepatosit	Koagülasyon başlangıcı	Ekstresek yol
VIII	Antihemofilik f	Karaciğer sinuzoidleri	Kofaktör	İntrensek yol
IX	Christmas f	Hepatosit	Enzim	İntrensek yol
X	Stuart Prower	Hepatosit	Enzim	Ortak yol
XI	Plazma tromboplastin anedanı(PTA)	Hepatosit	Koagülasyon amplifikasyonu	İntrensek yol
XII	Hageman faktör	Hepatosit	Kontakt faktör	İntrensek yol
XIII	Fibrin stabilize edici f	Hepatosit/Trombosit	transglutaminaz	Ortak yol
Prekallikrein	Fletcher faktör	Hepatosit	Enzim	

2.3.5. Koagülasyon inhibisyonu

Kanımızın 1 mL'sinde vücudumuzdaki tüm fibrinojeni 10-15 saniyede fibrine çevirmeye yetecek güçte bir pıhtılaştırıcı potansiyel vardır. Hemostaz 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.

Organizmada üç ayrı “doğal” inhibitör sistemi trombin oluşumunu frenler:

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

Bunların dışında, pıhtılaşmayı önleyen başka denetim yolları da vardır: Damarlardaki kan akımı yerel olarak oluşmuş aktif pıhtılaşma faktörlerini ve ara ürünleri (kompleksleri) seyreltir. Ayrıca aktif olmuş faktörler ve ara kompleksler retiküloendotelial sistem, özellikle karaciğerdeki makrofajlar tarafından temizlenir. Dolaşıma karışmış doku faktörü (TF) partikülleri de karaciğer tarafından ortadan kaldırılır (Özdoğu 2007).

2.3.6. Fibrinolizis

Fibrinolitik sistem (plazminojen-plazmin sistemi) yerel fibrin birikintilerini eritir ve yara iyileşmesi ile birlikte damar duvarı yeniden şekillenir. Bu sistemde plazminojeni plazmine çeviren aktivatörler, idrardan elde edilen ürokinaz damar duvarı endotelinden salgılanan vasküler plazminojen aktivatörü (PA) ve doku aktivatörleri yer alır. Fibrinolizi sağlayan madde plazmindir. Plazmin vucutta plazminojen olarak bulunur. Doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve ürokinaz plazminojeni aktif bir proteinaz olan plazmine çevrilir. Fibrinolizi sınırlayan majör plazminojen aktivatör inhibitörü trombositlerden salgılanan plazminojen aktivatör inhibitör 1(PAI-1)'dir. PAI-1, t-PA ve ürokinaz ile kompleks yapar

ve fibrinolizin kontrolsüz bir şekilde oluşmasını engeller. PAI-1'den başka plasentada PAI-2 ve idrarda PAI-3 bulunmaktadır. PAI-1 plazminojen aktivasyonunu inhibe ederken oluşan plazmin ise alfa 2 anti-plazmin tarafından inhibe edilir. Alfa 2 anti-plazmin karaciğerde sentez edilir. Plazmin ile kompleks yapar ve plazminin fibrine bağlanmasını engeller (Bayır ve Ak 2003).

2.4. Venöz Tromboembolizm

Venöz tromboembolizm (VTE) morbidite-mortalite oranları yüksek olabilen ve batı toplumunda 1-2/1000/yıl sıklığında görülen bir klinik tablodur. Derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner emboli (PE) aynı klinik tablonun farklı evreleri olarak değerlendirildiğinden, genel olarak venöz tromboembolizm olarak (VTE) adlandırılmaktadır.

2.4.1. Derin ven trombozu (DVT) ve pülmoner emboli (PE)

Derin ven trombozu, venöz sistemin herhangi bir yerinde görülebilecek sistemik bir hastalıktır. Uzun vadede post-trombotik sendrom ile komplike morbidite sebebidir. Virchow üçlüsü olarak adlandırılan, venöz staz, hiperkoagülasyon ve endotel hasarı, derin ven trombozunun oluşumundan sorumlu temel nedenlerdir (Blann 2006).

Venöz tromboz en sık kan akımının yerçekimine karşı ilerlediği ve stazın kolay olduğu alt ekstremiteler ve pelvis derin venlerinde görülür. Bu açıdan venöz tromboz DVT ile eş anlamda kullanılır. Ancak, çok daha seyrek de olsa; DVT vücudun başka venlerine de yerleşebilir: üst ekstremiteler venleri, alt ve üst ekstremitelerin yüzeysel venleri, serebral sinüsler, retina venleri, abdominal venleri (mezenter, portal, hepatik ve renal venler) tutabilir.

Derin ven trombozu (Venöz tromboz), toplardamarlar (ven) içerisinde pıhtı oluşmasıdır. Tromboz; kan pıhtısının oluştuğu yerde kalması anlamına gelmektedir. Toplardamarlar kanın kalbe dönüşünü sağladığı için toplardamar içerisinde şekillenen pıhtı uzantısı koştuğunda ise, kalbin sağ taraftaki odacıklarına ulaşır ve buradan akciğerlere taşınır. Pıhtının bir parçasının taşınması "tromboemboli" olarak adlandırılırken akciğerlerde tutunan emboliye de "akciğer embolisi" (PE) denir.

Derin ven trombozunu önemli bir hastalık yapan en büyük sebep sıklıkla yol açtığı iki komplikasyondur. Bulardan birincisi yukarıda bahsedilen akut dönemde görülen pulmoner emboli (PE) iken diğeri uzun dönemde ortaya çıkan posttrombofilik sendromdur.

Pulmoner tromboemboli mortalite ve morbiditesi yüksek bir hastalıktır. Hastalık için bilinen ve sık görülen risk faktörlerinin yanı sıra, kongenital predispozisyon yaratan nadir durumlar da vardır (Kızılcın 2002).

2.4.2. İnme

Serebrovasküler hastalık (halk arasında bilinen ismiyle inme/felç), kalp hastalığı ve kanserden sonra en sık görülen ölüm sebebidir. İnme, veya iskemik beyin-damar hastalığı, merkezi sinir sistemine giden damarların hastalıkları sonucu gelişen tıkanıklıklar ya da damar dışına kanamaların yol açtığı ani ya da iktal, fokal veya global nörolojik belirti gelişimi olarak tanımlanabilir. Belirtiler 24 saati geçmeden tamamen düzelse geçici iskemik atak, 24 saati geçip 3 hafta içinde düzelleme gösterirse geri dönücü iskemik nörolojik defisit şeklinde adlandırılır (Bilguvar et al 2008).

2.5. Trombofilik Hastalıklarda Risk Faktörleri

Yapılan çalışmalarda özellikle ileri yaşın, cinsiyetin (erkek), Afrika kökenli olmanın,

sosyoekonomik seviyenin düşük olmasının, ailede inme öyküsü olmasının, yüksek seyreden kan basıncının, diyabetin, dislipidemilerin ve kalp hastalıklarının, sigara ve yüksek miktarda alkol kullanımının, obezitenin inme için önde gelen risk faktörleri olduğu gösterilmiştir. Bu risk faktörlerinin sadece ateroskleroza hızlandırarak değil, aynı zamanda hemostatik ve mikrodolaşım bozuklukları, uyku uyanıklık düzenindeki bozulmalar ve çevresel bazı faktörlere bağlı olarak da inme sıklığını arttırdıkları gözlenmiştir.

Trombofili, multifaktoriyel bir hastalık olup hem çevresel hem genetik faktörler etyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Tromboza eğilim oluşturan durumların çoğu edinseldir. Kalıtsal tromboz nedenlerine ise nadiren rastlanır.

Kalıtsal trombofili olgularının %50'sinde ayrıca tetikleyici edinsel nedenler saptanabilir (örn. Faktör V Leiden'li bir kişide uzun uçak yolculuğuna bağlı hareketsizlik). Öte yandan, bazı kalıtsal trombofili olgularında bir yerine iki herediter risk faktörü bulunabilir. Bu durumda VTE riski çok daha yüksektir.

Bilinen risk faktörlerinin ortaya konmadığı VTE olgularında “idiyopatik VTE” den söz edilir. Günümüzde hastaların yaklaşık % 80'inde bir risk faktörü saptanır (Tesselaar ve Osanto 2007).

2.5.1. Çevresel risk faktörleri

VTE'e neden olan çevresel risk faktörleri aşağıda sıralanmıştır, bazı çevresel risk faktörleri arterial tromboza da eğilimi artırmaktadır.

a) Postoperatif venöz tromboz:

Cerrahi sonrası venöz tromboz, yarım saatten uzun süren ameliyatlarda, majör abdominal, göğüs, beyin ve ortopedik cerrahi uygulanan yaşlı ve obez kişilerde sık görülür. Cerrahi sırasında pıhtılaşmanın aktivasyonu, cerrahi sonrası immobilizasyon ve staz tromboz oluşumu için majör faktörlerdir. Bu tür ameliyatlarda mutlaka mekanik ve/veya

farmakolojik olarak düşük molekül ağırlıklı heparin gibi profilaksi uygulanır (Kurt et al 2002).

b) Malignensi:

Malinitelerde tromboz gelişme riski oldukça yüksektir. Yapılan çalışmalar kanser hasta grubunda VTE riskini normal populasyona oranla 6 kat daha fazla bulmuştur. Malinitelerdeki trombozun patogenezi karışık ve multifaktöryeldir. Tromboz patogenezinde tümör hücrelerince prokoagülan madde üretimi (doku faktörü ve kanser prokoagülan) inflamatuvar sitokin salınımı ve tümör hücrelerinin kan ve endotel hücreleri ile etkileşimi rol oynar. Ayrıca koagülasyon inhibitörlerinin azalması ve yetersiz fibrinliz de önemlidir. Kanser hastalarında; kemoterapi, takılan santral kataterler de tromboz riskini artıran faktörlerdir (Çelebi 2004).

Kanserli hastalar, tromboza eğilimi olan hastalardır. Bu konuda dünyanın farklı yerlerinde farklı çalışmalar yapılmıştır. Sifontes ve arkadaşları kanser hastalarında FVL mutasyonunun VTE ve tromboza yatkınlığı artırmadığını açıklamışlar ancak Haim ve arkadaşları, FVL mutasyonunun VTE için risk faktörü olmadığını ancak APCR mutasyonunun VTE için risk olduğunu rapor etmişlerdir. Eroğlu ve arkadaşları (2006) ise VTE'li kanser hastalarında yaptıkları bir çalışmada FVL mutasyonunun VTE için risk faktörü olduğunu, protrombin mutasyonunun ise VTE'e katkıda bulunmadığını belirtmişler ve kanser hastalarında FVL genotiplemesinin yapılmasını önermişlerdir (Eroğlu et al 2006).

c) Kan hastalıkları:

Myeloproliferatif hastalıklar (MPH), myelodisplastik sendrom, paroksizmal noktürnal hemoglobinüri (PNH), orak hücreli anemi ve hemolitik anemili hastalarda tromboembolik olaylar görülebilir. MPH'da kanın hipervizkozitesindeki artış, trombosit aktivasyonu ve damar endotel hasarı nedeniyle koagülasyon sistemindeki aktivasyon nedeniyle tromboza neden olabilirler. PNH'da trombosit ve koagülasyonun aktivasyonu bağlı olarak hepatik ven, vena kava, portal ven ve mezenterik vende tromboz gelişebilir. Hemolitik anemilerde

eritrositlerden açığa çıkan ADP trombosit agregasyonunu artırır. Orak hücre hastalığında trombin üretimi, nötral antikoagülanlardaki azalma, lökositlerin içindeki hücresel elementlerde ve trombosit aktivasyonu, doku faktörünün artması ile oraklaşmış eritrositlerin mikrosirkülasyonda tıkanıklığa yol açması arteriyel ve venöz tromboz gelişiminde önemlidir (Çelebi 2004).

d) Diğer edinsel hastalıklar ve çevresel faktörler:

Östrojen tedavisinde prokoagülan faktör düzeylerinde (VII, X, XII, VE, XIII) artış ile antikoagülan faktörlerden protein S ve antitrombin düzeylerinde azalma olur (Çelebi 2004). Gebelik ve puerperium dönemine tromboemboli gelişen hastalarda, protrombin G20210A mutasyonunun prevalansı, tromboembolik komplikasyonu olan hastalarda daha yüksek olmasına rağmen gebelik ve puerperium döneminde venöz tromboz geçiren kadınlar ile normal gebelik geçiren kadınlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Yılmazlar et al.2000).

Nefrotik sendrom, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBH), Kemik iliği transplantasyonu kemoterapi ve radyoterapiye bağlı olarak hepatik venül ve sinüzöitlerdeki endotel hasarına bağlı olarak veno-oklüziv (damar endotelinde zedelenme sorumlu tutulmaktadır) hastalık gelişebilir. İleri yaş da VTE riskini daha önce belirtildiği gibi artırır. Bu durum hareketsizliğin artması, kas tonusunun azalması, başka inflamatuvar hastalıkların birlikteliği ve damar duvarının yıpranması ile açıklanabilir (Çelebi 2004).

2.5.2. Kalıtsal risk faktörleri

Kalıtsal trombofili venöz tromboembolizme genetik yatkınlıktır. Genel toplumda koagülasyon anormallikleri yaygındır ve bazı bireylerde herhangi bir risk faktörü olmadan spontan olarak da görülebilmektedir. Ailede tromboz öyküsü olanlarda, mutasyon bulunma olasılığı yüksektir. Tromboz için en sık görülen kalıtsal risk faktörleri olan faktör V Leiden

ve protrombin G20210A gen mutasyonu venöz tromboembolizm açısından yüksek risk taşırlar. Bu trombofili nedenleri, tekrarlayan venöz tromboemboli ataklarını artırmaktadır (Atahan et al.2009).

a) Antitrombin III eksikliği

AT III glikoprotein yapısında olup karaciğer tarafından sentezlenir. AT III, trombin ve diğler serin proteazları (aktif faktör X, IX, XI ve XII) inaktif eder. Heparin, tromboz ve FXa inaktivasyonu artırır. AT III eksikliği otozomal dominant geçiş gösterir (Çelebi 2004).

b) Protein C ve protein S eksikliği

İlk kez 1981 yılında Griffin ve ark., tarafından PC'nin antijenik yapısı normalin %50'sinin altında bulunan ve tekrarlayıcı tromboz hikayesi olan bir hastada tarif edilmiştir (Kılbaş 2007).

Heterozigot PC eksikliğinin, immünolojik ve fonksiyonel ölçümlerle tespit edilen iki tipi vardır. Tip I eksiklik (Klasik tip): PC'nin immünolojik ve biyolojik aktivitesi normalin %50'si civarındadır; PC'nin moleküler yapısı normal, ama miktarı azdır. Hastaların çoğu tip I'dir. Tip II: İmünojenik PC miktarı normal, ancak PC molekülü fonksiyonel olarak yetersizdir (Sayınalp 2007).

Protein S plazmada iki formda bulunur; %40-50 kadarı serbesttir ve geri kalanı ise C4b-Bp'ye bağlıdır. Serbest olan protein S protein C'yi kofaktör olarak aktive etmektedir. Protein S'nin varlığında aktive protein C, FVa ve FVIIIa'yı inaktive etmektedir. Ayrıca protein S, protein C'nin fibrinolizis etkisini artırmaktadır. Protein S direkt olarak protrombinin FVa ve FXa ile etkileşimini inhibe etmektedir (Atahan 2009).

PC ve PS 'K' vitaminine bağlı olarak karaciğerde sentezlenir. Aktive protein C (APC), aktif faktör V ve VIII'i inhibe eder. Trombin, PC'yi yavaş aktive eder, ancak trombin trombomoduline bağlanırsa PC aktivasyonu artar. Aktive PC'nin Va ve VIIIa'yı inaktivasyonu kofaktör olan PS ile artar. PC ve PS eksikliği otozomal dominant geçiş gösterir (Çelebi 2004).

c) Aktif Protein C rezistansı (faktör V Leiden)

PC, karaciğerde üretilen vitamin K'ya bağlı bir glikoproteindir. Bu protein koagülasyon sırasında trombomodulin adlı reseptörle etkileşerek FV ve FVIII'in aktif formlarını inhibe eder. Bu inhibisyon antikoagulan etki oluşturur ve koagulan sürecini düzenler. Bazı plazma moleküllerinin antikoagulan moleküllere karşı bir resistans gösterir, bu moleküller aktifleşmiş protein-C (APC) olarak tanımlanmıştır. APC rezistansı, aktif olan FV'nin inaktivasyonunu geciktirerek sonuçta aşırı koagülasyon ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu anormalinin yüksek oranda tekrarlayan venöz, daha az sıklıkta da arterial trombozlara sebep olduğu günümüzde bilinmektedir.

APCR ile inaktive olan FV'deki FVL mutasyonu ise 1994'de Bertina ve ark. tarafından tanımlanan, genin 10. ekzonunda 1691. pozisyonda Guanin/Adenin değişimidir. Bu değişim FV proteininde 506. sıradaki Arginin aa.'nin Glutamin'e dönüşmesine sebep olur (Sılan ve Zafer 2004).

Otozomal dominant kalıtım gösterir ve en sık görülen kalıtsal trombofili nedenidir. Açıklanamayan venöz trombofili hastaların %25-50'sinde görülür. Venöz tromboz riski, heterozigot bireylerde normal popülasyona oranla 5-10, homozigotlarda ise 50-100 katına ulaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda Faktör V Leiden mutasyonunun arteriyel tromboz ve Miyokard Infarktüsü (MI) insidansını arttırıp arttırmadığı konusunda çelişkili sonuçlar bildirilse de özellikle sigara içen genç bayanlarda Faktör V Leiden mutasyonu varlığında başka risk faktörü olmasa bile kalp krizi riskinin 30 kata kadar arttığı bildirilmiştir. Ayrıca bu mutasyonun bireylerde venöz tromboz, periferik vasküler hastalıklar, felç, tekrarlayan düşük ve pulmoner embolizm görülme riskini arttırdığı düşünülmekte ve bu konularda çalışmalar devam etmektedir. Bu nedenle trombofili için yüksek risk grubunu oluşturan bireylerin taranması oldukça önemlidir.

Bu mutasyonun sıklığı toplumlar arasında farklılık göstermekle birlikte genel olarak % 5-7 arasında değişmektedir. Türkiye'de FVL (FV G1691A) mutasyonu en sık görülen mutasyonlardan biri olarak bilinir ve sıklığı % 7- 10 arasında değişmektedir (Yılmaz 2004). Homozigot FVL mutasyon sıklığı ise % 0.02- 0.12 arasında değişmektedir (Longstreth et al 1998).

Aynı ekzonda görülen ve fonksiyonel önemi olmayan diğer bir aminoasit değişikliği, R485K, Taylanda'da önemli ölçüde sık bulunmakta ve trombofili ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Elde edilen bulgular Türkiye toplumunda R485K polimorfizminin alel sıklığının Avrupa ile aynı düzeyde olduğunu ve tromboz riskindeki artışla ilişkili olmadığını göstermiştir (Berber et al. 2003).

Faktör V (H1299R) mutasyonu da FVL gibi aktive edilmiş protein C rezistansı ile ilişkili olarak tromboza eğilimi artırmaktadır. Faktör V H1299A gen mutasyonu, FVR2 olarak da adlandırılmaktadır ve tüm dünyada etnik gruplar arasında farklılıklar arz etmekle birlikte sıklığı % 9.5-15.2 gibi yüksek oranda olduğu halde tromboemboliye olan ilişkisi FVL mutasyonuna göre daha azdır (Zaatari et al. 2006). Nadir olarak homozigotluğu tromboz risk faktörü olarak bilinmekte ve gelecek araştırmalarda tromboz risk faktörü olan diğer faktörler ile beraber değerlendirilmesi öngörülmektedir (Ulu et al. 2003).

d) Protrombin G20210A

1996 yılında Poort ve arkadaşları tarafından Protrombin geninde ilk olarak tanımlanmıştır. Bu mutasyonda protrombin geninde 3-untranslated bölgesinde guaninin yerini adenin almıştır. Bu mutasyon plazma protrombin düzeylerinde artışa yol açarak venöz tromboz riskini artırır (Çelebi 2004).

İnsan protrombin geni 21 kb büyüklüğündedir ve kromozom 11'in kısa kolunda bulunmaktadır. 14 ekson ve 13 introndan meydana gelmektedir (Atahan 2009).

Protrombin (Faktör II) G20210A gen mutasyonu kalıtsal trombofililerden (pıhtılaşma bozukluklarından) birisidir ve faktör V Leiden mutasyonundan sonra ikinci sıklıkta görülür. Bu mutasyonun Avrupa ve Amerika'daki sıklığı faktör V Leiden'e benzer olup, Afrika ve Asya'da nadirdir. Sağlıklı bireylerde %2, tromboemboli öyküsü olanlarda % 6 oranında rastlanır. Protrombin G20210A, Faktör V Leiden'e göre daha az trombotik risk yaratır.

Protrombin G20210A gen mutasyonu olanlarda tromboz için relatif risk 2-6 kat artmıştır, gebelikte ise risk 10-15 kat artmaktadır. Bu mutasyon açısından taşıyıcı olanlarda da protrombin düzeyi artar ve tromboz riski 2,8 kat artar.

Warshawsky ve arkadaşları bilinen 20210 mutasyonunun dışında C20209T pozisyonunda heterozigot bir mutasyon daha saptamışlardır. Flaujac ve arkadaşları ise ailesinde tromboembolizm öyküsü olan 10 hastada protrombin 20209(C-T), 20218(A-G) ve 20219(T-A) mutasyonlarını rapor etmişlerdir. PT C20209T mutasyonu ilk olarak Özdağ ve arkadaşları tarafından Türk popülasyonunda rapor edilmiştir (Özdağ et al 2006).

e) Fibrinolizdeki defektler

Tromboz patogeneğinde çeşitli fibrinolitik defektler tanımlanmıştır. Bunlar içinde hipoplazminojemi, displazminojemi, doku plazminjen aktivatör (t-PA) salımında azalma, plazminojen aktivatör inhibitör (PAI) düzeylerinde artış sayılabilir. Bütün bu defektler anormal veya azalmış plazmin formasyonuna ve fibrin oluşumuna bozulmuş fibrinolitik yanıtı neden olur. Kalıtsal histidin- zengin glikoprotein (plazminojene bağlanarak plazmine dönüşmesini engeller) düzeylerindeki yükseklik tromboza neden olabilir(Çelebi 2004).

f) Hemosisteinemi (MTHFR 677)

Hemosistein metioninden oluşan bir amino asittir. Hücre içi hemosistein metabolizması üç enzim; metiltetrahidroflavon redüktaz (MTHFR), metionin sentetaz ve sistationin beta sentetaz ile enzimatik olaylarda kofaktör rolü oynayan uç vitamin (folat, B12, B6) içerir. Bu enzimlerdeki kalıtsal eksiklik ve defekt hemosistein düzeylerinde yüksekliğe ve folat düzeylerinde azalmaya yol açarak klinikte permatür arteriyel vasküler hastalık ile arteriyel ve venöz tromboza neden olur (Çelebi 2004).

MTHFR 677 mutasyonu tek başına DVT' a risk faktörü olmamasına rağmen FV ile bir arada olduğunda tromboza risk faktörü olabilmektedir (Akar et al.1998).

2.6. Etiyoloji-Epidemiyoloji

Tromboembolizm olgularının % 50-75'i diz altı cerrahisi ile % 10-40'ı intraabdominal veya intratorasik cerrahiyle birlikte görülmektedir. Ortopedik ameliyatlar, alt ekstermite, pelvis ve kalça ameliyatlarıyla, önceden DVT ve akciğer embolisi geçirenlerde tromboemboli riski yüksektir. Risk faktörü olmayan genç hastaların ameliyatlarında trombozis riski düşüktür. 40 yaş üstündeki hastalarda, ameliyat süresi 30 dk.dan uzun süren olgularda orta dereceli bir trombozis riski oluşmaktadır ve bu risk yaşla birlikte artar. İlk DVT'nin toplumda görülme oranı, sistematik bir araştırmada 1000'de 0.5 olarak bulunmuştur. Bu hastalık 15 yaşından küçüklerde nadirdir. 65-69 yaş arası % 1.8, 85-89 yaş arası % 3.1'e çıkmaktadır. Erkeklerde kadınlara oranla daha fazla oranda görülebilmektedir.

Üst ekstermitelerin venöz tıkanması oldukça nadirdir ve tüm vücut DVT'lerinin yaklaşık % 4'ünü oluşturur. Üst ekstermite derin ven tromboz (ÜEDVT)'lerinin en sık nedenleri şu şekilde sıralanmaktadır: Travma, vena kava superior sendromu, tümör, yabancı cisim, polisitemi, trombositoz, kor pulmonale, konjestif kalp yetersizliği, torasik çıkış sendromu ve pıhtılaşma faktör bozuklukları. ÜEDVT'lerin önemi, bu hastaların bir kısmının asemptomatik olması ve hastaların üçte birinde pulmoner emboli görülebmesidir (Uzun et al 2007).

Ven trombozlarının etyolojileri çok çeşitlidir. Oral kontraseptifler tek neden olarak karşımıza çıkabilse de birkaç nedenden biri de olabilir. Son yıllarda toplumda en sık rastlanan kalıtsal trombofilili nedeni olan faktör V Leiden mutasyonu taşıyıcısı olan kadınlarda oral kontraseptiflerin periferik ven trombozlarında gösterilmiştir. Genç kadınlarda anılan durumlar dışında sistemik hastalıklar (hematolojik hastalıklar, kansere bağlı gelişen paraneoplastik durumlar, Behçet hastalığı ve sistemik lupus eritematozus gibi sistemik inflamatuvar hastalıklar) ven trombozlarının en sık nedenleridir. Nadir de olsa nedeni belli olmayan ven trombozlu hastalarda kalıtsal trombofililer (faktör V Leiden mutasyonu, protrombin II gen mutasyonu, protein C,S ve antitrombin III gibi doğal antikoagülan faktörlerin eksikliği) sistematik olarak araştırılmalıdır. İleri etyolojik

araştırmalara rağmen olguların %25-30'unda belirli bir etyoloji saptanamayacağı ve bu olguların uzun dđnem izlenmesi gerektiği akılda tutulmalıdır (Yeşilot ve Kerspi 2008).

2.7. Patofizyoloji

1856'da Virchow, damar duvarındaki hasarı, kan akımındaki değişiklikleri ve hiperkoagülabiliteni trombus oluşununun temel nedenleri olarak tanımlamıştır. Bu hipotez gđnümüzde hala geğerlidir ve 'Virchow triadi' olarak adlandırılır. Venöz tromboz, dđřük akım zemininde, temel olarak fibrin bantları, kırmızı kan hücresi ve trombositlerden oluşur. Genellikle baldır toplardamar kapakçıklarında oluşup proksimale doğru uzanır. Trombustan dolayı artmış venöz ve kapiller basınç transkapiller filtrasyon hızını arttırarak ödeme sebep olur. Hastaların %50'sinde trombus 3 ay içinde rekanalize olup erir. DVT %90 oranında alt ekstremite venöz sisteminde ortaya çıkmaktadır. Olguların yaklaşık %30'u pelvik bölge venleri, %60'ı alt ekstremite venlerinin tutulumuyla gđrülür. Femoral ven trombozlarının yaklaşık dđrtte birinde pelvik venlere yayılma olur. Pelvik ven trombozlarında (iliyak ven trombozu) akciğer embolisi riski, femoral ven trombozuna göre 2 kat daha fazladır (Uzun et al. 2007).

2.8. Proteomik Yaklaşımlar

Proteomik teknolojisi, iki boyutlu (2D) jel elektroforezi, görüntüleme analizi, kütle spektrometresi, amino asit dizi analizi ve biyoinformatik gibi gelişmiş tekniklerin birleşimini kullanmaktadır. Proteomik alanındaki gelişmeler iki boyutlu jel elektroforezinin 1975 yılında kullanımıyla başlamıştır (Karataylı ve Bozdayı 2008).

Yapılan literatür araştırmalarına göre tümör doku ve hücrelerini iğereren birçoğ doku ve biyolojik sıvı proteomik çalışmalarda kullanılmıştır (Aldred et al. 2004).

Kanser belirteçleri için plazma ve serum kaynak olarak çalışılmaktadır. Potansiyel belirteç olabilen proteinler serum ve plazmada çok düşük konsantrasyondadırlar (ng/ml).

Barcelo-Batllori ve arkadaşları (2002) MALDI tabanlı kütle spektrometrisi ile İBH hastaları ve İBH olmayan sağlıklı kontrollerde intestinal epitelyum hücrelerinde sitokin etkisi ile protein ekspresyon düzeylerini karşılaştırmış ve İBH'lı hastalarda sitokinlerin triptofan metabolizmasına katılan indoleamin 2,3- deoksijenaz enzimi etkisini artırdığını gözlemişlerdir.

Diğer bir çalışmada hepatoselüler kanserli hastalar ve sağlıklı kontrol grubu serum proteomunun 2D-MS tekniği ile incelendiği bir çalışmada komplement C3 fragmenti ve apolipoprotein A1'in belirli izoformunun hasta grubunda sağlıklı gruba oranla azaldığı bulunmuştur (Steel et al 2003).

Proteomik teknolojiler, bir çok kanserlerinin erken tanısı için umut vericidir. Gen tarafından üretilen protein, genetik bilginin gerçek efektör molekülüdür. Bir biyolojik belirteç,biyolojik belirteç paneli veya multipleks bilginin kullanılması kanserlerin saptanmasında en doğru yaklaşımı verecektir (Rosekeila and Eddie 2006).

David ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 2-D PAGE ve kütle spektromu kullanarak prostat kanserinin erken döneminde serum protein ifade farklılıklarına bakarak annexins I ve II ifadelerinde azalma tespit etmişlerdir (David et al. 2006).

Yapılan bir diğer çalışmada 2-D PAGE ve kütle spektrometresi ile MTHFR geninde C677T polimorfizmi olan bireylerin protein profilleri kontrol grubuyla karşılaştırılmış ve kontrol grubuna göre Apolipoprotein A-I seviyesinin düştüğü görülmüştür (Greco et al 2006).

Günel ve arkadaşları kontrol ve GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg) hasta grupları arasında farklılaşan 6 protein spotu tespit etmişlerdir. spotları jellerin ilgili bölgelerinden kestikten sonra tripsin ile muamele ederek kütle spektrometresi ile tanımlamışlardır (Günel ve ark 2009).

Demiralp ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Ankaferd kanama durdurucu içeriğinde tanımlanan bitkisel proteinler proteomik yöntemi ile incelenmiştir (Demiralp ve ark 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasına farklı kliniklerden venöz tromboemboli tanısı almış Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalına genetik analiz için konsültasyona yollanmış 130 olgu ile ailesinde ve kendinde hiçbir venöz tromboemboli öyküsü olmayan 130 kontrol bireyi dahil edilmiştir. Hasta-kontrol grupları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi pediatrik Moleküler genetik bilim dalında öncelikle Faktör V leiden ve protrombin G20210A nükleotit değişimleri açısından taranmış ve farklı genotipe sahip hasta kontrol grupları grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalı proteomik analizler ile değerlendirilmiştir. Projenin Etik kurulu onayı, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri Müdürlüğü tarafından 1997 yılından beri desteklenen farklı projeler kapsamındadır.

Kullanılan bütün kimyasallar moleküler biyoloji veya proteomik çalışmalarında kullanılmaya uygundur. Deneylerde kullanılan kimyasalların listesi Ek 3’de verilmiştir. Kullanılan cihazlar üreticilerinin talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır. Cihazların listesi ve hangi amaçlarla kullanıldığı Ek 2’de verilmiştir. Tüm deneylerde Millipore (Milli-Q ve Elix filtreleri) saf su sisteminden elde edilen su kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1 Örneklerin elde edilmesi

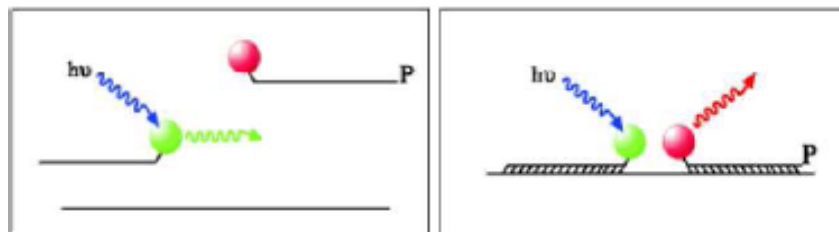
Kan örnekleri 1 ml 0.5 M EDTA’lı (Etilendiamintetraasetik asit, Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 ml kan örneği (1/10 EDTA) olacak şekilde alınmış ve proteomik çalışmalarında kullanılacak plazma, kan örneklerinin 4.500 rpm.’de 5 dakika santrifüj yapılması ile ayrılarak kullanıma kadar -80°C’de saklanmıştır. Plazma ayrıldıktan sonra

kalan kısım üzerinden geleneksel fenol-koloroform yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.2. RT-PCR tekniği ile mutasyon değerlendirilmesi

Elde edilen DNA miktarları spektrofometrik yöntemler ile belirlenmiştir. Hasta grubunu oluşturan 132 bireyin ve 130 kontrol bireyin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile genotipleri Faktör V Leiden ve protrombin 20210 G/A mutasyonu için değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler yeterli konsantrasyonlarda DNA örnekleri eldesini takiben hedef gen bölgesi olan FV 1691 Leiden ve protrombin 20210 bölgelerini içeren gen dizisini sınırlayan özel oligonükleotidler ile ve mutasyonun bulunup bulunmamasına göre değişen bağlanma sıcaklıkları ile amplifiye edilerek RT-PCR ile değerlendirilmiştir.

Tüm bireylerin RT-PCR genotip analizleri LightCycler (Roche) hibridizasyon prob yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İki farklı prob dizayn edilmiştir. 3' ucunda floresans işaretli boya (donor), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp bir birine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Enerji Transfer). Enerji "donor" boyadan "acceptor" boyaya transfer olur. Bu enerji transfer sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak artar (Şekil 3.1) (Günel 2007).



Şekil 3.1. RT-PCR hibridizasyon prob yöntemi

LightCycler PCR sistemi ile, kapiller PCR ile hedef DNA'nın amplifikasyonu, amplifiye olan DNA'nın gerçek-zamanlı olarak floresan artışı ile gözlenmesi ve PCR sonunda, ampliconun spesifitesinin ortaya konması için erime sıcaklığı (temperature of melting) analizi yapmak mümkündür.

3.3. Proteomik Teknikler

Farklı genotiplerin fenotipe etkilerinin araştırılması amacıyla plazma örneklerinde proteomik çalışma planlanmıştır. Proteom çalışmasına; Faktör V Leiden G1691A ve protrombin 20210 G/A mutasyonu taşıyan ve iki gen değişimini de taşımayan 3'er birey hasta ve kontrol grupları içerisinde dahil edilmiştir. Tüm plazma örneklerinin proteomik analizleri ikili tekrarlı çalışılmıştır.

3.3.1. Abundant protein filtrenmesi

Plazmada baskın olarak bulunan proteinler özellikle düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin dağılımını baskıladığından, bazı durumlarda baskın proteinlerin (albümin ve immünoglobülinler gibi) plazmadan filtrenmesi gerekmektedir. Bu işlem için antikor afinitesi temelli bazı ticari kolonlar mevcuttur. Ancak öncelikle bu işlemin örnekler üzerindeki etkinliği ve kullanımının uygunluğu test edilmelidir. Optimizasyon çalışmaları kapsamında bu amaçla iki farklı kolon sistemi kullanılmıştır.

a) Kolon 1 kullanım protokolü:

Abundant proteinlerin azaltılması işlemi boyunca bütün solüsyonlar ve örnekler buz içerisinde muhafaza edilerek:

1. Çalışmada gerekli olan protein miktarı dikkate alınarak, örnekler 1X dilüsyonu yapılmış dengeleme tamponu ile 12.5:1 oranında seyreltilmiştir. Bu çalışmada 64 µL örnek ve 736 µL 1X dengeleme tamponu ile seyreltme yapılmıştır.
2. 0.22 um filtreler kullanılarak 400 µL seyreltilmiş örnekler 1000–2000 g' de 30s santrifüj edilerek kolona uygulanmaya hazır hale getirilmiştir.
3. Uygulama yapılacak kolon hazır hale getirildikten sonra filtre edilmiş örnekten 100µL alınarak kolona yükleme yapılmış, 20 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Kolonun içerisinde serumda bol bulunan 20 proteine özgü antikorlar bulunur. 20 dakikalık bekleme süresi boyunca bu 20 protein kolonda tutulmakta, diğer proteinler ise serbest halde kalmaktadır). Süre sonunda 5000 rpm' de 20sn santrifüj işlemi yapılmıştır.
4. Kolonda tutulan proteinleri uzaklaştırmak amacıyla 2 mL yıkama tamponu kolondan enjektör yardımıyla belirli bir hızda geçirilmiştir. Her filtre edilmiş 100 µL' lik örnek için bu aşamalar tekrarlanmıştır. Santrifüj sonrası toplanan örnekler %95 abundant proteinler için filtrelenmiştir.
5. Filtrelenen plazma protein örnekleri, 5000 Da MWCO filtreler ile konsantre edilerek kullanılmıştır. Konsantrasyon tüplerine maksimum 500 µL örnek yüklenmiş ve 45 dakika +4°C' de 14000 g' de santrifüj işlemi uygulanmıştır.



Şekil 3.2. 20 abundant protein için filtreleme sistemi; Kolon I

b) Kolon II kullanım protokolü:

1. Kolona 1 ml bağlama tamponu (binding buffer) ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir (işlem 2 defa tekrarlanır).
 2. Örnekten 60 µl ve bağlama tamponundan 180 µl olacak şekilde numune seyreltilmiştir.(Total hacim 200 µl olmaktadır).
 3. Dilüe örnek kolona 200 µl olacak şekilde ilave edilmiştir.
 4. Kolon hafifçe 5'er dk aralıklı olacak şekilde 3 defa vortekslenmiştir. 5 dk bekleme süresinin ardından 20 sn. 10000 g'de santrifüj edilmiştir. 5. Santrifüjden alınan kolon üzerine reçineyi yıkamak için 200 µl bağlama tamponu ilave edilerek tekrar 20 s 10 000 g' de santrifüj yapılmıştır.
 6. Albümin ve IgG' leri filtre ederek diğer proteinler saflaştırılır.
 7. Filtrelenmiş örnek hacmi fazla olduğundan 5000 Da MWCO filtre tüpleri yardımıyla numune içerisindeki protein konsantrasyonu saflaştırılmıştır.
- % 90 oranında albümin ve immünoglobülinlerden filtrelenmiş serum örneğinden direkt protein analizine geçilmiştir.



Şekil 3.3. Albümin ve IgG için filtreleme sistemi; kolon II

Plazma örneklerinden her iki kolon sistemi ile abundant proteinlerin filtrelenmesi sonrası elde edilen protein örnekleri ve filtreleme yapılmaksızın kullanılan plazma protein

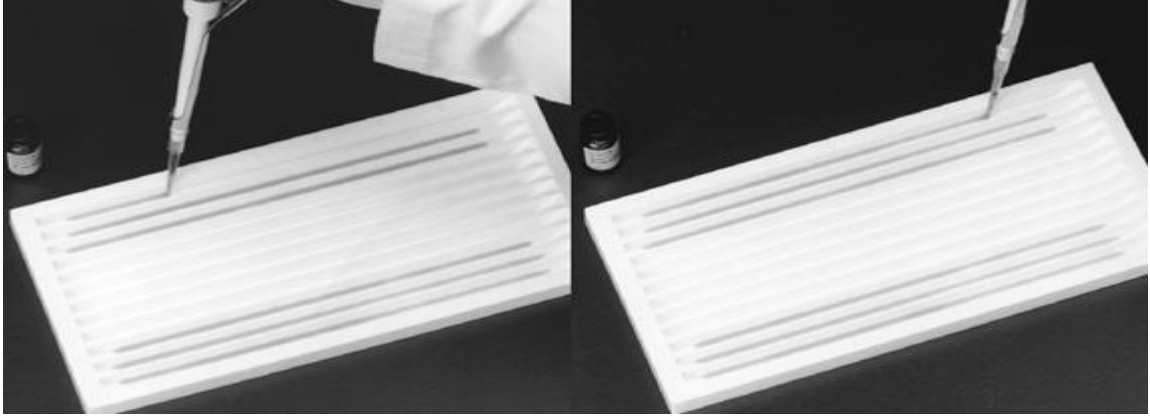
örnekleri çalışmanın devamında kullanılacak iki boyutlu jel elektroforezi sistemine uygulanmıştır. Yüksek moleküler ağırlıklı baskın proteinlerin filtrelenmesi ve diğer proteinlerin zenginleştirilmesi için kullanılan kolon ile filtreleme yöntemleri, kan örneklerinin alınma, plazma ayrılması ve saklanması koşullarıyla yakın ilişkilidir (edtalı tüp, taze kan). Bulgular kısmında verilen örnek plazma protein profilinde görüldüğü gibi (Şekil 4.1) EDTA'lı tüp içerisinde alınan taze kan örneğinden, soğuk zincir bozulmadan uygun koşullar altında plazma örneğinin ayrılması ile filtreleme işlemi belirtilen kolon sistemleriyle yapılabilmektedir. Ancak bu tez çalışması kapsamında kullanılan plazma örnekleri belirtilen uygun koşullarda hazırlanmamış ve saklanmamış olması nedeniyle kolon sistemleriyle filtreleme plazma örnekleri için uyumlu bulunmamış ve çalışmalara filtreleme yapılmadan devam edilmesine karar verilmiştir.

3.3.2. Bradford protein miktar tayini

Eşit miktarda plazma örnekleri proteomik çalışmalara temel teşkil eden iki boyutlu jel elektroforezi için 1:100 oranında rehidrasyon tamponunda seyreltme yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu mikro-plakalarda Bradford (mikro-Bradford) yöntemi ile protein miktarı belirlenmiştir. 5X stok olarak bulunan protein boyası (Bio-Rad) ultra saf su ile 1X'e seyreltilmiştir ve kuyucuklara 200 µl boya, 10 µl örnek koyulmuştur. Örneklerin boyayla reaksiyona girmesi için 15 dk. oda sıcaklığında bekledikten sonra mikropłaka okuyucuda 595 nm'de ölçüm yapılmıştır. Standart olarak 250, 500, 750 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında sığır serum albümini kullanılmıştır. Örnekler üç tekrarlı olarak ölçülüp ortalamaları alınmıştır.

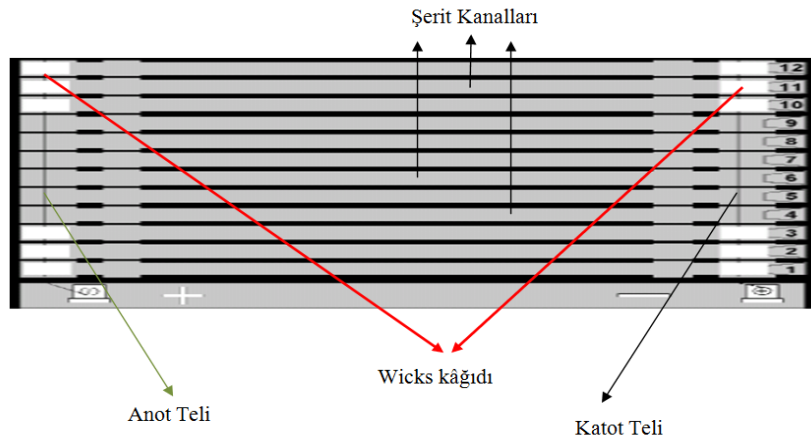
3.3.3. İki boyutlu jel elektroforezi

Aktif rehidrasyon tepsilerinde 17 cm. uzunluğunda ve pH 3–10 aralığındaki Immobilize pH gradient (IPG) şeritlere (Bio-Rad) rehidrasyon tamponuyla (7 M üre, 2 M tiyoüre, %4 CHAPS, %1 amfolit, pH 3-10, 10 mM DTT, bromo fenol mavisi) beraber 175 µg. protein yüklenmiştir ve 50 V'de 16 saat aktif rehidrasyon yapılmıştır (Şekil 3.4).



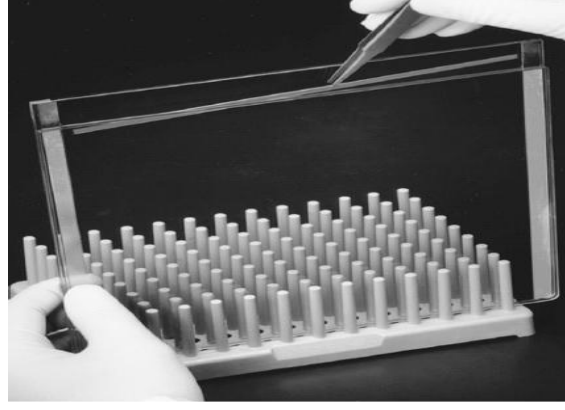
Şekil 3.4. Rehidratasyon tamponunun tabla kanalı boyunca uygulanması (<http://www.scribd.com/doc/24603098/IPG-Ready-Strip-Instructions>)

Daha sonra şeritler temiz bir tepsiye alınarak izoelektrik odaklama işlemi gerçekleştirilmiş ve birinci boyut izoelektrik noktalarına göre protein ayrımı sağlanmıştır (15 dk. 250 V, 3 sa. 10 kV, toplamda 60 kV/sa değerine ulaşana kadar 10 kV)(Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Tablanın kanallarına wicks kağıdının uygulanması

Bu işlemin ardından şeritler, ikinci boyut ayrımaya hazır hale gelmeleri için, çalkalayıcı üzerinde 15 dk. dengeleme tamponu I (6 M üre, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, %2 SDS, %20 gliserol, %2 DTT] ve 15 dk. dengeleme tamponu II (dengeleme tamponu I'de %2 DTT yerine %2.5 iyodoasetamid ve ek olarak bromo fenol mavisi) ile muamele edilmiştir. Ardından şeritler %4'lük toplama ve %12'lik ayırma jellerinden oluşan 1 mm. kalınlığındaki SDS poliakrilamit jele yüklenmiştir (Şekil 3.6).



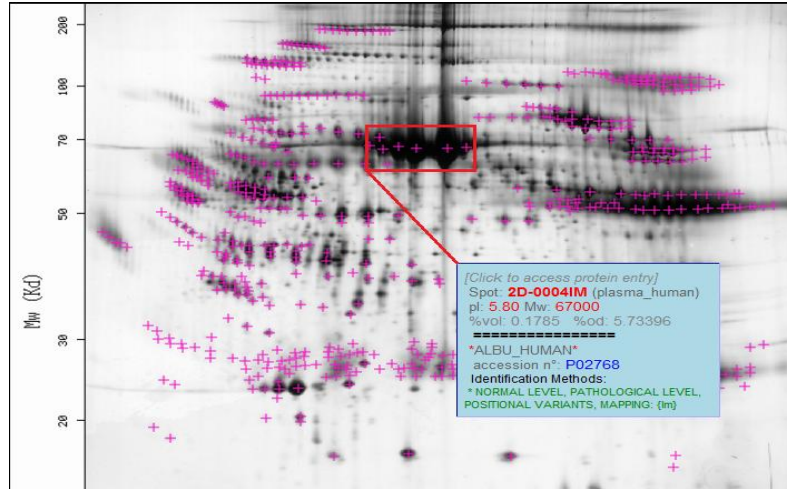
Şekil 3.6. Şeritlerin toplama jeline kadar itilerek, sabitlenmesi (<http://www.scribd.com/doc/24603098/IPG-Ready-Strip-Instructions>)

SDS tamponu (%3.03 Tris-Base, %1.44 glisin, %1 SDS) eşliğinde 30 dk. 100 V ve izleme boyası jelin altına ulaşınca kadar 150 V sabit voltajda ikinci boyut moleküler ağırlıklarına göre proteinlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Jeller her bir örnek için iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.3.4. Jellerin boyaması, görüntülemesi ve analizi

Jeller floresans özellikte bir boya olan Sypro Ruby® (Bio-Rad) ile üreticinin talimatlarına göre boyanmıştır. Bu amaçla, fiksatif çözeltisine (%10 metanol, %7 asetik asit) koyulup çalkalayıcıda 1,5 saat bekletilen jeller daha sonra boya içinde gece boyu çalkalayıcıda bırakılmıştır. Son olarak 1,5 saat tekrar fiksatif içinde bekletilerek VersaDoc (Bio-Rad) görüntüleme sisteminde UV altında görüntülenmiştir. Jel fotoğraflarının analizi PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad) programı kullanılarak yapılmıştır. Tekrarlar programa tanıtılıp grup oluşturulmuştur. Yine aynı program yardımıyla protein kümelerinin üç boyutlu ve çubuk grafikleri elde edilmiştir ve deneysel pH ve moleküler ağırlık değerleri hesaplanmıştır. Kümelerin sayısal yoğunluk değerleri programdan alınmış ve SPSS 9.0 for Windows programında ANOVA uygulanarak *p* değerleri hesaplanmıştır (İstatistiksel analizlerin ayrıntıları için Bölüm 3.4'e bakınız).

Ayrıca, jeller üzerindeki spotların hangi proteinlere ait olabileceği hakkında kütle spektrometresi analizlerinden önce fikir sahibi olabilmek amacıyla görüntüler SwissProt 2DPAGE veri tabanındaki insan plazma görüntüsüyle karşılaştırılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. İnsan plazma protein profili (http://www.expasy.ch/swiss-2dpage/viewer&map=PLASMA_HUMAN&ac=all)

3.3.5. Protein kümelerinin kesimi ve jel içinde tripsin sindirimi (tripsinizasyon)

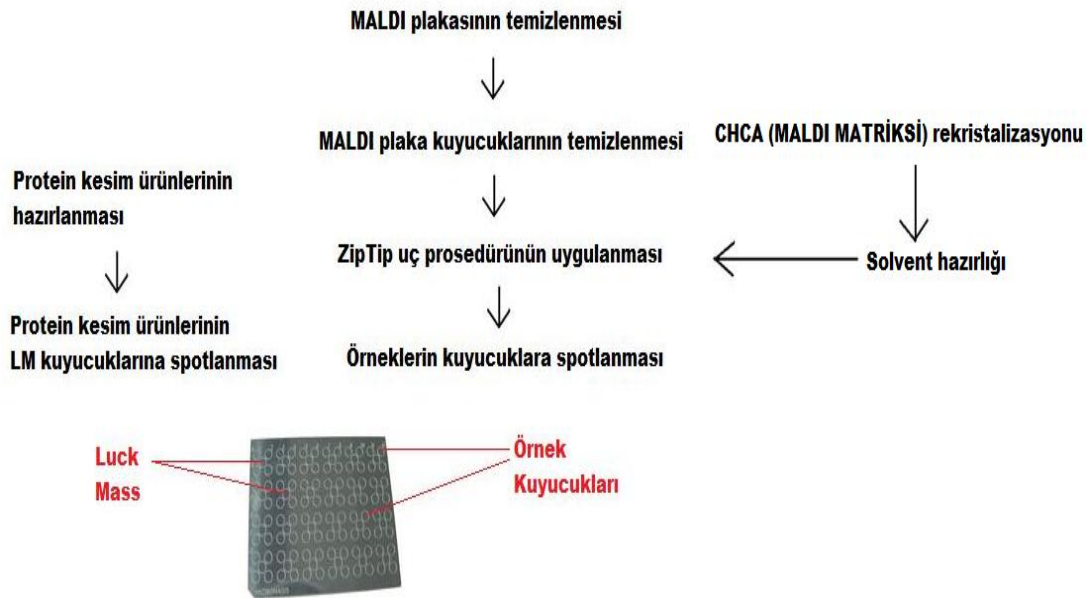
İlgilenilen protein kümeleri robotik bir sistem olan SpotCutter (Bio-Rad) cihazında 1 mm çaplı daire parçaları şeklinde kesilmiştir. Bu amaçla önce jel görüntülenmiş ve ilgili bölgeler PDQuest 8.0.1 programı aracılığıyla belirlenmiştir. Kesimi yapılan parçalar, her bir kuyucuğuna daha önce 200'er µl ultra saf su koyulan V tabanlı plakaların kuyucuklarına robotik kol tarafından koyulmuştur.

Kesim işleminin ardından jel içinde sindirim işlemi (tripsinizasyon) gerçekleştirilmiştir. Öncelikle amonyum bikarbonat ve asetonitril ile jel parçalarının boyası uzaklaştırılmıştır. Daha sonra DTT ile redükleme, iyodoasetamid ile alkilleme yapılmıştır. Bu işlemlerin ardından her bir kuyucuğa 30 µl. 50 mM amonyum bikarbonat içinde 150 ng. tripsin enzimi koyularak enzimin kendi kendini sindirmeden jele geçmesi için 1 sa. 4°C'de bekletilmiş ve enzimin sindirim işlemini gerçekleştirebilmesi için de gece boyu 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra ekstraksiyon tamponu (%1 formik asit, %2 asetonitril) ile jel

içinde sindirilmiş olan peptitler elde edilmiştir. Tripsinizasyon işleminin bütün basamakları laminar akışlı kabinde yapılmıştır.

3.3.6. Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI) ile peptit analizi

MALDI kütle spektrometresi hazırlık şeması aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 3.8. MALDI kütle spektrometresi hazırlık şeması

Uygun bir şekilde yüklemeye hazır hale getirilmiş MALDI-TOF örnek yükleme plakasının kuyucukları önce saf su, daha sonra asetonitril ile yıkanmış ve kuruması beklenmiştir. İyonlaşmayı sağlayacak matriks olarak kullanılmak üzere rekristalize edilmiş *alpha*-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), mg. başına 50 µl. olacak şekilde matriks çözücüsü (%75 asetonitril, %0.1 trifloro asetik asit (TFA) içerisinde hazırlanmıştır. Yüklenecek peptit örneklerinin üzerine eşit hacimlerde örnek çözücüsü (%50 asetonitril, %0.1 TFA) ve matriks eklenerek kuyucuklara 1,5 µl. yükleme yapılmıştır.

MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonu örnek plakasında bulunan "Lock Mass" kalibrasyon kuyucuklarına yüklenen ve moleküler ağırlıkları bilinen 5 peptit

karışımı ile yapıldı (dış kalibrasyon). Bu amaçla, Adrenokortikotropik hormon (ACTH) 18-19, (Glu1)-fibrinopeptit B (Glu-Fib), substance P, renin-14 ve anjiyotensin 1 peptitleri son konsantrasyonları 10-40 pmol olacak şekilde örnek çözücüsü ile seyreltilmiştir. Kullanılan peptitlerin moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 1’de verilmiştir. Yapılan kalibrasyon sonrası peptit karışım m/z değerleri, spektralarıyla değerlendirilmiş ve deneyin doğruluğu test edilmiştir.

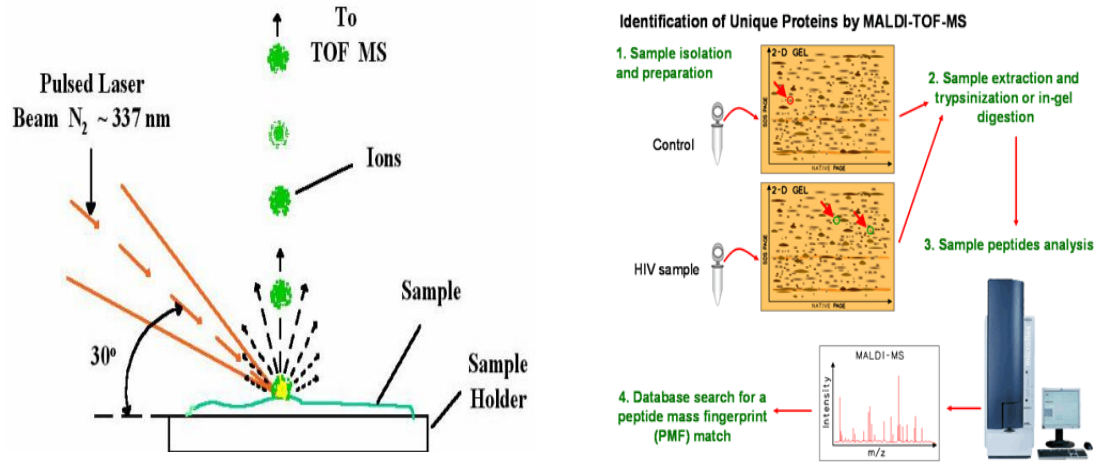
Çizelge 3.1. 5 peptit karışımının kütle değerleri

5 PEPTİT KARIŞIMI	KÜTLE-Da
ANGİOTENSİN	1296,6853
SUBSTANCE P	1347,7360
Glu Fib	1570,6774
Renin-14	1758,9326
ACTH-18,39	2465,1989

Tüm ölçümler 500-3000 Da. arasında refletron pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. Ancak 700 Da altında CHCA matriksin genel iyonlaştırma derecesi gereği gelen kirlilik yoğun olarak her kuyucukta aynı şekilde görülmüş ve bu bölge analizlere dahil edilmemiştir.

3.3.7. Kütle spektrometresi verilerini kullanarak protein tanımlanması

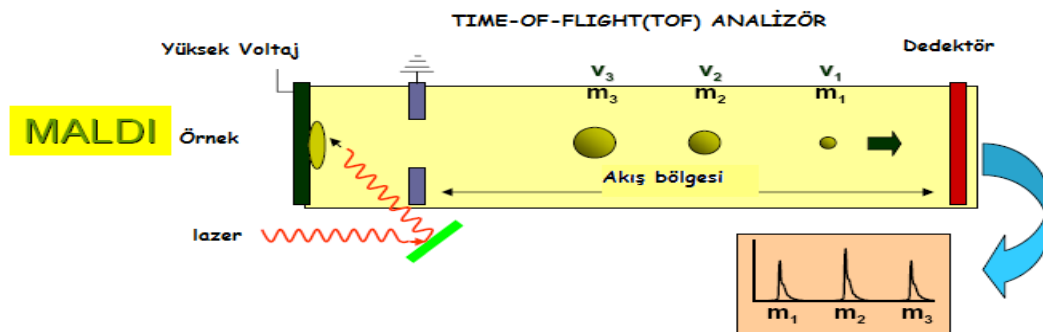
Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) - “Time-of-flight (TOF)” adlı kütle spektrometresi yöntemiyle analitlerin kütle ölçümlerinin hızlı ve kesin olarak yapılmasına olanak sağlanmıştır. Bu teknikte peptidler katı fazdan gaz fazına geçerken, TOF kütle spektrometresiyle hızlı bir biçimde m/z oranlarına göre ayrılırlar.



Şekil 3.9. MALDİ lazer ışınının katı matriksi uyarması ve analitleri iyonize etmesi

MALDI-TOF kütle spektrometresiyle proteinlerin tanımlanması +1 yüklü peptidlerin m/z oranının ölçülmesiyle gerçekleşir. Peptid kütlelerinin doğru ölçümüne dayanan protein tanımlanması için geliştirilmiş farklı programlar vardır. Skorlama için en basit yöntem peptid kütlelerinin sayılarını toplamaktır. Peptid kütlelerinin sayıları protein veri tabanındaki her giriş için tahmin edilen kütleyle eşleştirilir.

TOF analizi, iyonların tümüne aynı miktarda enerjinin verildiği bir dedektöre doğru hızlanan bir dizi iyon dayanmaktadır. Ancak iyonlar aynı enerjiye sahip olmalarına rağmen farklı kütlelerde olduğundan dedektöre ulaşma zamanları farklıdır. En küçük iyonlar hızlarının fazla olmasından dolayı dedektöre ilk ulaşırken daha büyük olan iyonlar daha büyük olan kütleleri yüzünden dedektöre daha geç ulaşmaktadırlar (Şekil 3.10)



Şekil 3.10. Dedektöre çarpan farklı kütlelerdeki iyonlar

Bu tez çalışmasında MALDI-TOF kütle spektrometresinden alınan m/z değerleriyle swiss prot/uniprot veri tabanlarında eşleşen peptid kütleleri Mascot veri analiz tabanları aracılığıyla tanımlandı (www.matrixscience.com). Mascot verileri protein veri tabanında verilen molekül ağırlığı ve pI değerleri açısından 2-D jel elektroforezi MA ve PI değerleri ile karşılaştırılarak tanımlamanın doğruluğu teyit edilmiştir.

3.4. İstatistik Analiz

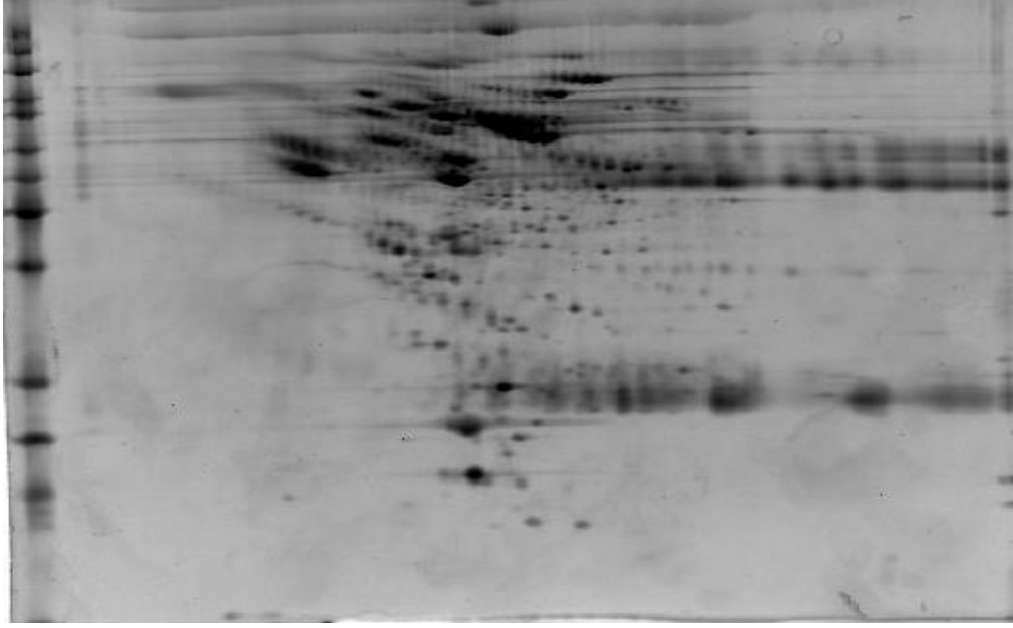
PDQuest programından elde edilen yoğunluk değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması için ANOVA kullanılmıştır (SPSS For Windows 9.0). Analizden önce gruplar içinde bireysel farklılık olup olmadığı test edilip fark bulunanlar analiz dışı bırakılmıştır. Yapılan analizlerde varyansların homojenliği Levene testi ile test edilmiş ve varyansların homojen olduğu durumda Tukey, olmadığı durumda ise Tamhane testi uygulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

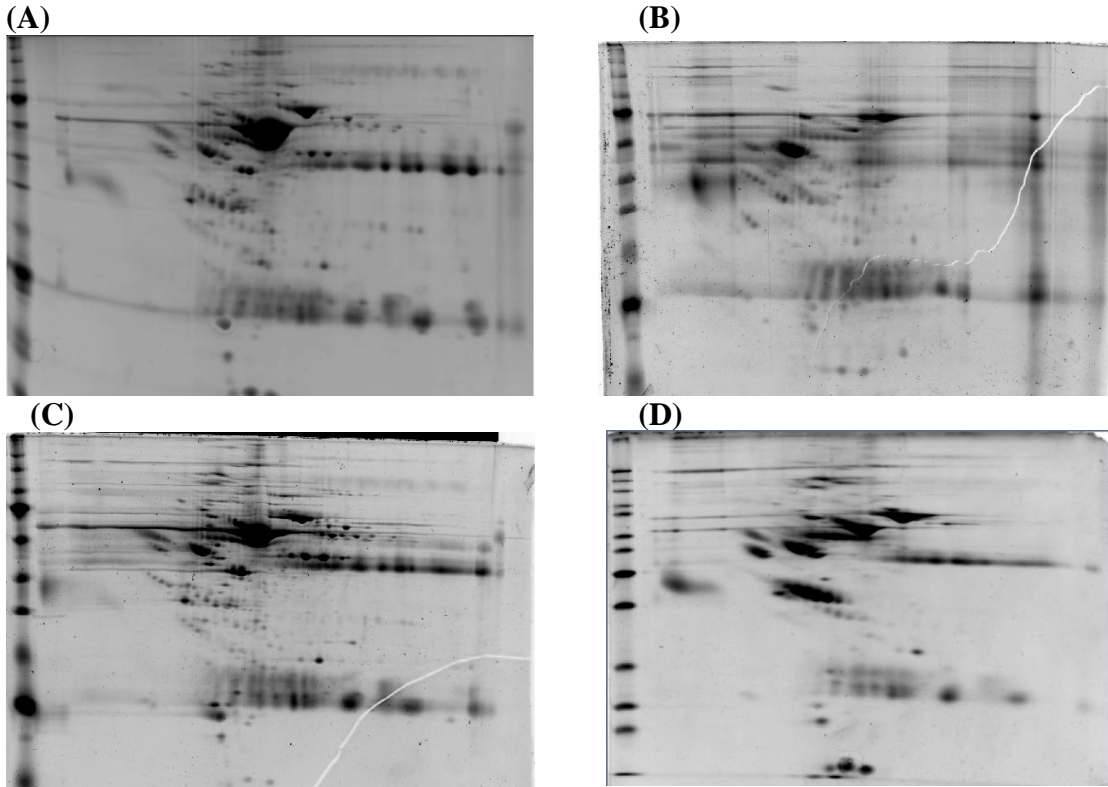
4.1. Plazma Abundant (Bol) Proteinlerin Filtrelenmesi

Proteomik çalışmalarda kullanılabilir bir protein profili elde etmek için en önemli aşama örneğin standardizasyonu ve optimizasyonudur. Örnek tipine ve kaynağına göre değişen tuz ve benzeri inhibitörlerden arındırma ve proteaz ve fosfataz inhibitörleriyle doğal yıkım ve modifikasyonları elimine etmek gerekmektedir. Plazma uygulamalarında, iki boyutlu jel elektroforezi profillemelerinde en önemli optimizasyon ise ifadesi fazla olan albumin gibi abundant proteinlerin filtrelenmesi ve ifadesi az olan proteinlerin profillerinin çıkarılabilir hale getirilmesi yani zenginleştirilmesidir. Farklı kolon sistemleriyle sadece albumin veya ifadesi yüksek 20 abundant proteinin birlikte filtrelenmesi yapılabilir. Kolon sistemlerinin kullanılmasında alınan sonuçlar çalışılan materyalin alınma şeklinden, serum/plazma ayrılmasındaki koşullardan, saklanma koşullarından ve en önemlisi de örneğin taze olup olmamasından etkilenmektedir. Bu etkenlerin değerlendirilebilmesi amacıyla bu tez çalışması kapsamında kullanılacak hasta ve kontrol plazma örnekleri farklı iki tip kolon filtrelemesi ile ve filtreleme yapılmadan çalışılmış ve tez çalışmalarına kolonla filtreleme işlemi yapılmadan devam edilmesine karar verilmiştir .

Yapılan optimizasyon çalışmalarında kit kullanarak yapılan filtrelemenin taze kan kullanıldığında iyi sonuç verdiği görülmüştür (Şekil 4.1). Ancak plazma örnekleri -80°C'de belli bir süre bekletildikten sonra yapılan filtreleme işlemlerinden iyi sonuç alınamamıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Taze kan örneğinden kit I kullanarak filtrleme yapıldıktan sonra elde edilen 2 boyutlu jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.2. Abundant proteinlerin kit I ile filtrenmesiyle (B) ve aynı örneğin filtrenmeden (A) elde edilen 2 boyutlu protein profilleri; abundant proteinlerin kit II ile filtrenmesiyle (D) ve aynı örneğin filtrenmeden (C) elde edilen 2 boyutlu protein profilleri

Optimizasyon çalışmaları sonucunda filtrelemeden iyi sonuç almak için aşağıdaki noktalara dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır: Buna göre standardizasyon yapılması gereken filtreleme koşulları aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- 1- Kan örneğinin ve ayrıca çalışılacak serum/plazma örneğinin taze olması
- 2- Kan alınan tüplerde kullanılan anti-koagulan maddelerin aynı olması
- 3- Kan almaya uygun tüplerin kullanılması
- 4- Plazma ayırma koşulları her çalışma için aynı olması
- 5- Örnekler aynı koşullarda saklanması
- 6- Kitleri kullanırken kontaminasyon için gerekli önlemler alınması

4.2. Faktör V Leiden ve Protrombin G20210A Nükleotit Değişimleri Açısından Gen Tarama Sonuçları

Hasta-kontrol grupları Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Moleküler Genetik bilim dalında Faktör V Leiden ve protrombin G20210A nükleotit değişimleri açısından taranmıştır. Tarama sonuçları Çizelge 4. 1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hasta-kontrol grubu içinde gen taraması sonuçları

Genotipler	FVL		PT 20210		
	Kontrol	Hasta	Kontrol	Hasta	MI Olan
GG	116	115	120	124	10
GA	14	17	10	4	10
AA	0	0	0	0	0

4.3. Oluşturululan Gruplar ve İki Boyutlu Jel Elektroforezi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında karşılaştırma için kontrol ve hasta setleri oluşturulmuştur. Kontrol setine FV G1691A, Protrombin G20210A ve kontrol olmak üzere üç grup dahil edilmiştir. Bunlar grup içi, gruplar arası genel protein profili ve gruplar arası abundant protein profili karşılaştırması şeklinde değerlendirilmiştir. Hasta setine Protrombin G20210A mutasyonu olup MI geçiren ve geçirmeyen ve FV G1691A mutasyonu taşıyanlar dahil edilmiştir. Bunlar da grup içi ve gruplar arası abundant proteinler açısından karşılaştırılmıştır. Oluşturulan gruplar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Oluşturulan kontrol ve hasta setlerindeki deney gruplarını gösteren tablo

Kontrol set grubu değerlendirmeleri	Grup içi standardizasyon	Kontrol grup
		FV G1691A grubu
		Protrombin G20210A grubu
	Gruplar arası genel protein profilinin değerlendirilmesi	Kontrol grup
		FV G1691A grubu
		Protrombin G20210A grubu
	Gruplar arası abundant proteinlerin değerlendirilmesi	Kontrol grup
		FV G1691A grubu
		Protrombin G20210A grubu
Hasta set grup değerlendirmeleri	Grup içi standardizasyon	Protrombin G20210 ve MI geçiren hasta grubu
		Protrombin G20210 ve MI geçirmeyen hasta grubu
		FV G1691A hasta grubu
	Gruplar arası abundant proteinlerin değerlendirilmesi	Protrombin G20210 ve MI geçiren hasta grubu
		Protrombin G20210 ve MI geçirmeyen hasta grubu
		FV G1691A hasta grubu

4.3.1. Kontrol set grubu değerlendirmeleri

4.3.1.1. Grup içi standardizasyonları

Kontrol grubunun standardizasyonu:

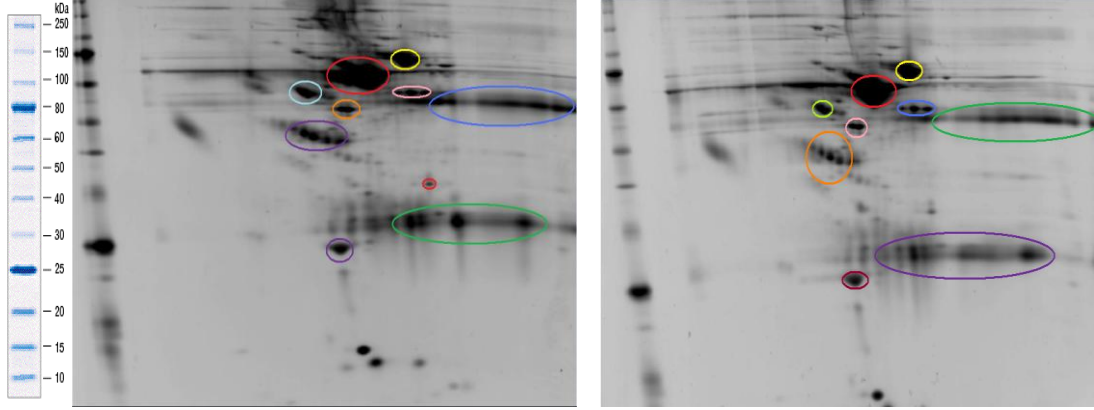
Deney koşulları sabit tutularak, aynı işlemlere maruz bırakılan kontrol örneklerinin tekrarlanabilirlikleri değerlendirilmiş ve kendi içlerinde standardizasyonları sağlanmıştır (şekil 4.3). Yapılan analizlerde A.K.'de 223 ve 224, K.S.' de 196 ve 216 ve .C.' de 229 ve 252 spot bulunmuştur (teknik replikalı olarak).

FV G1691A grubunun standardizasyonu:

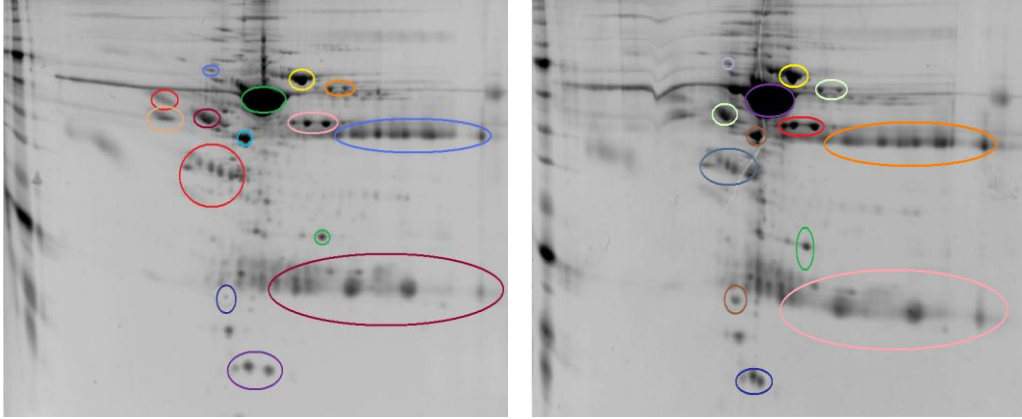
Deney koşulları sabit tutularak, aynı işlemlere maruz bırakılan FV G1691A rneklerinin tekrarlanabilirlikleri değerlendirilmiş ve kendi içlerinde standardizasyonları sağlanmıştır (şekil 4.4). Yapılan analizlerde sırası ile A.D.'de 246 ve 246, E.G.' de 254 ve 253, D.A.'da 245 ve 266 protein spotu bulunmuştur (teknik replikalı olarak).

Protrombin grubunun standardizasyonu

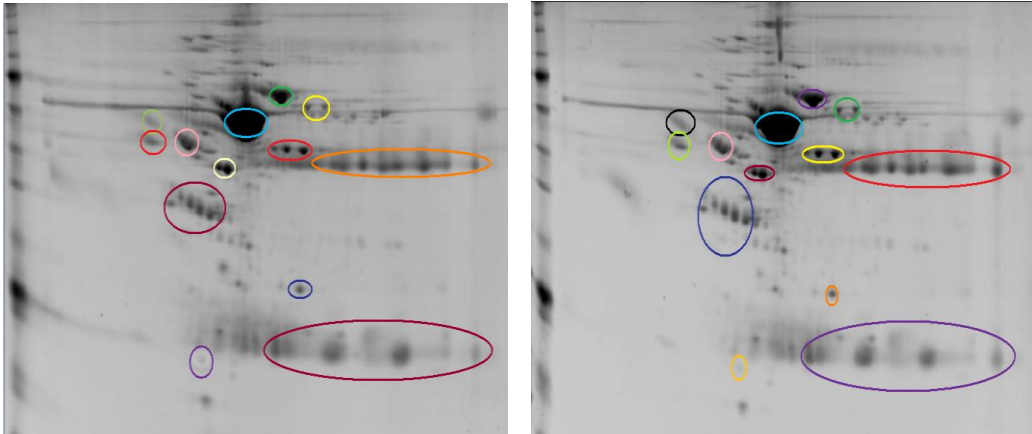
Deney koşulları sabit tutularak, aynı işlemlere maruz bırakılan protrombin örneklerinin tekrarlanabilirlikleri değerlendirilmiş ve kendi içlerinde standardizasyonları sağlanmıştır (şekil 4.5). Yapılan analizlerde sırası ile B.K.'de 225 ve 223, B.G.'de 242 ve 275 ve E.U.'da 217 ve 227 protein spotu bulunmuştur.



A.K.

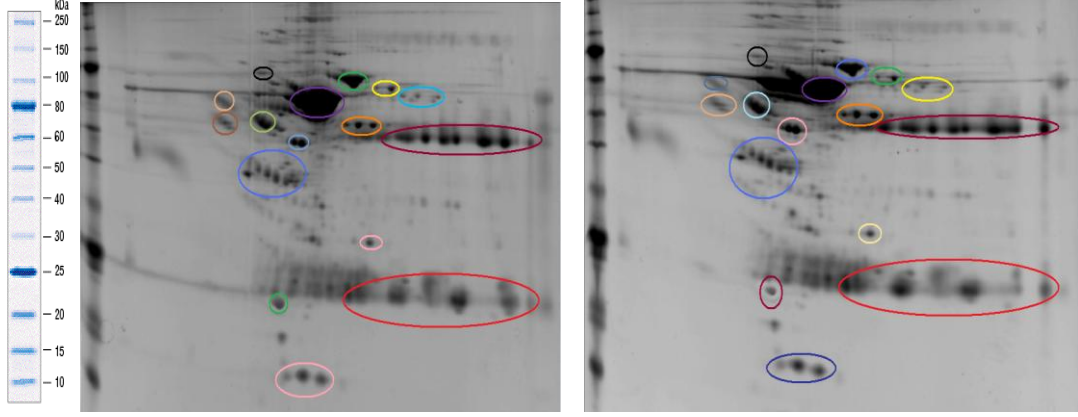


K.S

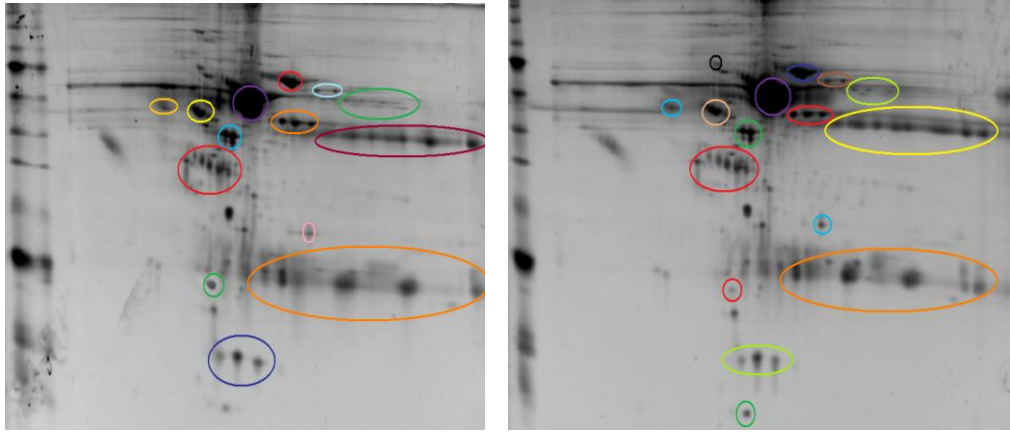


ö.c

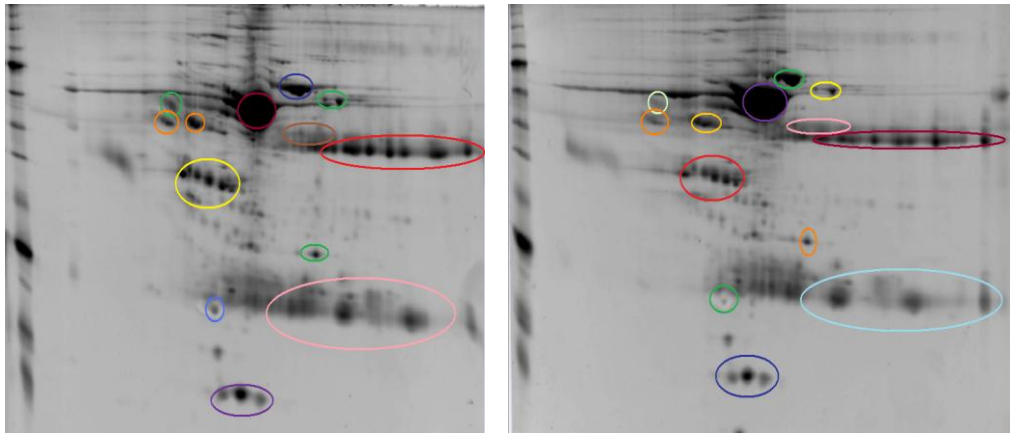
Şekil 4.3. Kontrol grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grup içi standardizasyonun gösterimi (Yanyana olan jeller aynı örneğin teknik replikalarıdır)



A.D

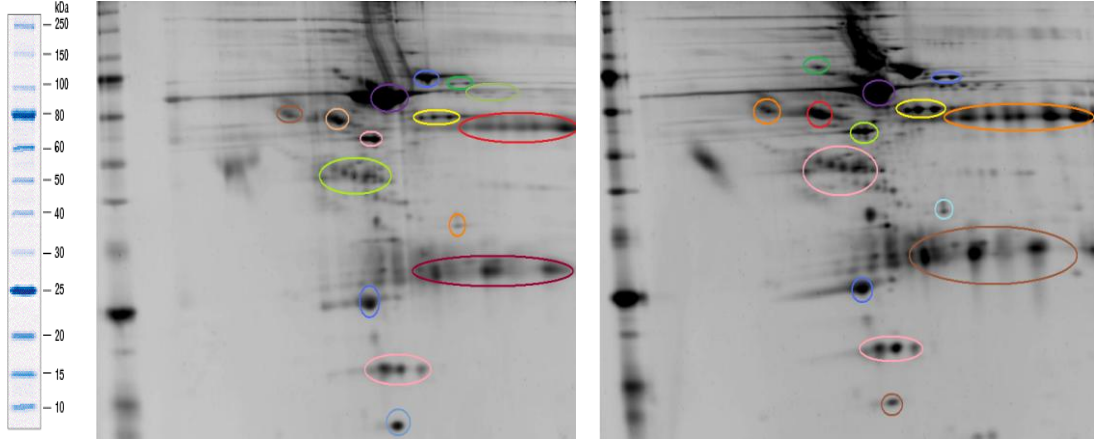


D.A

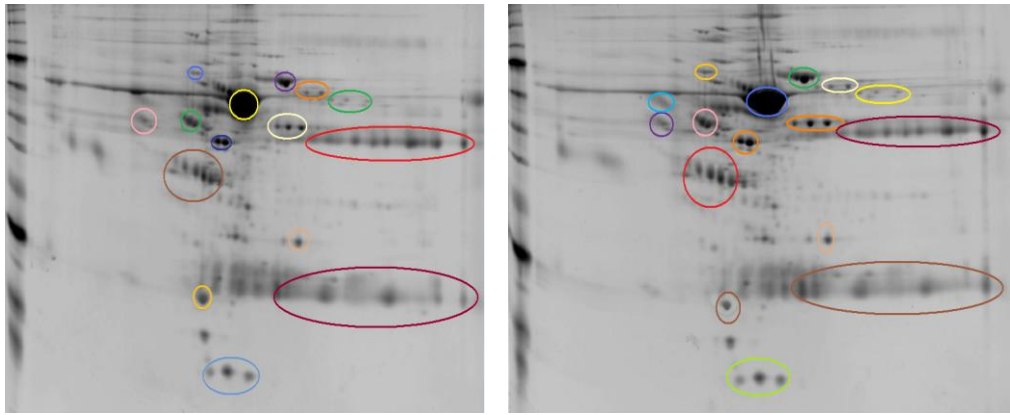


E.G

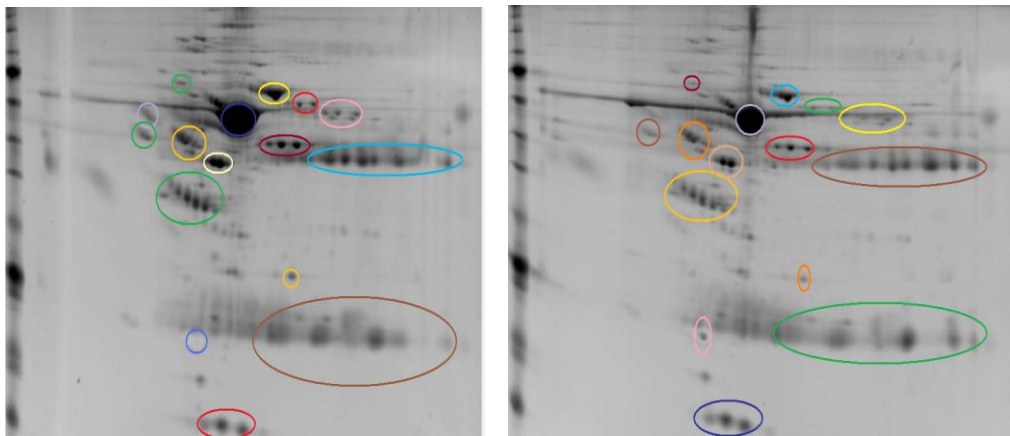
Şekil 4.4. FV grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grup içi standardizasyonun gösterimi (Yanyana olan jeller aynı örneğin teknik replikalarıdır)



B.G



E.U



B.K

Şekil 4.5. Protrombin grubu iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grup içi standardizasyonun gösterimi (Yanyana olan jeller aynı örneğin teknik replikalarıdır)

4.3.1.2. Farklı genotipte gruplar arası genel protein profilinin değerlendirilmesi

İki farklı genotip için iki boyutlu jel elektroforezi protein profillerinin PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad) ile karşılaştırmalı analizleri yapıldığında gruplar arası yapılan değerlendirmeler sonucu tespit edilmiş olan proteinler çizelge 4.3’de görünmektedir.

Çizelge 4.3. PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları

Grup	Toplam spot sayısı	Master Jele göre eşleşmeler			
		Eşleşen spot sayısı	Eşleşmeyen spot sayısı	Eşleşme %	
Kontrol	1 (Master)	216	216	0	100
	1 (tekrar)	196	168	28	85
	2	223	144	79	64
	2 (tekrar)	224	139	85	62
	3	229	187	42	81
	3 (tekrar)	252	191	61	75
FV	1	246	179	67	72
	1 (tekrar)	246	187	59	76
	2	252	189	63	75
	2 (tekrar)	253	181	72	71
	3	244	175	69	71
	3 (tekrar)	252	173	79	68
Protrombin	1	225	147	78	65
	1 (tekrar)	213	153	50	71
	2	242	176	66	72
	2 (tekrar)	275	200	75	72
	3	217	168	49	77
	3 (tekrar)	227	173	54	76

PDQuest jel kalitatif analiz sonuçları incelendiğinde, gruplar arası belirgin bir fark görülmemektedir (Çizelge4.3). Kontrol grubu jellerinin eşleşme oranı % 77.8, FV grubunun %72.17, Protrombin grubunun ise %72.17 olduğu görülmüştür (her gruptaki 6 jelin eşleşme oranlarının ortalaması). Kontrol grubunda master jelin kendi kendine eşleşme oranını göz ardı edersek, gruplar hemen hemen aynı eşleşmeye sahiptirler ve bu anlamda aralarında büyük bir fark yoktur.

4.3.1.3. Farklı genotipte gruplar arası abundant proteinlerin değerlendirilmesi

Jellerin farklı koşullarda yürümesinden, kaymalardan ve bireysel farklılıklardan dolayı PDQuest programının otomatik eşleşme yaptığı spotlar üzerinde anlamlı bir fark bulunmadığından sadece abundant protein spotları üzerinde manuel eşleşme ile değerlendirme yapılmıştır. 20 abundant proteinin (Çizelge 4.4) ifade farklılıkları spot numaralarına göre (SSP) ele alınmıştır.

Çizelge 4.4. 20 abundant protein

20 abundant protein	
Albumin	Apolipoprotein A1
IgGs	Apolipoprotein A2
Transferrin	Apolipoprotein B
Fibrinogen	Acid-1-Glycoprotein
IgAs	Ceruloplasmin
α -2-Antitrypsin	Complement C4
IgMs	Complement C1q
α -1-Antitrypsin	IgDs
Complement C3	Prealbumin
Haptoglobulin	Plasminogen

PDQuest programı jel görüntüsü alındıktan sonra ve yapılan normalizasyon sonrası aynı MA/pI noktasındaki proteinlere aynı spot SSP (Sample Spot Protein) numarasını verilmiştir. SSP numaralarını içeren histogram grafikleri Şekil 4.7' de gösterilmiştir.

Yapılan ANOVA analizi sonucunda anlamlı farklılık gösteren 8 abundant protein spotu bulunmuştur. Karşılaştırmalı analizlere bakıldığında kontrol ve protrombin grubu arasında 6, kontrol ve Fv grubu arasında 1 ve protrombin ile Fv grubu arasında 1 protein spotunda anlamlı farklılık tespit edilmiştir. (Bunlardan 3 spotta kontrol grubunda grup içi bireysel farklılık da tespit edildiğinden farklı olarak değerlendirilmemiştir). Farklılık gösteren

spotların SSP numaraları, adları, farklılık durumları ve P değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Spotların kantitatif değerlerine göre SPSS 9.0 programi ile istatistik analizi (p < 0.05 olarak anlamlı farklılık gösterenler koyu olarak belirtilmiştir)

Spot numarası	Protein adı	Gruplar arası farklılık	P değeri	Uygulanan analiz testi	Analiz sonucu	Ortalama kantitatif değer
1305	Haptoglobin ağır	Kontrol& Protrombin	0.019	Tukey	Bireyler arası farklılık var	-
1710	komplement	Protrombin& FV	0.033	Tukey	Anlamlı	1.35 kat (protrom)
2707	Protrombin	Yok	-	-	Homojen değil	
2708	α -1-b Glikoprotein	Yok	-	-	Homojen değil	
6606	Serotrtransferin	Yok	-	-	Homojen değil	
7608	komplement c3	Yok	-	-	Homojen değil	
7609	komplement c3	Kontrol& Protrombin	0.016	Tukey	anlamlı	1.86 kat (kon)
7407	Fibrinojen beta chain	Kontrol& Protrombin	0.003	Tukey	anlamlı	1.09 kat (kon)
6406	Fibrinojen beta chain	Yok	-	-	Homojen değil	
6407	Fibrinojen beta chain	Yok	-	-	Homojen değil	
2410	α -1 antitripsin	Yok	-	-	Homojen değil	
2411	α -1 antitripsin	Yok	-	-	Homojen değil	
1508	α -1 antitripsin	Yok	-	-	Homojen değil	
3407	Fibrinojen gama chain	Yok	-	-	Homojen değil	
4306	Fibrinojen gama chain	Yok	-	-	Homojen değil	
3007	Apolipoprotein A	Yok	-	-	Homojen değil	
7110	Komplement c4	Yok	-	-	Homojen değil	
4010	Haptoglobin hafif	Kontrol& Protrombin	0.013	Tukey	anlamlı	2.29 kat (pro)
5009	Haptoglobin hafif	Yok	-	-	Homojen değil	
3009	Haptoglobin hafif	Kontrol& Protrombin	0.003	Tamhane	anlamlı	5.08 kat (pro)
2307	Haptoglobin ağır	Protrombin & FV	0.002	Tukey	Bireyler arası farklılık var	-

Çizelge 4.5. (devam)

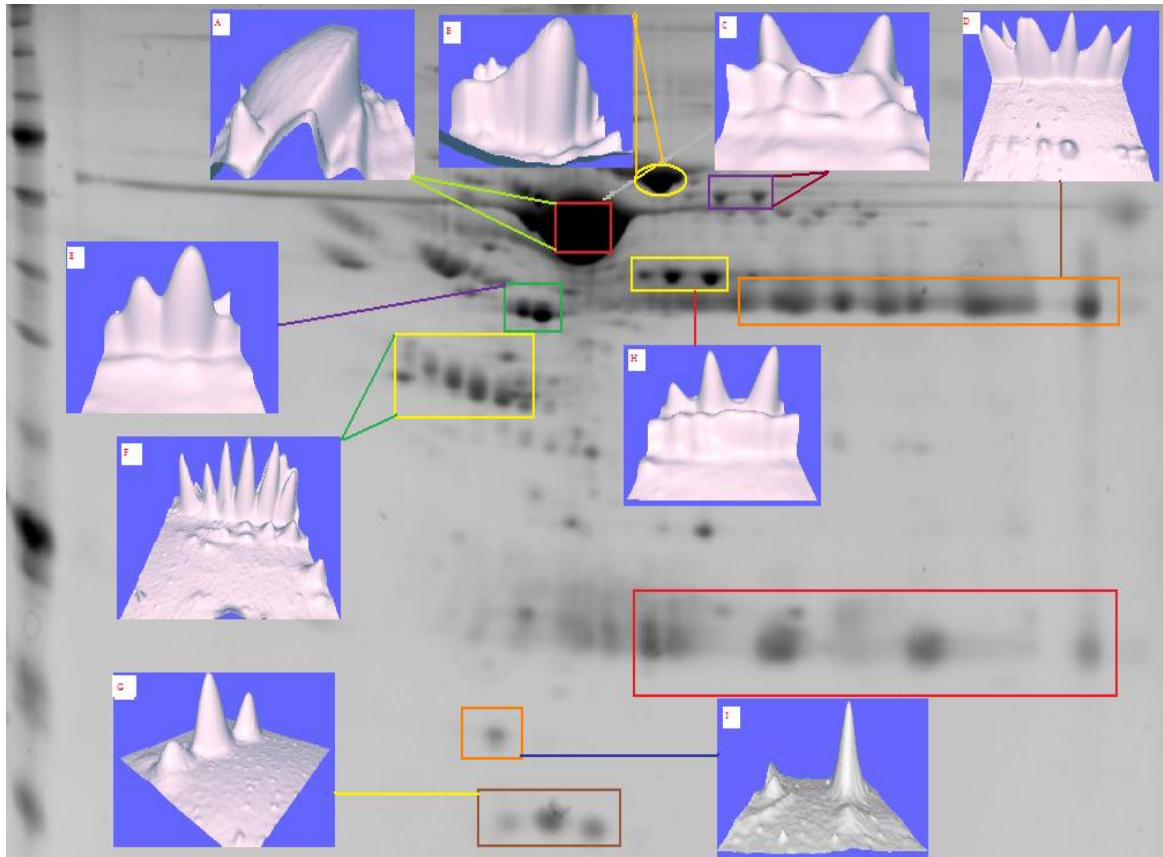
Spot numarası	Protein adı	Gruplar arası farklılık	P değeri	Uygulanan analiz testi		
2308	Haptoglobin ağır	Yok	-	-	Homojen değil	
2309	Haptoglobin ağır	Yok	-	-	Homojen değil	
3309	Haptoglobin ağır	Yok	-	-	Homojen değil	
3311	Haptoglobin ağır	Yok	-	-	Homojen değil	
8405	İmmünoglobulin ağır zincir	Kontrol& Protrombin	0.001	Tukey	anlamlı	1.13 kat (pro)
		Kontrol& FV	0.012	Tukey		1.46 kat (FV)
8408	İmmünoglobulin ağır zincir	Yok	-	-	Homojen değil	
7006	İmmünoglobulin hafif zincir	Yok	-	-	Homojen değil	
8008	İmmünoglobulin hafif zincir	Yok	-	-	Homojen değil	
3010	prealbümin	Yok	-	-	Homojen değil	

Kontrol (mutasyon taşımayan) gurubu içinde ağır Haptoglobin'e ait 1305 ve 2307 spot izoformları, grup içi test sonucunda homojen olmadıkları için analiz dışı edilmiştir.

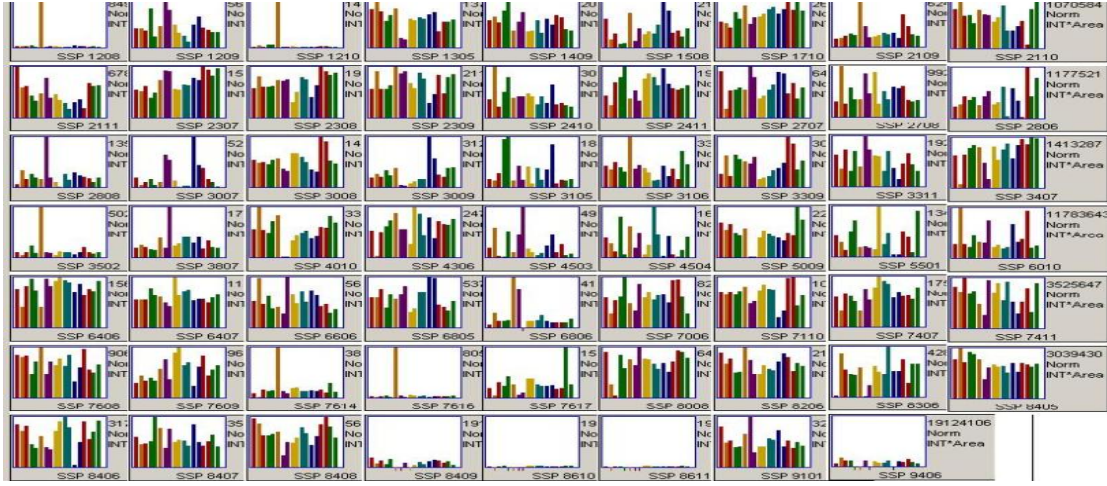
1305 spotuna ait komplement protein ifade farklılığı protrombin ve FV arasında, 7609 spotuna ait komplement C3 protein ifade farklılığı kontrol ve protrombin grubu arasında, 7407 spotuna ait Fibrinojen beta protein ifade farklılığı kontrol-protrombin grubu arasında, 4010 ve 3009 spotlarına ait Haptoglobin protein ifade farklılığı kontrol ve protrombin grubu arasında ve 8405 spotuna ait ağır IgG protein ifade farklılığı ise kontrol & protrombin ve kontrol & FV gruplarında görülmektedir.

Protein profilleri üç boyutlu olarak incelendiğinde abundant proteinlerin ifade farklılıkları daha net görülmektedir. Gruplar arası yapılan değerlendirmeler sonucu FV mutant ve Protrombin mutant grupta protein profili incelendiğinde abundant proteinlerin ifadesinin

kontrol grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir. Her iki mutant grupta Fibrinojen beta ifadesinde azalma ve Haptogloblin ifadesinde artış görülmektedir. Prealbumin ifadesinde Protrombin mutasyonu taşıyan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark görülmemekle beraber FV proteini ifadesinde azalma görülmektedir. Albumin ifadesinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. IgG ağır zincirinin bazı izoformlarında artış görülmektedir. Kontrol, FV ve protrombin gruplarının abundant proteinlerinin üç boyutlu görüntüleri şekil 4.6 da ayrıntılı olarak verilmiştir.



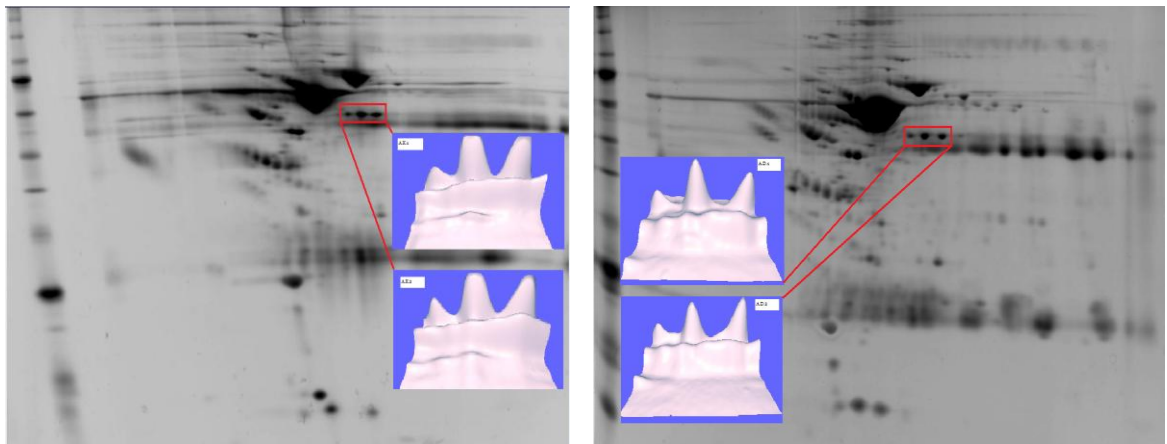
Şekil 4.6. kontrol grubu 2D jel elektroforezi protein profilinde protein spotlarının 3D gösterimi: (A)Albumin (B)Transferin (C) Complement C (D) IgG ağır (E) Fibrinojen gama (F) Haptogloblin ağır (J) Haptogloblin hafif (H) Fibrinojen beta (I)Apolipoprotein



Şekil 4.7. Kontrol, FV ve protrombin grupları arasında ifadesi artan protein spotlarının SSP numaraları ile birlikte histogram grafikleri (Grafığe göre ilk 3 sütun tekrarlı olarak FV , 2'inci 3 sütun tekralı olarak kontrol ve 3'üncü 3 sütun tekrarlı olarak protrombin grubu temsil etmektedir)

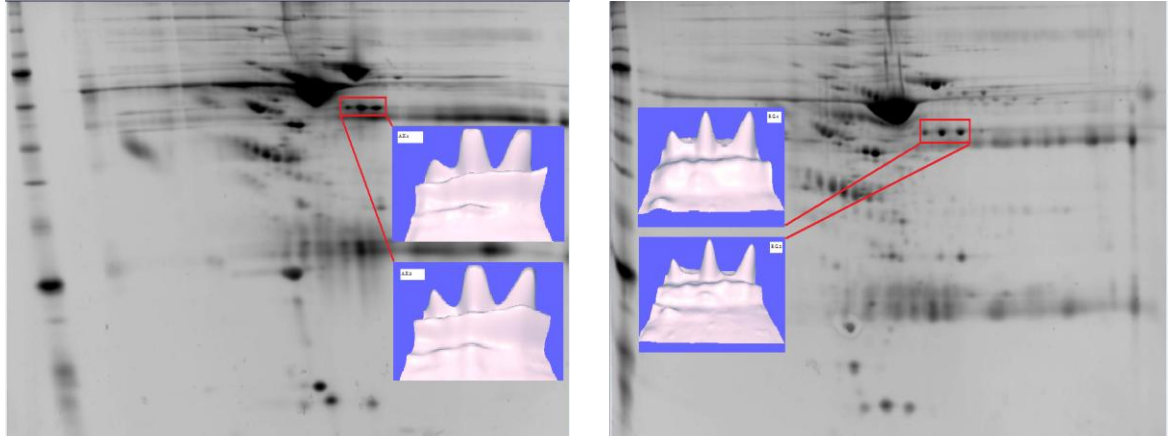
Gruplar arasında yapılan manüel eşleştirme sonucunda Fibrinojen beta ve Haptoglobin dışındaki protein spotlarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu iki proteinin gruplar arasındaki ifade farklılığı bütün protein izoformlarında görülmektedir. İlgili proteinlerin 2D jel elektroforezi protein profilleri üç boyutlu olarak aşağıda değerlendirilmiştir:

Fibrinojen beta (Kontrol ve FV)



Şekil 4.8. Fibrinojen beta'nın sol tarafta kontrol grubu için (k.s) ve sağ tarafta FV grubu için (a.d) ikili tekrarları ile 3 boyutlu olarak ifadelerinin gösterimi.

Fibrinojen beta (Kontrol ve protrombin)



Şekil 4.9. Fibrinojen beta'nın sol tarafta kontrol grubu için (k.s) ve sağ tarafta Protrombin grubu için (b.g) ikili tekrarları ile 3 boyutlu olarak ifadelerinin gösterimi.

Şekil 4.8 ve 4.9'da görüldüğü gibi fibrinojen beta proteininin her üç izoformunun ifadesi Protrombin ve Faktör V gruplarında, kontrol grubuna göre azalmıştır (PDQuest programı, kantitatif analiz).

Gruplar arasındaki Fibrinojen beta spot ekspresyonunun 3 boyutlu görüntüsü 3 örnek tekrarları ile beraber aşağıda görünmektedir:

Kontrol



FV

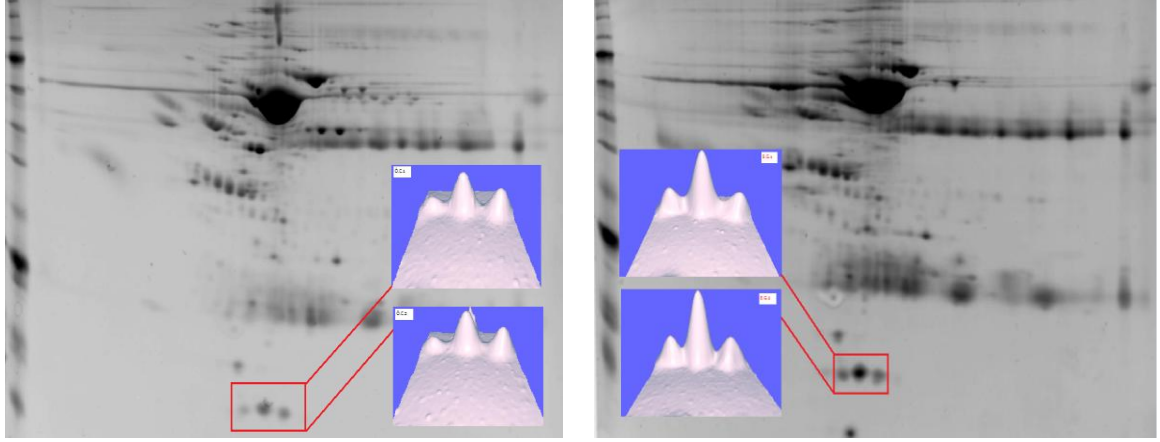


Protrombin



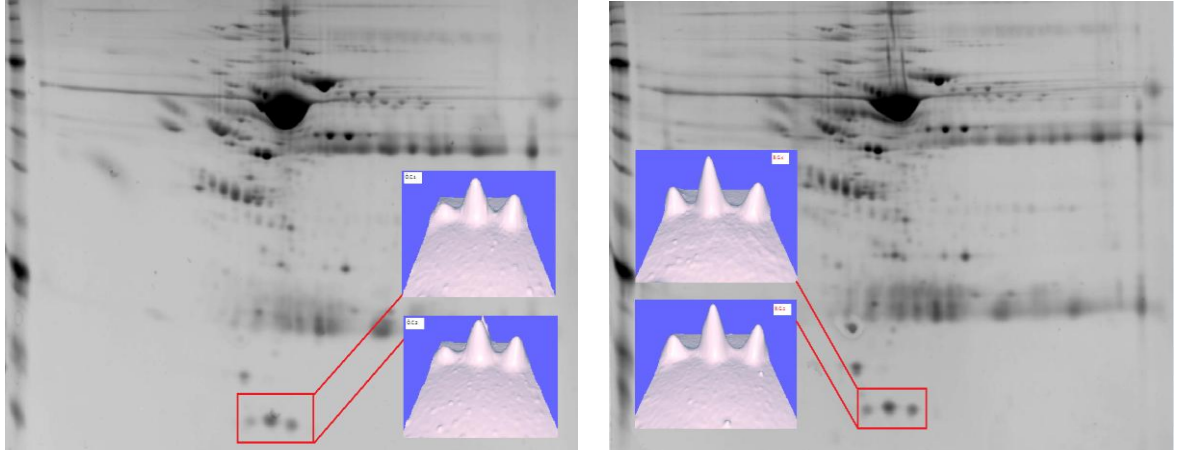
Şekil 4.10. 3 grup arasında Fibrinojen beta ifade farklılıklarının 2Djel elektroforezi protein profilinde 3D gösterimi.

Haptoglobolin (Kontrol ve FV)



Şekil 4.11. Haptoglobolin'nın sol tarafta kontrol grubu için (ö.c.1,2) ve sağ tarafta FV grubu için (e.g.1,2) ikili tekrarları ile 3 boyutlu olarak ifadelerinin gösterimi.

Haptoglobolin (Kontrol ve protrombin)

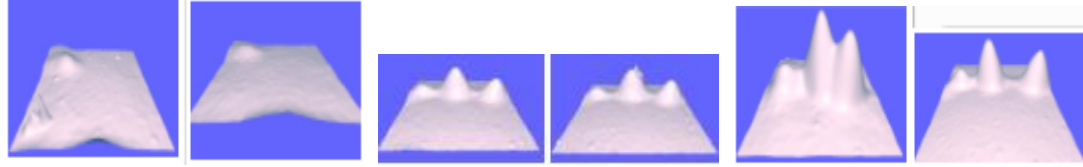


Şekil 4.12. Haptoglobolin'nın sol tarafta kontrol grubu için (ö.c.1,2) ve sağ tarafta protrombin grubu için (e.g.1,2) ikili tekrarları ile 3 boyutlu olarak ifadelerinin gösterimi.

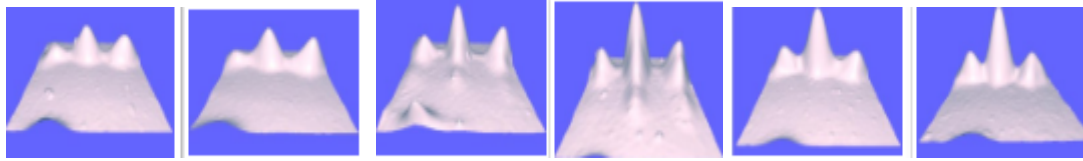
Şekil 4.11 ve 4.12'de görüldüğü gibi haptoglobolin proteininin ifadesi Protrombin ve Faktör V gruplarında, kontrol grubuna göre artmıştır (PDQuest programı, kantitatif analiz).

Gruplar arasındaki haptoglobin spot ekspresyonunun 3 boyutlu görüntüsü 3 örnek tekrarları ile beraber aşağıda görünmektedir:

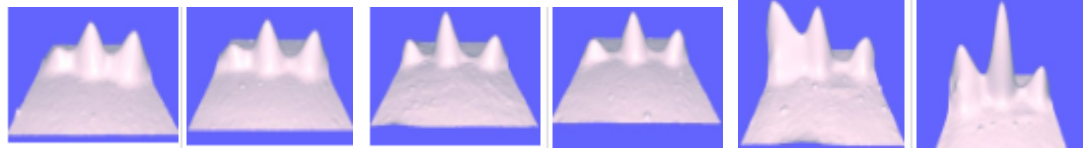
Kontrol



FV



Protrombin



Şekil 4.13. 3 grup arasında Hafif haptoglobin zincirinin ifade farklılıklarının 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D gösterimi

Tüm 2D jel elektroforezi protein profilleri; Albumin, Transferin, Kompleman c3, İmmüoglobulin ağır zincir, c4 kompleman, İmmüoglobulin hafif zincir, Haptoglobin, Prealbumin, apolipoprotein A, fibrinojen, α -1 antitripsin, α -1 antikimotripsin ve bunlara ek olarak FV ve Protrombin izoformları için kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

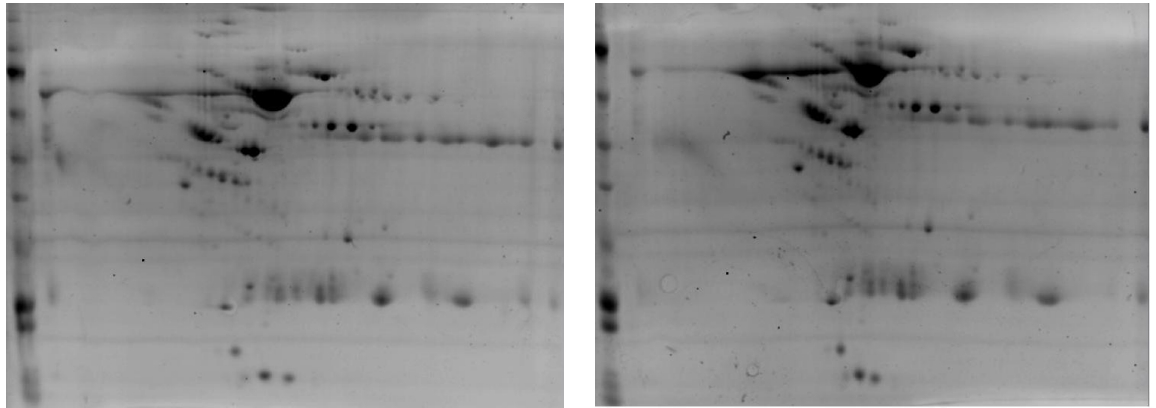
4.3.2. Hasta set grup değerlendirmeleri

4. 3. 2. 1. Grup içi standardizasyonları

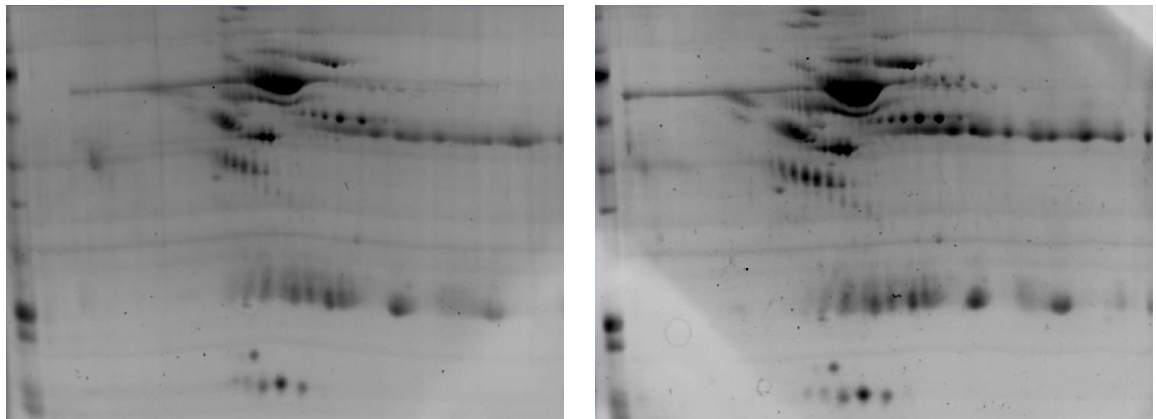
Protrombin G20210 ve MI geçiren hasta grup standardizasyonu:

Deney koşulları sabit tutularak, aynı işlemlere maruz bırakılan MI geçiren olgu örneklerinin tekrarlanabilirlikleri değerlendirilmiş ve kendi içlerinde standardizasyonları sağlanmıştır.

H.E



V.K

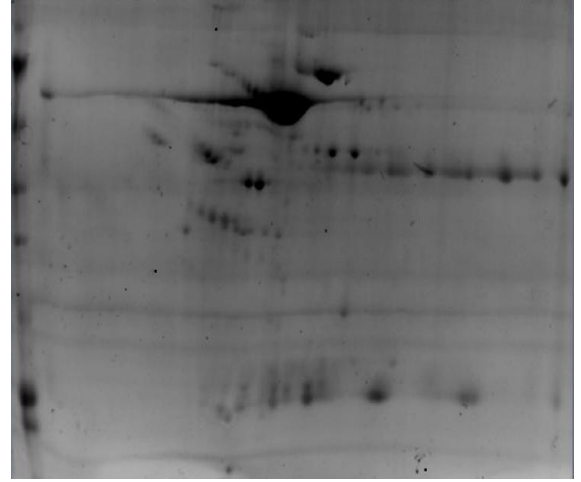
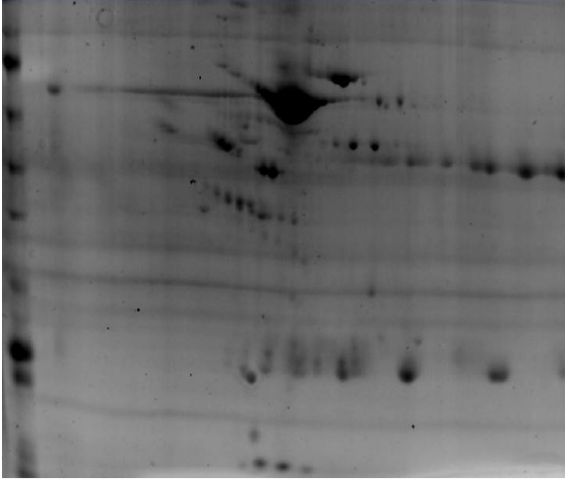


şekil 4.14. MI geçiren hasta grubu plazma örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi profillerinin grup içi standardizasyonun gösterimi (Yanyana olan jeller aynı örneğin teknik replikalarıdır)

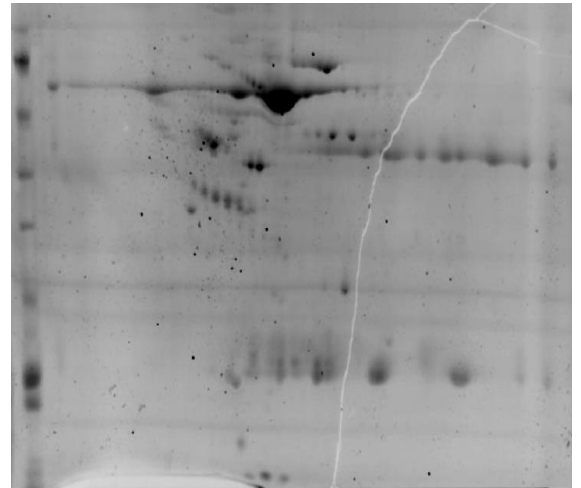
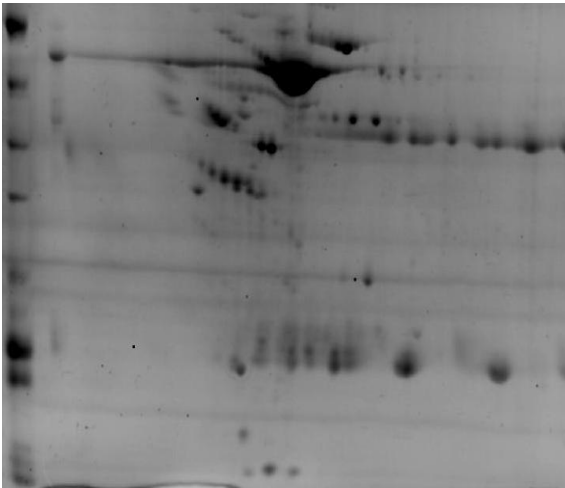
Protrombin G20210 ve MI geçirmeyen hasta grup standardizasyonu:

Deney koşulları sabit tutularak, aynı işlemlere maruz bırakılan MI geçirmeyen olgu örneklerinin 2D jel elektroforezi ile protein profillenmesinin tekrarlanabilirlikleri değerlendirilmiş ve kendi içlerinde standardizasyonları sağlanmıştır.

B.K



S.K

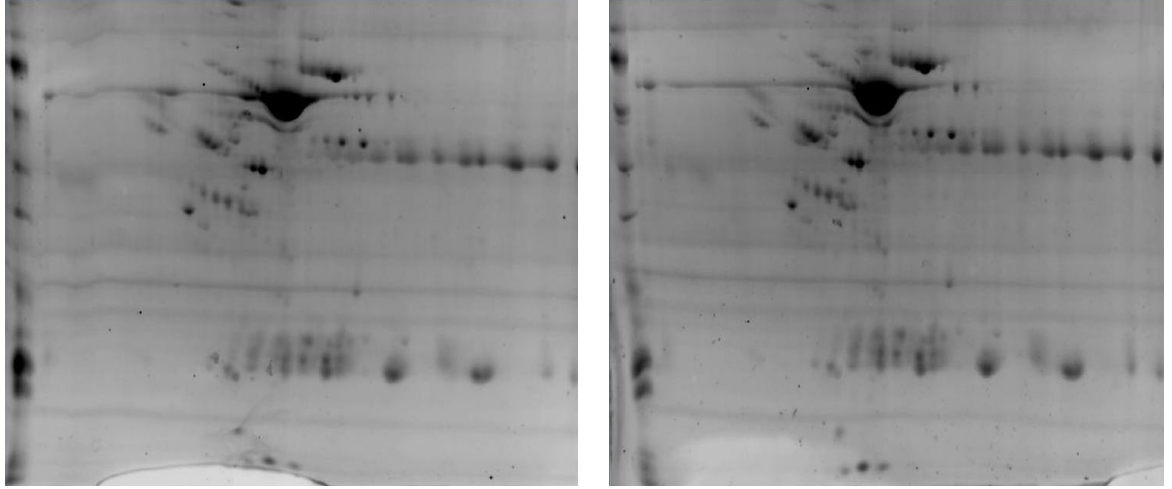


Şekil 4.15. MI geçirmeyen olgu grubunun iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grup içi standardizasyonun gösterimi (Yanyana olan jeller aynı örneğin teknik replikalarıdır)

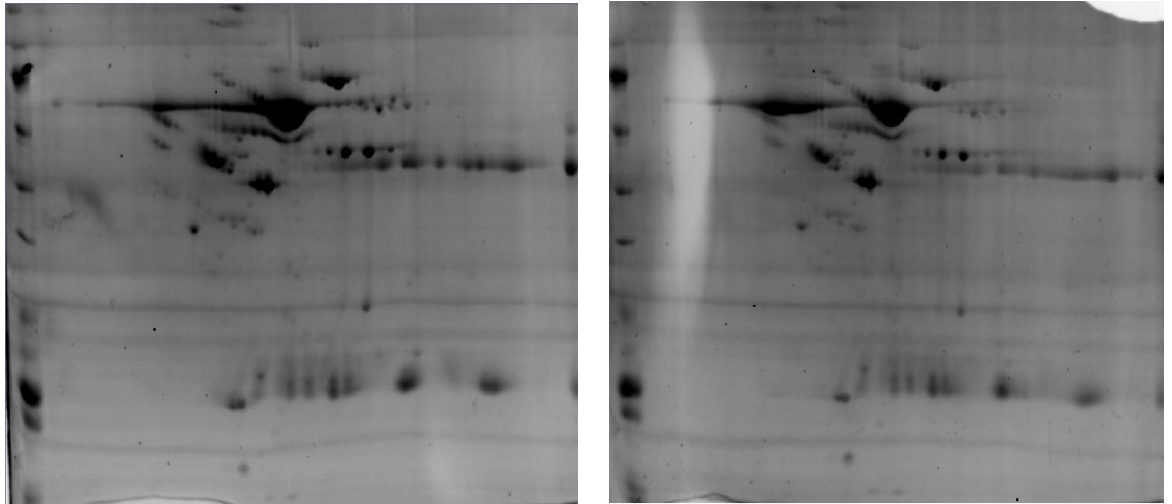
FV G1691A hasta grup standardizasyonu:

Deney koşulları sabit tutularak, aynı işlemlere maruz bırakılan MI öyküsü olmayan olgu plazma örneklerinin tekrarlanabilirlikleri değerlendirilmiş kendi içlerinde standardizasyonları sağlanmıştır.

D.A



İ.G



Şekil 4.16. FVLeiden taşıyan grubun iki boyutlu jel elektroforezi profillerinde grup içi standardizasyonun gösterimi (Yanyana olan jeller aynı örneğin teknik replikalarıdır)

4.3.2.2. Farklı genotipte gruplar arası abundant proteinlerin değerlendirilmesi

Yapılan ANOVA analizi sonucunda farklı genotipteki hasta grupları arasında anlamlı farklılık gösteren 6 protein spotu bulunmuştur. Karşılaştırmalı analizlere bakıldığında MI geçiren protrombin G20210A taşıyıcı grup ile MI geçirmeyen protrombin G20210A taşıyıcı grup arasında 6 ve MI geçiren protrombin G20210A taşıyıcı grup ile FV Leiden taşıyan grup arasında da 6 protein spotunda anlamlı ifade farklılığı tespit edilmiştir. Farklılık gösteren spotların SSP numaraları, adları, farklılık durumları ve p değerleri çizelge 4.6'da verilmiştir.

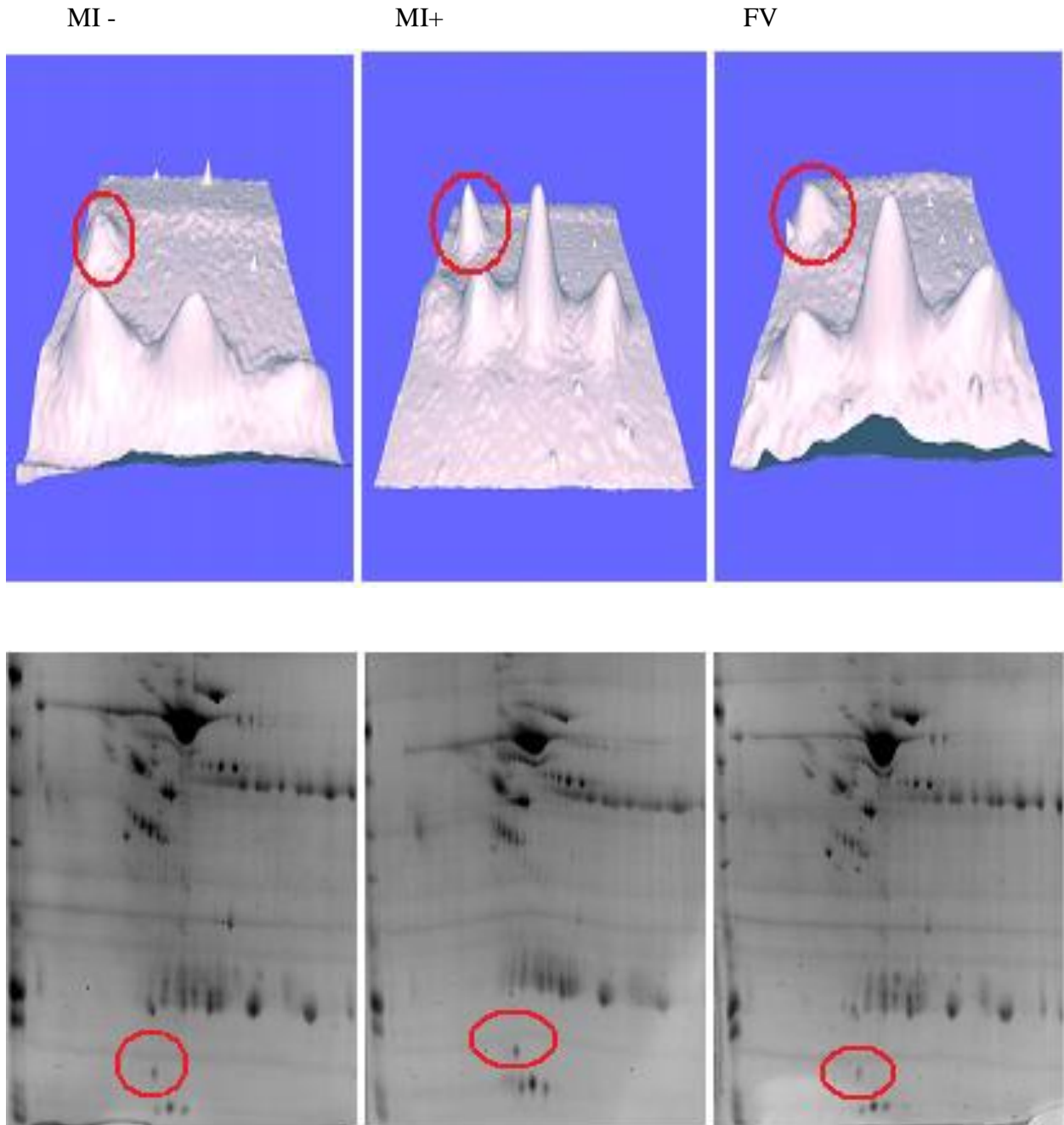
Çizelge 4.6. Spotların kantitatif değerlerine göre SPSS 9.0 programi ile istatistik analizi

Spot numarası	Protein adı	Gruplar arası farklılık	P değeri	Uygulanan analiz testi	Analiz sonucu	Ortalama kantitatif değer
4003	Retinol binding protein 4	MI+ ile MI- MI+ ile FV	0.001 0.001	Tukey	MI+ artmış MI+ artmış	1.684 kat 1.694 kat
4404	Alpha-1-antitrypsin	MI+ ile MI- MI+ ile FV	0.00 0.00	Tukey	MI+ artmış MI+ artmış	3.494 kat 2.364 kat
6805	Complement factor B	MI- ile FV	0.027	Tukey	FV artmış	2.043 kat
7805	Serotransferrin (Transferrin)	MI+ ile FV	0.037	Tukey	FV artmış	1.692>MI+ 1.2> MI-
7503	Fibrinogen beta chain	MI+ ile MI- MI+ ile FV	0.00 0.00	Tukey	MI+ artmış MI+ artmış	2.222 kat 2.312 kat
8406	Fibrinogen beta chain	MI+ ile MI- MI+ ile FV	0.002 0.018	Tukey	MI+ artmış MI+ artmış	2.57 kat 1.763 kat

4003 spotuna ait Retinol binding protein 4 protein ifade farklılığı MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile FV gen değişimi olan hasta grubu arasında ve MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile MI geçirmeyen protrombin gen değişimi olan hasta grubu arasında, 4404 spotuna ait Alpha-1-antitrypsin protein ifade farklılığı MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile FV gen değişimi olan hasta grubu arasında ve MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile MI geçirmeyen protrombin gen değişimi olan hasta grubu arasında, 6805 spotuna ait Complement factor B protein ifade farklılığı FV gen değişimi olan hasta grubu ile MI geçirmeyen protrombin gen değişimi olan hasta grubu arasında, 7805 spotuna ait Serotransferrin (Transferrin) protein ifade farklılığı MI geçiren ve protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile FV gen değişimi olan hasta grubu arasında, 7503 ve 8406 spotuna ait Fibrinogen beta chain protein ifade farklılığı MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile FV gen değişimi olan hasta grubu arasında ve MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile MI geçirmeyen protrombin gen değişimi olan hasta grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

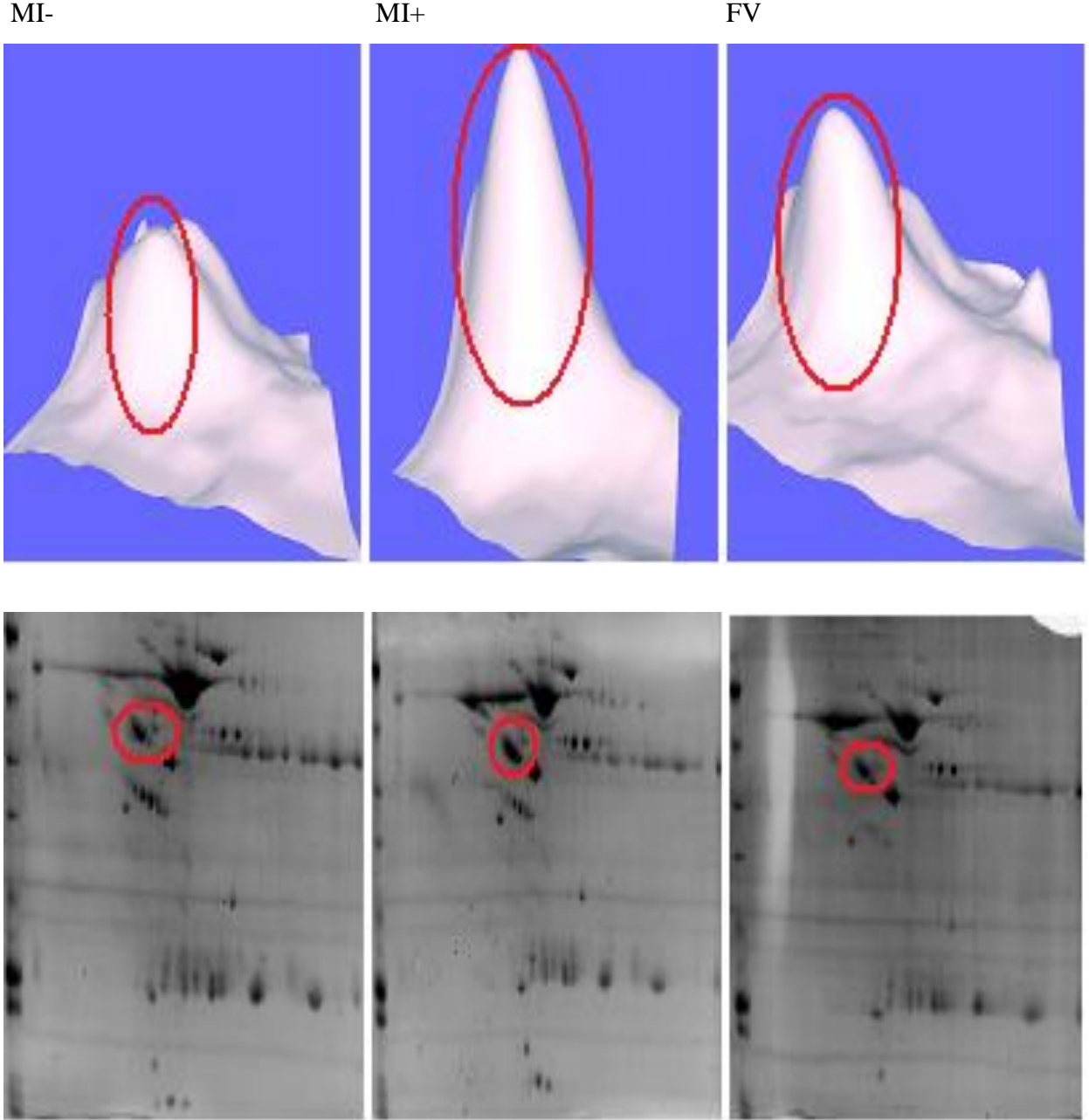
Gruplar arasında anlamlı farklılık gösteren ve farklılık göstermeyen (standardizasyonu göstermek için) bazı proteinlerin jeller üzerindeki konumları ve 3 boyutlu gösterimleri aşağıda verilmiştir:

Retinol binding protein 4



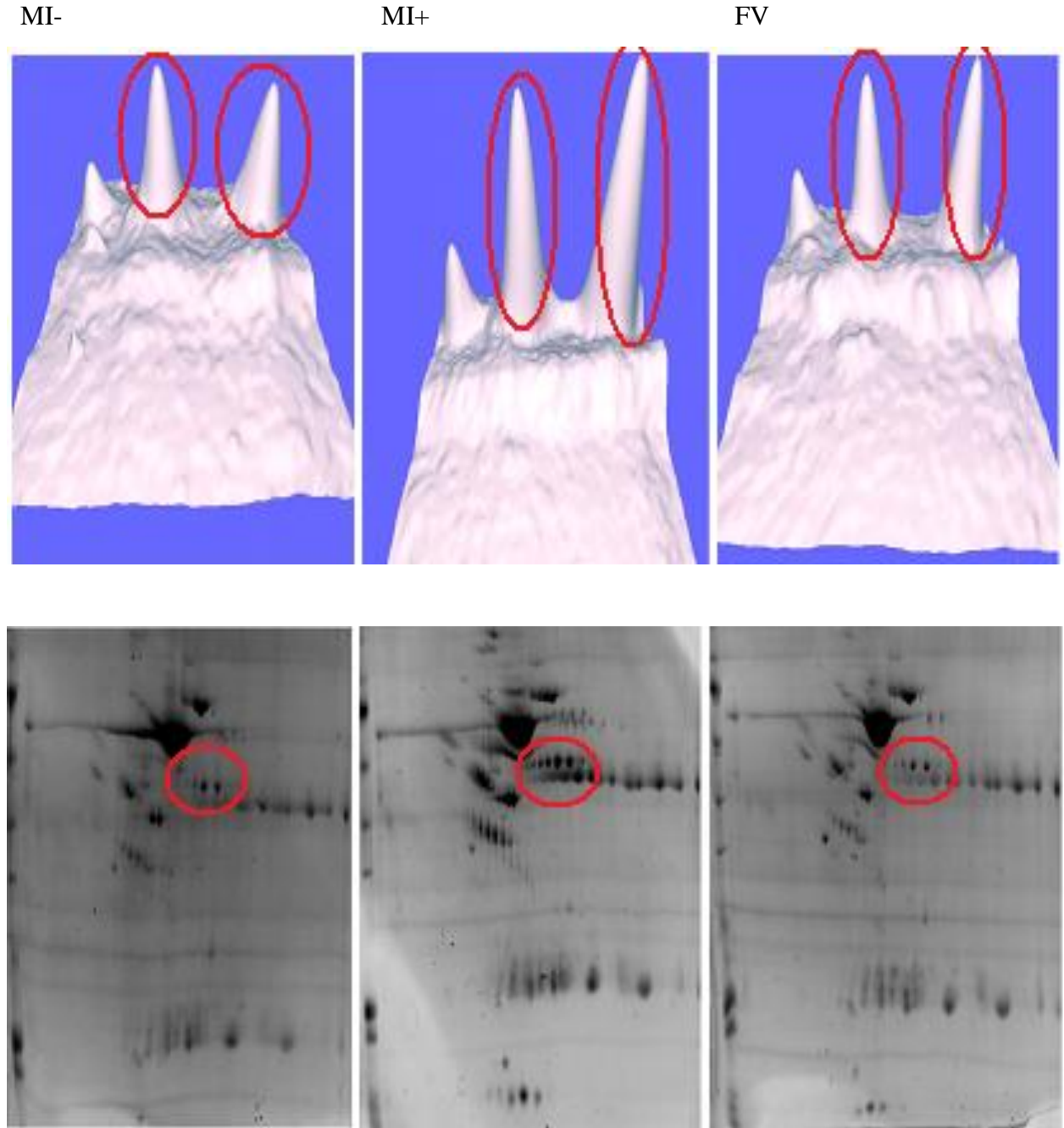
Şekil 4.17. Retinol binding protein 4 protein spotunun 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D protein ifade gösterimi

Alpha-1-antitrypsin



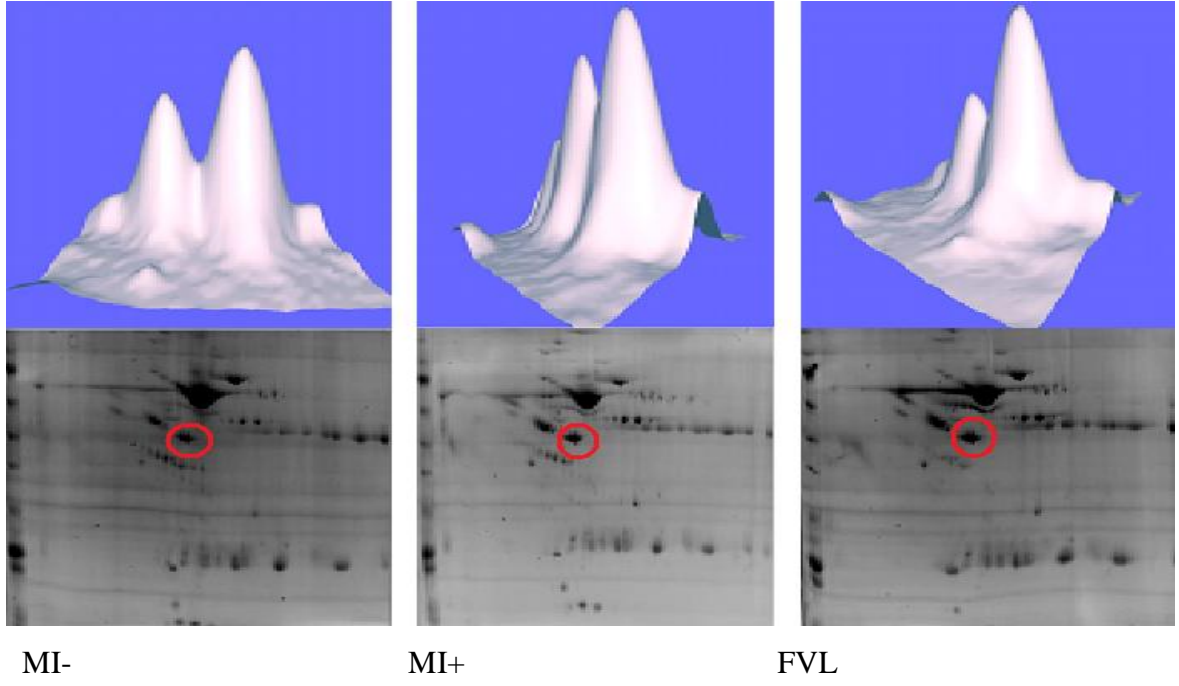
Şekil 4.18. Alpha-1-antitrypsin protein spotunun 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D protein ifade gösterimi

Fibrinogen beta chain

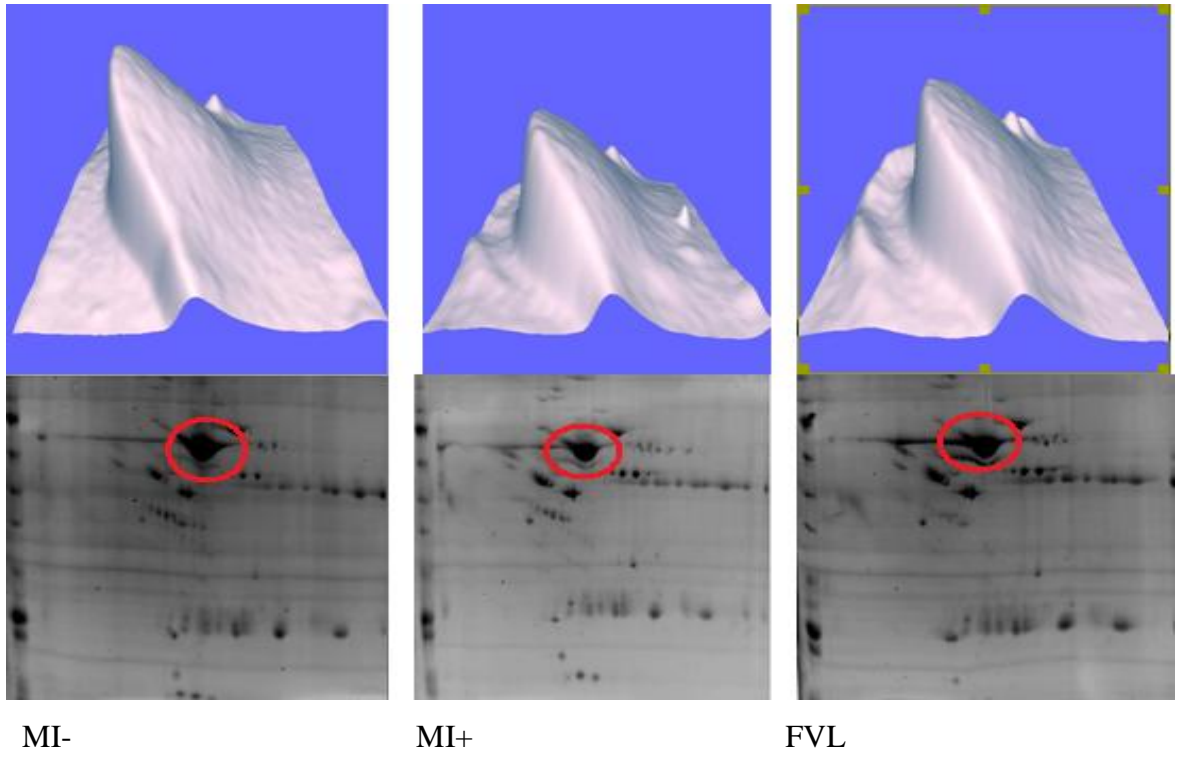


Şekil 4.19. Fibrinogen beta chain spotunun 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D protein ifade gösterimi

Fibrijojen gama



Albumin



Şekil 4.20. Fibrinojen gama ve Albumin spotlarının 2D jel elektroforezi protein profilinde 3D protein ifade gösterimi

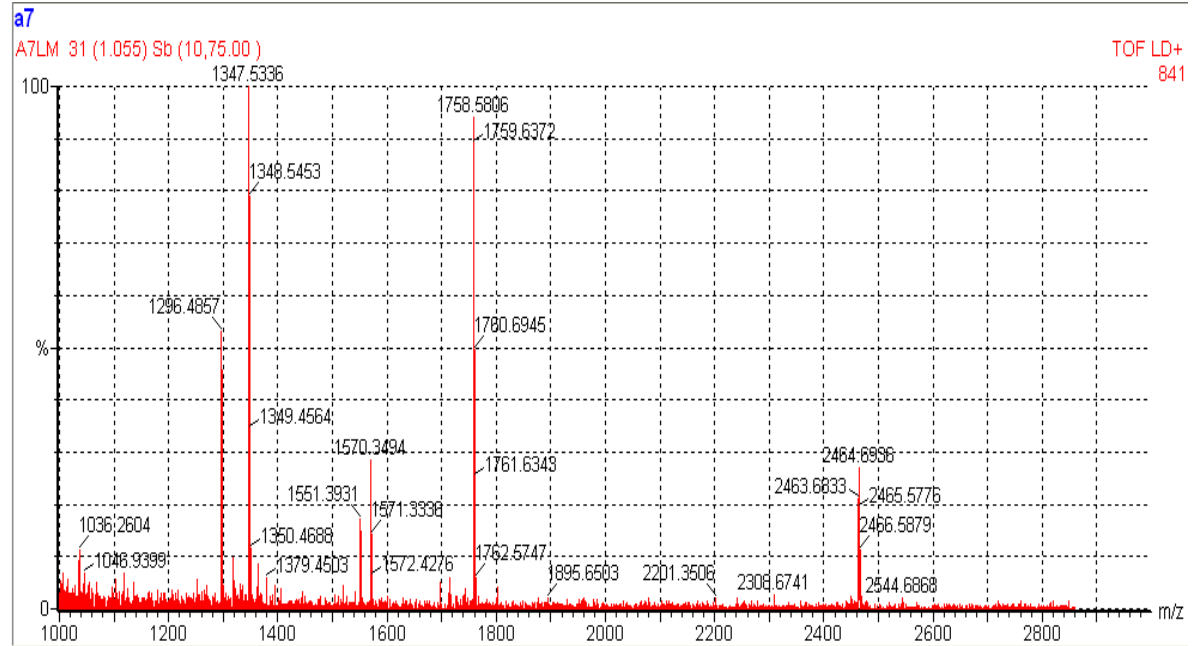
4.4. Protein Tanımlanması

4.4.1. MALDI-TOF kütle spektrometresinin m/z kalibrasyonun yapılması

MALDI plakalarının Lock Mass kuyucuklarına spotlanan ve cihazın kütle kalibrasyonun yapılmasında, peptid tanımlanması ile protein kimliklendirmesi (peptide mass finger printing, PMF) için doğrulamada kullanılan, kütleleri bilinen 5 adet peptit karışımı ile elde edilmiş olan spektra Şekil 4.21’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.7. 5 peptid karışımı ile elde edilmiş spektra

5 PEPTİT KARIŞIMI	KÜTLE-Da
ANGİOTENSİN	1296,6853
SUBSTANCEP	1347,7360
Glu Fib	1570,6774
Renin-14	1758,9326
ACTH-18,39	2465,1989

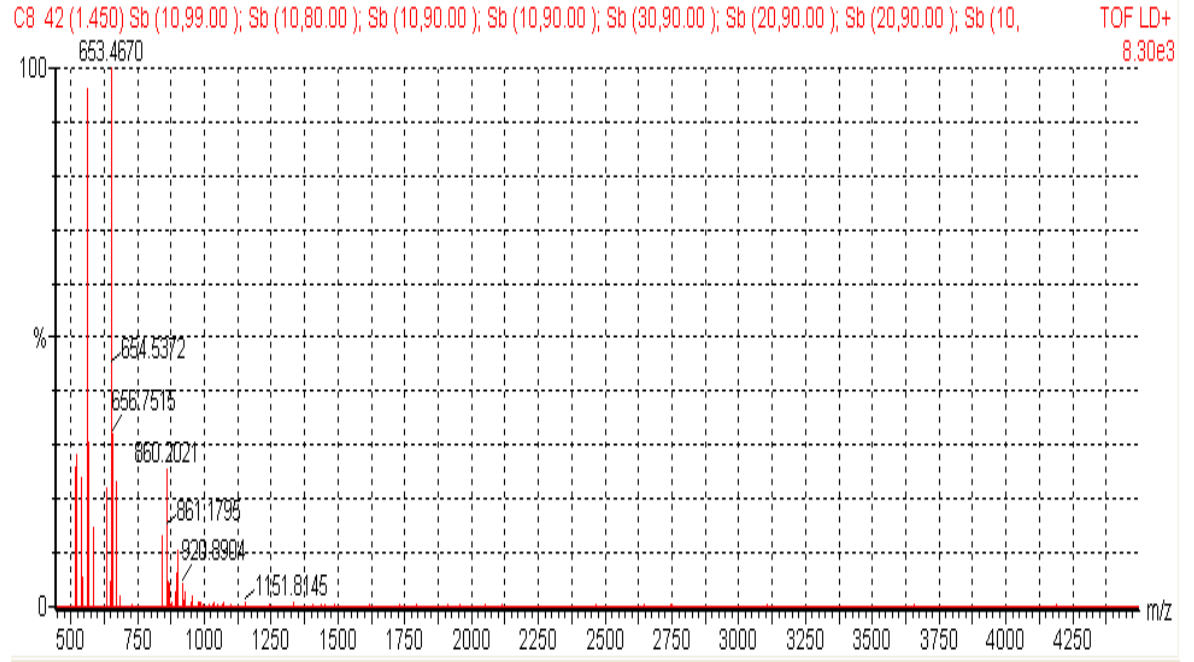


Şekil 4.21. Maldi –TOF kütle spektrometresinde kullanılan kalibrasyon peptidlerine ait spektrum

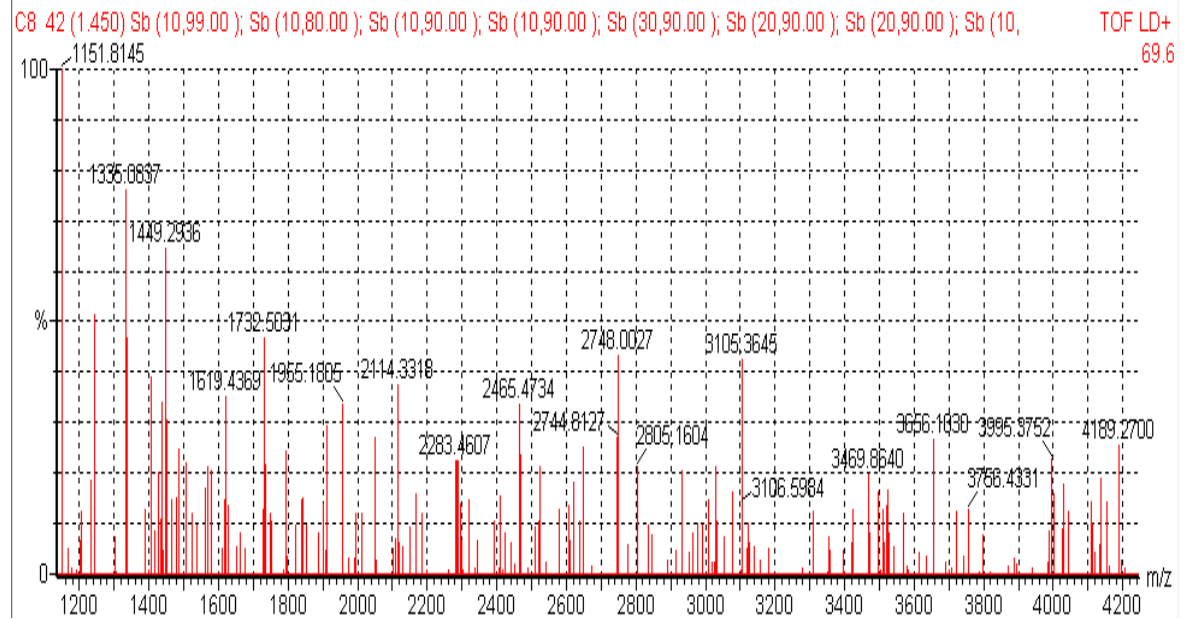
4.4.2. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin spektrumları ve veri tabanından alınmış peptit kütleleri

Fibrinojen beta

A5



A5



Şekil 4.22. Fibrinojen beta peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Çizelge 4.8. Fibrinojen beta için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

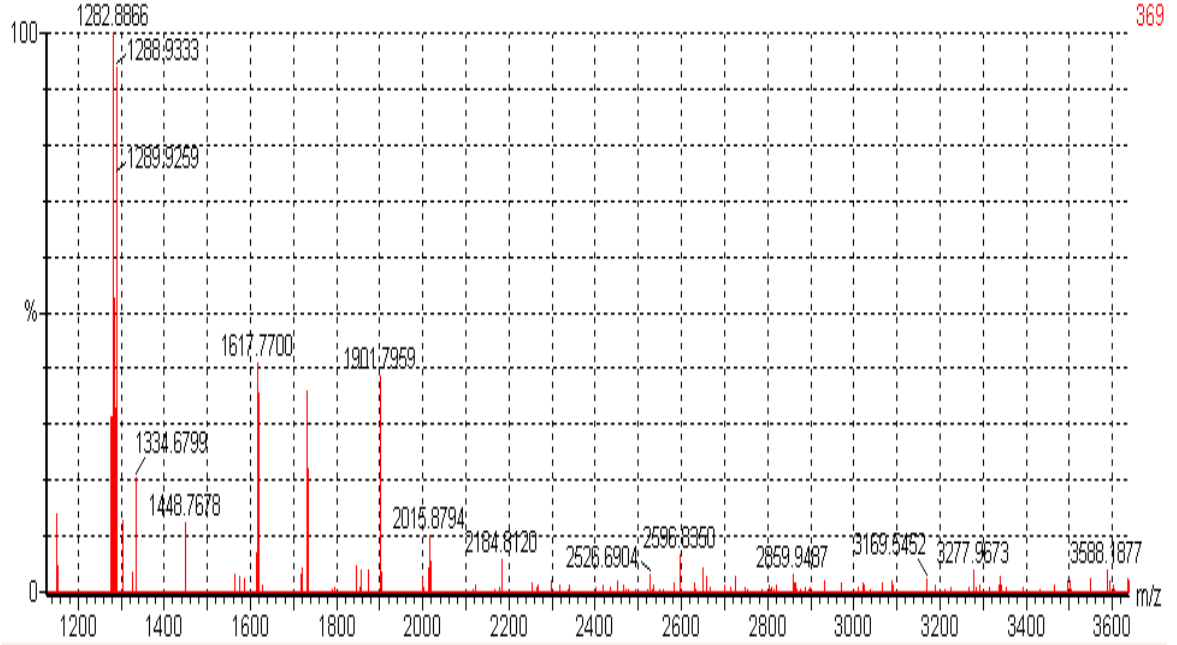
mass	position	#MC	antif-modification(s)	modification(s)	peptide sequence
3784.8567	89-124	0	Cys_CAM: 95, 106, 110	3955.9211	APDAGGCLHADPDLGVLCPT GCQLQEALLQQRPIR
3167.4837	125-152	0			NSVDELNNNEAVSQTSSSS FQYMYLLK
2257.0805	248-267	0			GGETSEMYLIQPDSSVKPYR
2127.0829	179-196	0			HQLYIDETVNSNIPTNLR
2099.9273	268-285	0	Cys_CAM: 270	2156.9488	VYCDMNTENGGWTVIQNR
1951.0031	54-72	0			EEAPSLRPAPPPISGGGYR
1892.8589	377-395	0			GTAGNALMDGASQLMGENR
1820.8094	396-410	0			TMTIHNGMFFSTYDR
1768.7871	164-178	0			DNENVVNEYSSELEK
1728.7686	314-328	0	Cys_CAM: 316	1785.7901	NYCGLPGEYWLGNDK
1691.8019	335-348	0			MGPTELLIEMEDWK
1668.7151	446-458	0			YYWGGQYTWDMAK
1544.6950	459-471	0			HGTDDGVVWMNWK
1535.7237	354-367	0			AHYGGFTVQNEANK
1530.6563	212-224	0	Cys_CAM: 223	1587.6777	LESDVSAQMEYCR
1504.7498	225-239	0	Cys_CAM: 227, 231	1618.7927	TPCTVSCNIPVVS GK
1308.6178	301-313	0			QGFNGVATNTDGK
1275.5600	411-421	0			DNDGWLTSDPR
1239.5177	427-436	0			EDGGGWYNR
1032.5625	484-491	0			IRPFFPQQ
980.4432	286-294	0			QDGSVDFGR
939.4213	437-445	0	Cys_CAM: 437	996.4428	CHAANPNGR
891.4240	240-246	0	Cys_CAM: 241	948.4455	ECEEIIR
886.3876	472-478	0			GSWYSMR
851.4621	368-374	0			YQISV NK
844.4887	200-206	0			SILENLR
822.4580	45-51	0			GHRPLDK
717.4253	329-334	0			ISQLTR
708.3351	296-300	0			WDPYK
689.3617	153-157	0			DLWQK
589.3304	78-83	0			AAATQK
542.3409	73-77	0			ARPAK
1569.6928	31-44	0			QGVNDNEEGFFSAR

Haptoglobin

A5

B9 87 (3.085) Sb (10,99.00); Sb (10,75.00); Cm ((5+8.9+25.26+37.44+65.66+85.87))

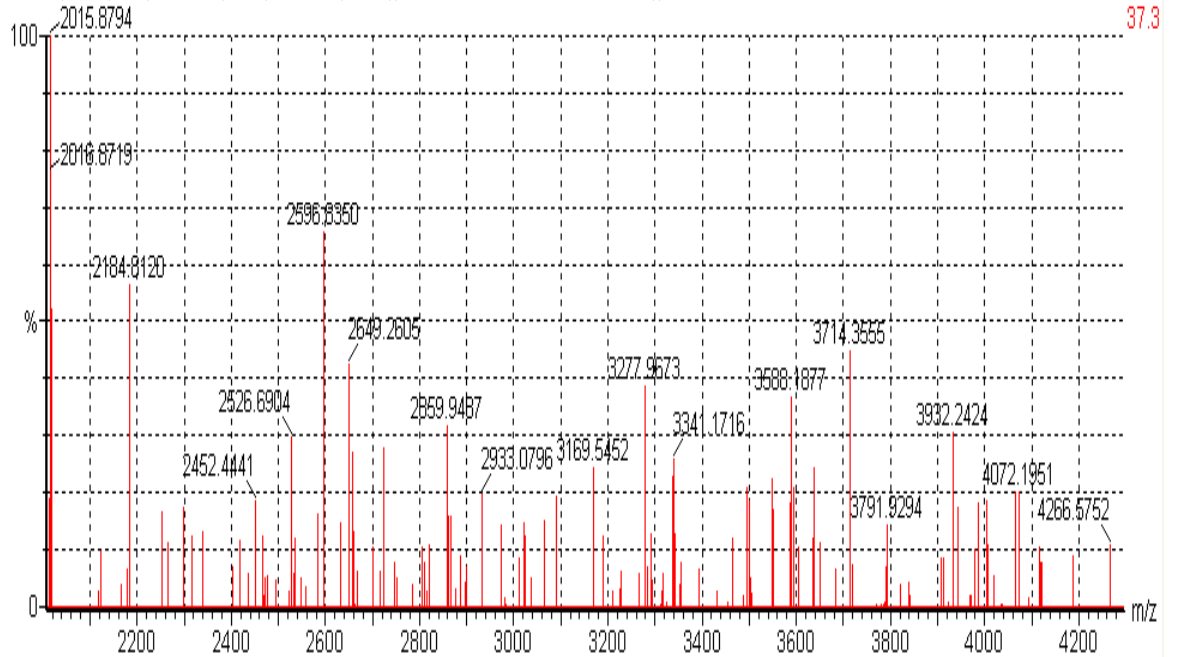
TOF LD+



A5

B9 87 (3.085) Sb (10,99.00); Sb (10,75.00); Cm ((5+8.9+25.26+37.44+65.66+85.87))

TOF LD+

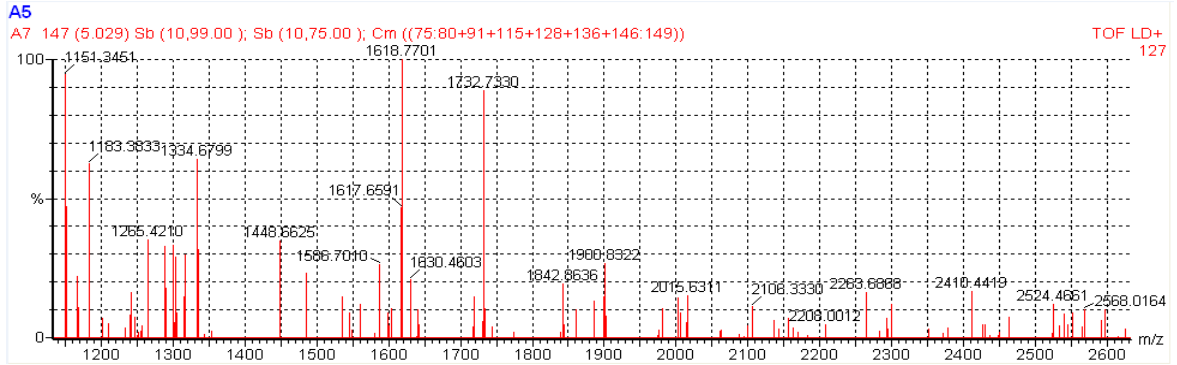


Şekil 4.23. Haptoglobin peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Çizelge 4.9. Haptoglobin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

mass	position	#MC	unif. modification(s)	mass	modifications	peptide sequence
3817.6486	346-379	0	Cys_CAM: 351	3874.6700		YQEDTCYGDAGSAFAVHDL E
3292.5174	19-49	0	Cys_CAM: 33	3349.5389		VDSGNDVTDIADDGCPKPE IA
2848.3028	83-108	0	Cys_CAM: 86, 92	2962.3457		LPECEADDGCPKPEIAHGY VE
2679.3923	179-202	0				MVSHHNLTTGATLINEQWLL TT
2115.0361	326-345	0	Cys_CAM: 340	2172.0576		SPVGVQPILNEHTFCAGMSK
1795.0112	236-251	0				VVLHPNYSQVDIGLIK
1650.7978	298-311	0	Cys_CAM: 309	1707.8193		YVMLPVAADQDQCIR
1458.7335	203-215	0				NLFLNHSENATAK
1439.6648	119-131	0				TEGDGVYTLNNEK
1311.6063	60-71	0				TEGDGVYTLNDK
1290.7303	216-227	0				DIAPTLTLYVGK
1288.6242	380-391	0	Cys_CAM: 381	1345.6456		SCAVAEYGVYVK
1273.6279	142-153	0	Cys_CAM: 145, 149	1387.6708		LPECEAVCGKPK
1203.6368	392-401	0				VTSIQDWVQK
1146.5425	312-321	0				HYEGSTVPEK
987.5365	262-270	0	Cys_CAM: 266	1044.5580		VMPICLPSK
980.4948	278-286	0				VGYVSGWGR
923.5308	162-170	0				ILGGHLDK
920.4624	171-178	0				GSFPWQAK
895.4744	154-161	0				NPANPVQR
858.4931	229-235	0				QLVEIEK
809.3788	271-277	0				DYAEVGR
760.3988	292-297	0				FTDHLK
703.3733	256-261	0				VSVNER
688.3777	73-77	0				QWINK
688.3777	132-136	0				QWINK
593.3042	287-291	0				NANFK
587.2824	54-57	0				NYYK
587.2824	113-116	0				NYYK
547.2722	402-406	0				TIAEN
541.2439	50-53	0	Cys_CAM: 52	598.2653		YQCK
541.2439	109-112	0	Cys_CAM: 111	598.2653		YQCK
3292.5174	19-49	0	Cys_CAM: 33	3349.5389		VDSGNDVTDIADDGCPKPE IA
2848.3028	83-108	0	Cys_CAM: 86, 92	2962.3457		LPECEADDGCPKPEIAHGY VE
1439.6648	119-131	0				TEGDGVYTLNNEK
1311.6063	60-71	0				TEGDGVYTLNDK
1273.6279	142-153	0	Cys_CAM: 145, 149	1387.6708		LPECEAVCGKPK
739.3733	154-160	0				NPANPVQ
688.3777	73-77	0				QWINK
688.3777	132-136	0				QWINK
587.2824	54-57	0				NYYK
587.2824	113-116	0				NYYK
541.2439	50-53	0	Cys_CAM: 52	598.2653		YQCK
541.2439	109-112	0	Cys_CAM: 111	598.2653		YQCK

Fibrinojen gama

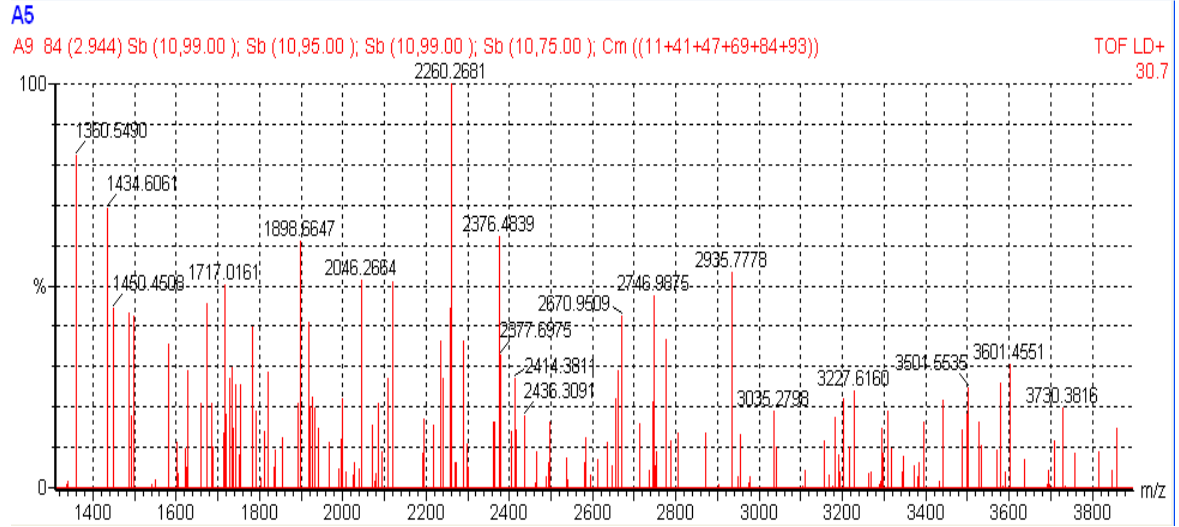


Şekil 4.24. Fibrinojen gama peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Çizelge 4.10. Fibrinojen gama için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

mass	position	#MC	anti-modifications	modifications	peptide sequence
2834.1739	302-328	0			LTYAYFAGGDAGDAFDGDFD GDDPSDK
2604.2187	200-222	0	Cys_CAM: 208	2661.2402	ANQQFLVYCEIDGSGNGWTV FQK
2520.2650	89-111	0			AIQLTYNPDESSKPNMIDAA TLK
2503.1259	433-453	0		SULF: 444, 448 2663.0395	QVRPEHPAETEDSLYPEDD L
2303.0359	41-61	0	Cys_CAM: 45, 49	2417.0788	FGSYCPTTCGIADFLSTYQT K
2290.9458	329-347	0			FFTSHNGMQFSTWDNDNDK
2207.0403	239-258	0			EGFGHLSPTGTTEFWLGNEK
1958.7796	348-364	0	Cys_CAM: 352	2015.8010	FEGNCAEQDGSWWMNK
1954.8864	365-382	0	Cys_CAM: 365	2011.9079	CHAGHLNGVYYQGGTYSK
1893.9129	383-399	0			ASTPNGYDNGIIVATWK
1780.9075	65-79	0			DLQSLDILHQVENK
1682.9588	259-273	0			IHLISTQSAIPYALR
1545.8132	418-432	0			LTIGEGQQHHLGGAK
1513.7281	135-146	0			YLQEIYNSNNQK
1491.7438	122-134	0			YEASILTHDSSIR
1446.6715	154-166	0	Cys_CAM: 161, 165	1560.7145	VAQLEAQCQEPCK
1293.7565	189-199	0			QSGLYFIKPLK
1226.6375	167-177	0			DTVQIHIDITGK
1134.5136	283-292	0			TSTADYAMFK
1117.5272	274-282	0			VELEDWNGR
1080.4448	32-40	0	Cys_CAM: 34, 35	1194.4878	DNCCILDER
906.3985	178-185	0	Cys_CAM: 179	963.4200	DCQDIANK
893.4471	115-121	0			MLEEIMK
880.4410	224-231	0			LDGSVDFK
851.4410	233-238	0			NWIQYK
759.4512	412-417	0			IIPFNR
715.3621	293-299	0			VGPEADK
714.3279	402-406	0			WYSMK
609.3355	27-31	0			YVATR
586.3922	147-151	0			IVNLK
563.3035	80-84	0			TSEVK
501.3395	85-88	0			QLIK

Alpha-1 antitripsin

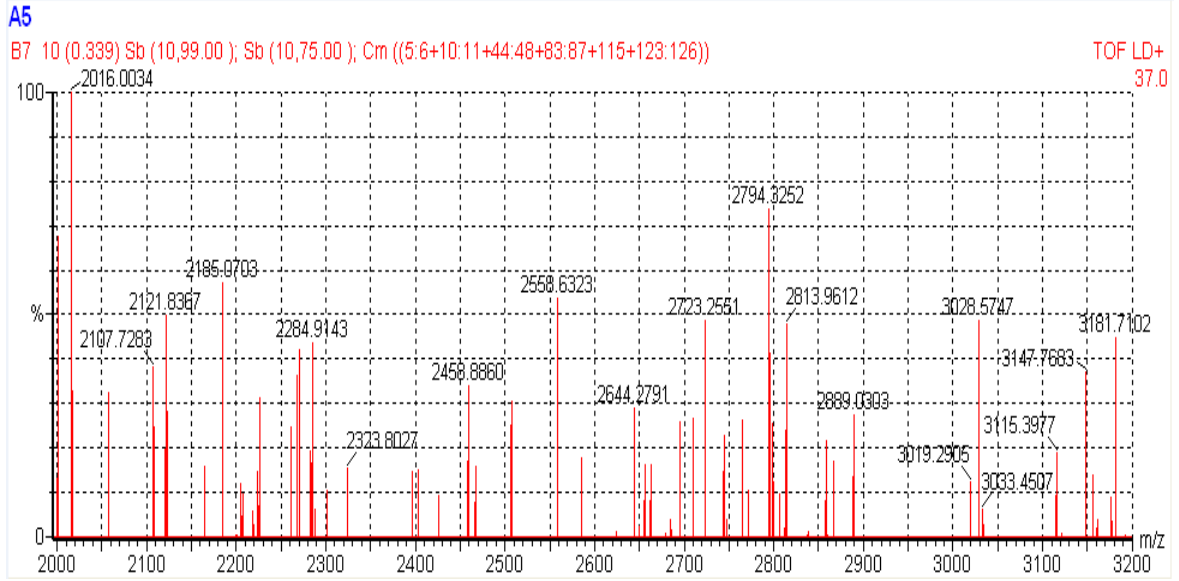


Şekil 4.25. α -1 antitripsin peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Çizelge 4.11. α -1 antitripsin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

mass	position	#MC	amb.modifications	modifications	peptide sequence
3691.8238	94-125	0			ADTHDEILEGLNFNLTPEIPE AQIHGEGFQELLR
3181.6350	64-93	0			QLAHQSNSTNIFFSPVSIAT AFAMLSLGTK
2574.3409	126-149	0			TLNQPDSQLQLTTGNGFLFLS EGLK
2259.1399	368-389	0			GTEAAGAMFLEAIPMSIPPE VK
2057.9450	161-178	0			LYHSEAFVNVFGDTEEA
1891.8555	226-241	0			DTEEDFHVDQVTTVK
1855.9775	390-404	0			FNKPFVFLMIEQNTK
1833.9228	335-352	0			VFSNGADLSGVTEEA
1803.9599	284-298	0			LQHLENELTHDIITK
1779.7681	35-49	0			TDTSHHDQDHPTFNK
1755.8952	268-283	0			YLGNATAIFFLPDEGK
1641.8635	50-63	0			ITPNLAEFASFSLYR
1576.8409	203-215	0			DTVFALVNIYFFK
1190.5809	248-257	0	Cys_CAM: 256 1247.6023		LGMFNIQHCK
1110.6041	315-324	0			LSITGTYDLK
1090.5680	218-225	0			WERPFEVK
1076.6172	259-267	0			LSSWVLLMK
1855.9775	390-404	0			FNKPFVFLMIEQNTK
1701.8954	375-389	0			MFLEAIPMSIPPEVK
785.4516	412-418	0			VVNPTQK
779.4120	405-411	0			SPLFMGK

Serotraserin

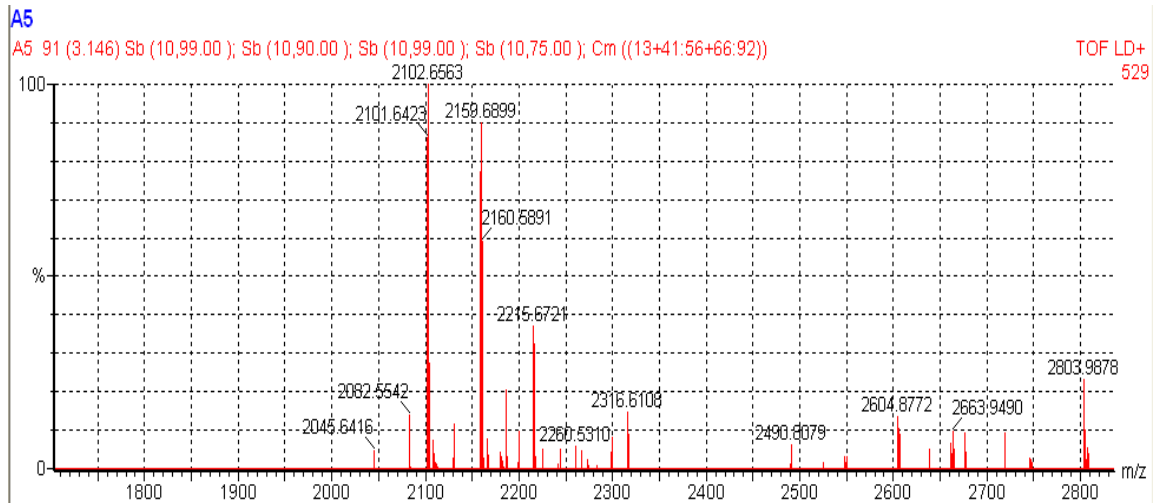
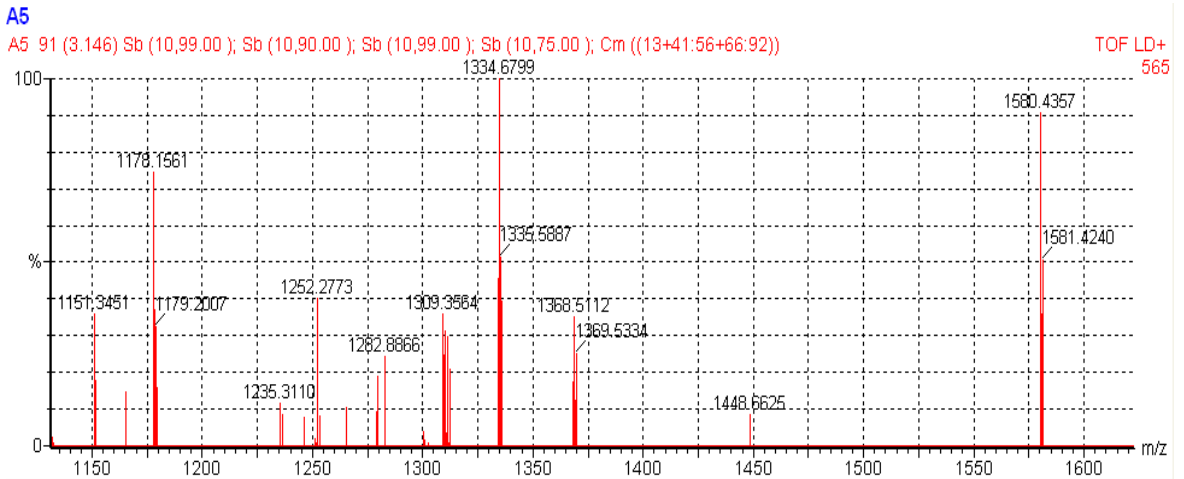
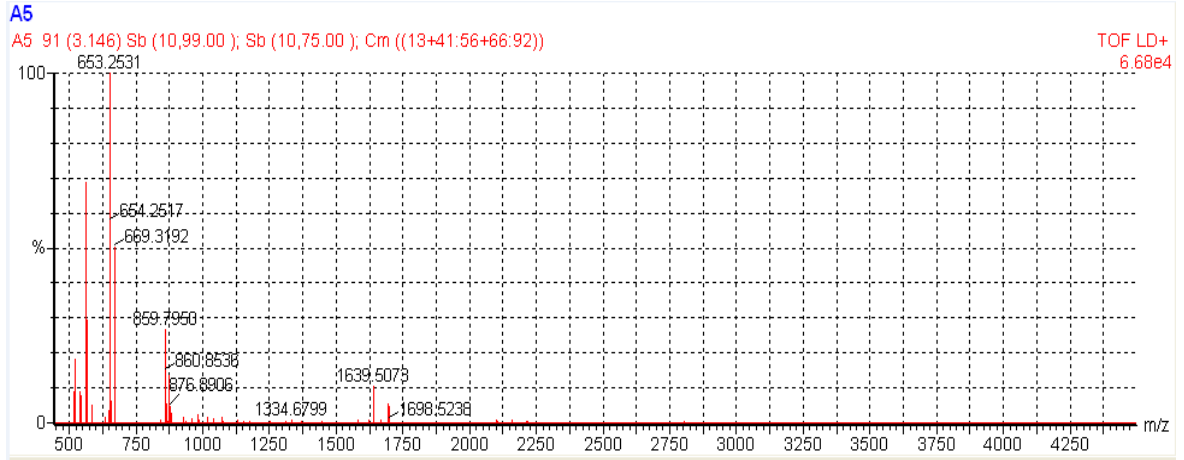


Şekil 4.26. Serotraserin peptidlerine ait Mal-di-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Çizelge 4.12. Serotraserin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

635.3763	311-315	0			DLLFK
629.3729	677-682	0			AVGNLR
617.3253	572-576	0			NLNEK
614.3872	163-167	0			KPLEK
591.3170	542-546	0	Cys_CAM: 542	648.3385	CLVEK
540.2888	660-663	0			LHDR
530.2391	43-46	0			DHMK
1520.6362	495-508	0	Cys_CAM: 503	1577.6576	FDEFFSEGCAPGSK
1482.6893	240-251	0	Cys_CAM: 246	1539.7108	DQYELLCLDNTR
1478.7348	332-343	0			MYLGYEYVTAIR
1419.7300	421-433	0	Cys_CAM: 421	1476.7515	CGLVPVLAENYNK
1417.6450	684-696	0	Cys_CAM: 684, 693	1531.6879	CSTSSLLEACTFR
1358.6984	47-60	0	Cys_CAM: 58	1415.7198	SVIPSDGPSVACVK
1297.6092	577-587	0	Cys_CAM: 582	1354.6307	DYELLCLDGTR
1283.5691	531-541	0			EGYYGYTGAFR
1276.6320	300-310	0			EFQLFSSPHGK
1273.6535	226-236	0			HSTIFENLANK
1260.5677	27-37	0	Cys_CAM: 28	1317.5892	WCAVSEHEATK
1249.6059	454-464	0			SASDLTWDNLK
1223.5361	374-384	0	Cys_CAM: 374	1280.5575	CDEWSVNSVGK
1195.5524	123-132	0			DSGFQMNQLR
1166.5912	554-564	0			HQTVPQNTGGK
1138.5210	363-371	0	Cys_CAM: 364	1195.5425	WCALSHHER
1000.4986	669-676	0			YLGEYVK

Albumin

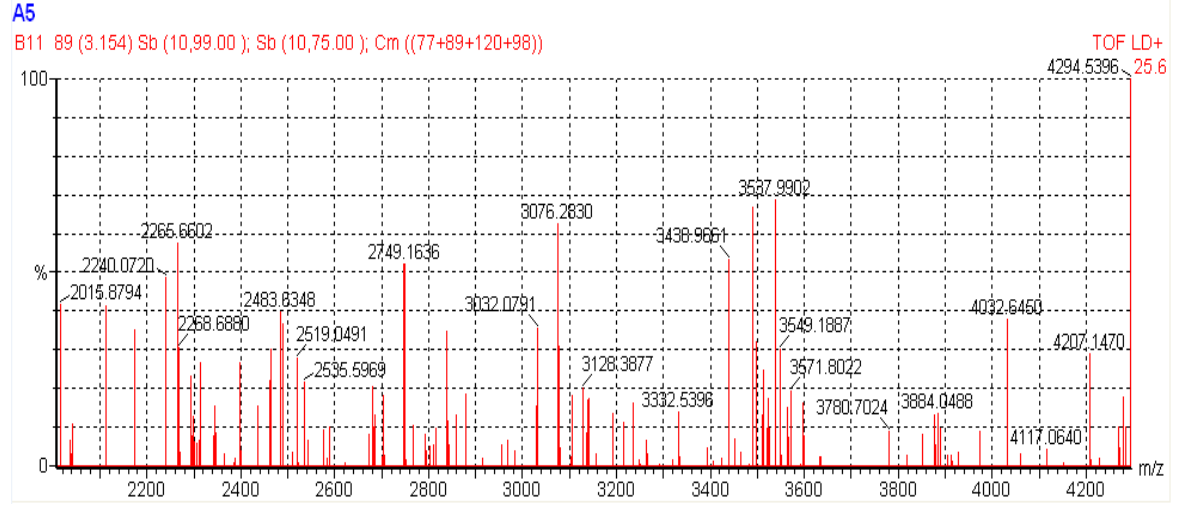


Şekil 4.27. Albumin peptidlerine ait Mald-TOF kütle spektrometresi spektrumu

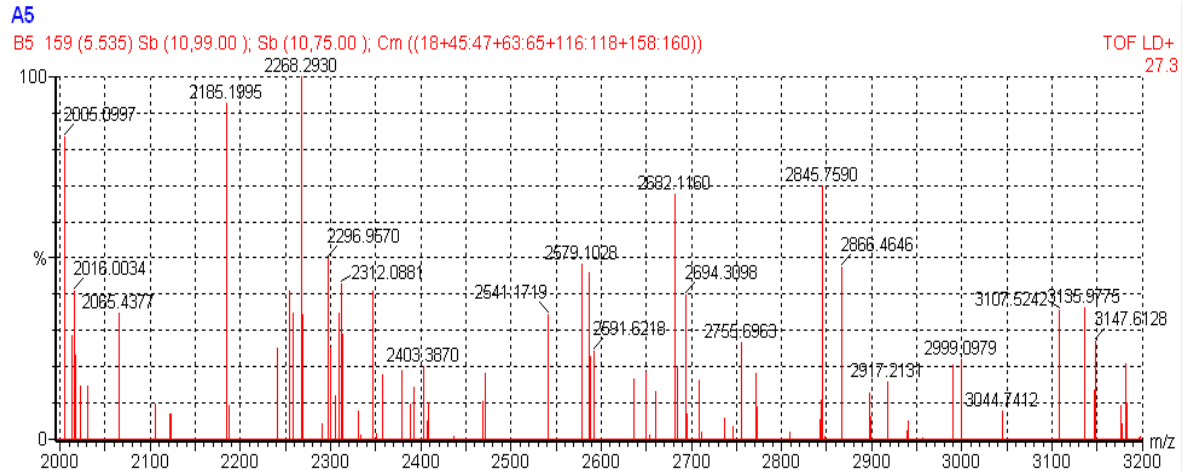
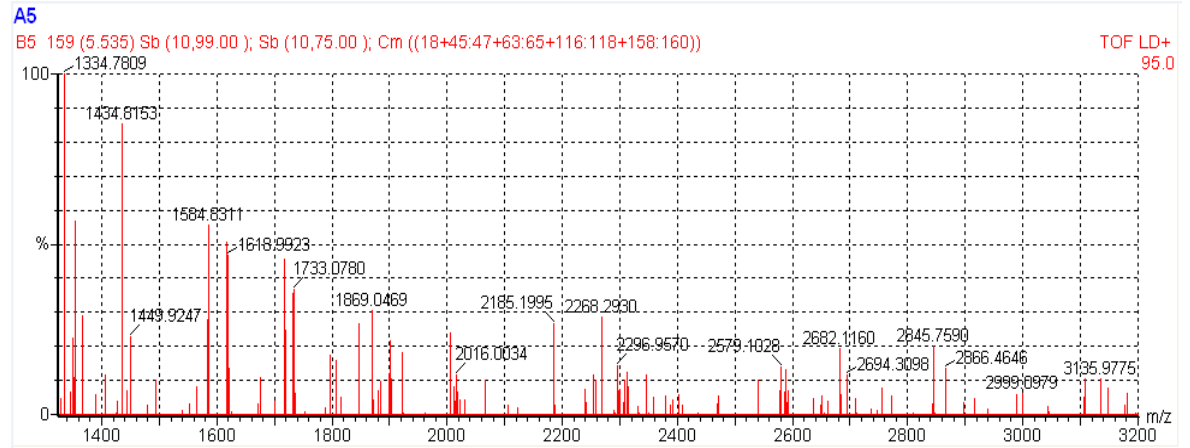
Çizelge 4.13. Albumin için listelenmiş olan peptit dizileri ve kütleleri (www.uniprot.org)

mass	position	#MC	with modifications	modifications	peptide sequence	
2917.3229	311-337	0	Cys_CAM: 313	2974.3444	SHCIAEVENDEMPADLP SLA ADFVESK	
2593.2425	139-160	0	Cys_CAM: 148	2650.2639	LVRPEVDVMCTAFHDNEETF LK	
2433.2635	45-65	0	Cys_CAM: 58	2490.2849	ALVLIAFAQYLQQCPFEDHV K	
2404.1709	470-490	0	Cys_CAM: 472, 485	2518.2138	MPCAEDYLSVVLNQLCVLHE K	
2203.0012	525-543	0	Cys_CAM: 538	2260.0226	EFNAETFTFHADICTLSEK	
2045.0953	397-413	0			VFDEFKPLVEEPQNLK	
1915.7731	265-281	0	Cys_CAM: 269, 270, 277	2086.8375	VHTECCHGDLLECADDR	
1853.9102	509-524	0	Cys_CAM: 511	1910.9316	RPCFSALEVDETYVPK	
1742.8940	170-183	0			HPYFYAPPELLFFAK	
1623.7875	348-360	0			DVFLGMFLYEYAR	
1600.7312	414-426	0	Cys_CAM: 416	1657.7526	QNCSELFQLGEYK	
1511.8427	439-452	0		PHOS: 443, 444, 446 1751.7417	VPQVSTPTLVEVSR	
1386.6206	287-298	0	Cys_CAM: 289	1443.6420	PHOS: 294, 297 1546.5532	YICENQDSISSK
1384.5355	76-88	0	Cys_CAM: 77, 86	1498.5784	PHOS: 82 1464.5018	TCVADESAENCDK
1381.5333	384-396	0	Cys_CAM: 384, 385, 393	1552.5977		CCAAADPHECYAK
1342.6347	570-581	0			AVMDDFAAFVEK	
1320.4905	106-117	0	Cys_CAM: 114, 115	1434.5334		ETYGEMADCCAK
1311.7419	362-372	0			HPDYSVLLLLR	
1257.5238	187-198	0	Cys_CAM: 192, 193	1371.5667		AAFTECCQAADK
1191.5748	301-310	0	Cys_CAM: 302, 303	1305.6177		ECCEKPLLEK
1149.6150	66-75	0			LVNEVTEFAK	
1024.4550	500-508	0	Cys_CAM: 500, 501	1138.4979		CCTESLVNR
1018.4775	123-130	0	Cys_CAM: 125	1075.4989		NECFLOHK
1017.5363	89-97	0			SLHTLFGDK	
1013.5989	599-609	0			LVAASQAALGL	
1013.4244	589-597	0	Cys_CAM: 591	1070.4459		ETCFAEEGK
1000.6037	550-558	0			QTALVELVK	
984.4884	376-383	0			TYETTLEK	
960.5625	427-434	0			FQNALLVR	
951.4418	37-44	0			DLGEEFK	
940.4483	131-138	0			DDNPNLPR	
927.4934	162-168	0			YLYEIAR	
880.4410	250-257	0			AEFAEVSK	
876.4971	98-105	0	Cys_CAM: 99	933.5186		LCTVATLR
789.4716	258-264	0			LVTDLTK	
715.4171	199-205	0	Cys_CAM: 201	772.4385		AACLLPK
698.3580	29-34	0			SEVAHR	
695.3359	342-347	0			NYAEAK	
674.3468	491-496	0			TPVSDR	
673.3780	237-242	0			AWAVAR	
658.3155	118-122	0			QEPER	
649.3338	224-229	0	Cys_CAM: 224	706.3552		CASLQK
645.3566	206-210	0			LDELK	
645.3566	206-210	0			LDELK	
581.3042	464-468	0			HPEAK	
517.2980	566-569	0			EQLK	
517.2980	282-286	0			ADLAK	
509.3194	559-562	0			HKPK	
508.2514	230-233	0			FGER	
503.2936	243-246	0			LSQR	

IgG ağır ve IgG hafif



Şekil 4.28. IgG hafif peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu



Şekil 4.29. IgG ağır peptidlerine ait Maldi-TOF kütle spektrometresi spektrumu

Maldi-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin 2D jel elektroforezi profillerinde gözlenen deneysel pI ve Mr değerleri ile Mascot ve ExPasy veri tabanlarındaki teorik pI ve Mr değerleri veri tabanı skorları ile birlikte Çizelge 4.14'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. Maldi-Tof kütle spektrometresi ile tespit edilen proteinlerin teorik ve deneysel pI ve Mr değerlerinin karşılaştırması, eşleşen peptit sayısı ve skorları (ExPasy'de eşleşen peptit sayıları, ilgili proteinlerin UniProtKB/Swiss-Prot veri tabanından elde edilen triptik peptit kütlelerinin MALDI-TOF spektrumlarıyla gözle karşılaştırılarak elde edilmiştir)

Protein Adı	Erişim No	Teorik pI/Mr	Ölçülen pI/Mr	Mascot'ta score eşleşen peptit s (sırasıyla)	ExPasy'de eşleşen Peptid Sayısı
Albumin	P02768	5.67/ 66472.2	5.5/ 66100	44/37	14/24
Transferin	P02787	6.7/ 75181.4	6.6/ 83600	48/39	12/25
Haptoglobin	P00738	6.13/ 43349	5.6/ 43200	55/46	13/19
α-1 antitripsin	P01009	5.37/ 44324.5	5.1/ 56900	69/19	5/14
Fibrinojen beta zincir	P02675	7.95/ 50762.9	7.8/ 58100	55/14	10/16
Fibrinojen gama zincir	P02679	5.24/48483	5.4/ 49800	Bulunmadı	6/18
Immunoglobulin zincir	P99007	6.43/ 25195	6.3/ 26900	Bulunmadı	tanımlanmamış
Immunoglobulin zincir	P99006	6.68/50930	6.8/54200	Bulunmadı	tanımlanmamış

Aşağıda Mascot veri tabanından alınan Haptoglobin proteininde eşleşen peptitler kırmızı olarak gösterilmiştir.

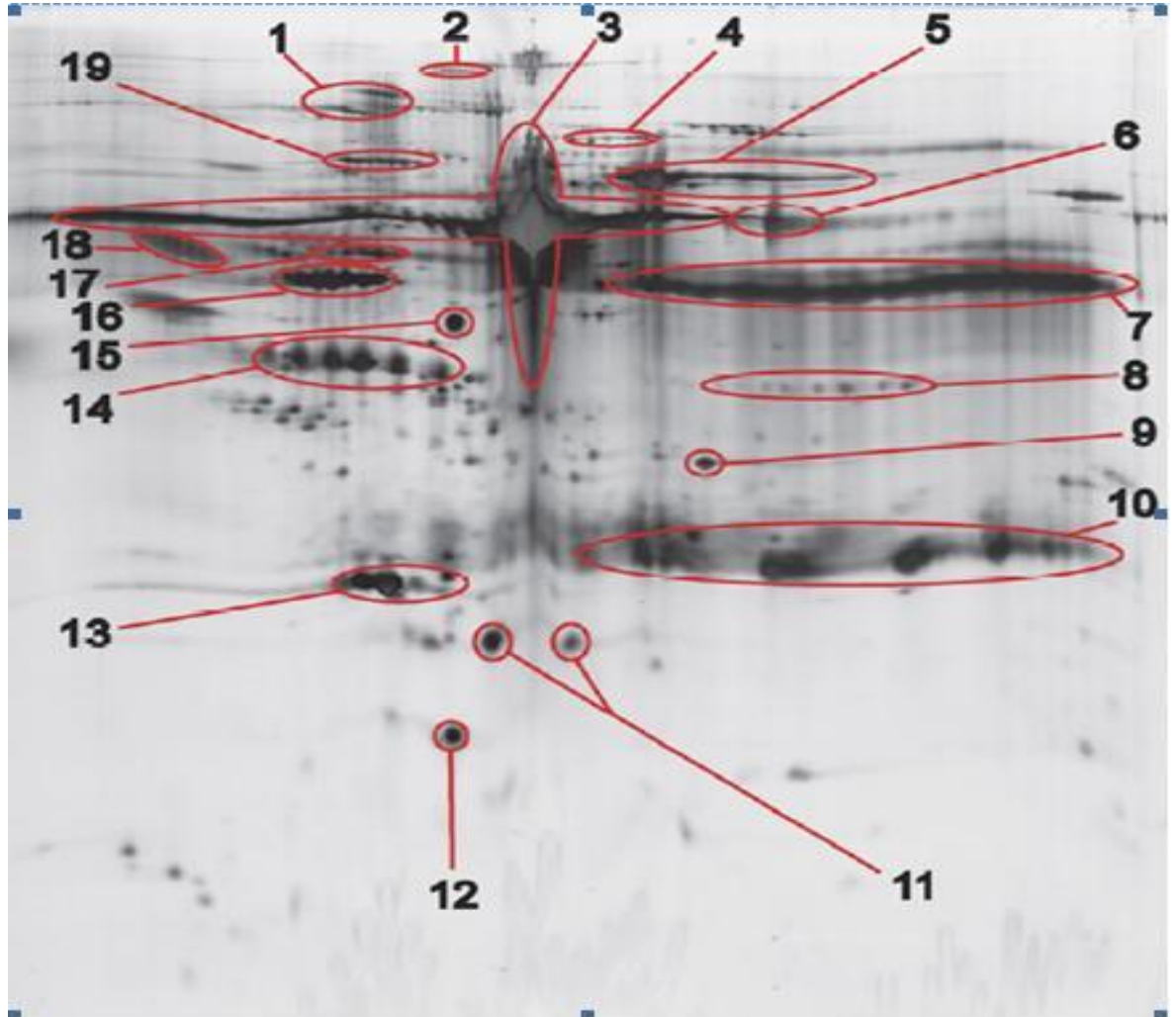
```

1 MSALGAVIAL LLWGQLFAVD SGNDVTDIAD DGC PKPPEIA HGYVEHSVRY
51 QCKNYYKLRT EGDGVYTLND KKQWINKAVG DKLPECEADD GCPKPPEIAH
101 GYVEHSVRYQ CKNYYKL RTE GDGVYTLNNE QWINKAVGD KLPECEAVCG
151 KPKNPANPVQ RILGGHLDK GSF PWQAKMV SHHNLTTGAT LINEQWLLTT
201 AKNLFLNHSE NATAKDIAPT LTLYVGKKQL VEIEKVV LHP NYSQVDIGLI
251 K LKQKVS VNE RVMPICLPSK DYAEVGRVGY VSGWGRNANF KFTDHLKYVM
301 LPVADQDQCI RHYEGSTVPE KKTPKSPVGV QPILNEHTFC AGMSKYQEDT
351 CYGDAGSAFA VHDLEEDTWY ATGILSFDKS CAVA EYGVYV KVT SIQDWVQ
401 KTIAEN

```


5. TARTIŞMA

Sağlıklı bireyde plazma 2D jel elektroforezi profilinde ifade olan abundant proteinlerin SDS-PAGE jel dağılımı aşağıdaki gibidir;



Şekil 5.1. Abundant protein konumları:1: seruloplasmin, 2: α -2 makroglobin, 3: albumin, 4: komplement faktör B, 5: Transferin, 6: complement c3, 7 ve 8: immünoglobulin ağır zincir γ , 9: c4 komplement, 10: immünoglobulin hafif zincir, 11 ve 14: haptoglobin, 12: prealbümin, 13: apolipoprotein A, 15: fibrinojen, 16: α -1 antitripsin, 17: α -1 antikimotripsin, 18: immunoglobulin ağır zincir α , 19: secretory immunoglobulin zincir α (Zolotarjova et al.2008).

Fibrinojen ve diğer inflamasyona duyarlı plazma proteinleri (ISPs) şiddetli ve sürekli inflamasyon bileşenleridir. İnflamasyon, ateroskleroz gelişiminde rol alan ve kalp krizi (MI) riskini artıran bir bulgudur. Atheroskleroz ve özellikle erken MI olgularında ISPs (fibrinogen, alpha-1-antitrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin, ve orosomuroid) ifade düzeylerinin artışı gösterilmiştir (Engstrom et al 2003).

Endotel inflamasyonu sonucunda IL-6 ve IL-1 β gibi sitokinlerin ve fibrinojen sentezini arttıran TNF- α 'nın yapımı artar. IL-6 insandaki major prokoagulan sitokindir ve bir akut faz reaktanı olan ve IL-6'nın etkisiyle artan CRP (C reaktif protein) monositlerde doku faktörünün artışına neden olmaktadır (Wada et al 2003).

Kanda heparin ve heparine benzer diğer fibrinolizis ürünleriyle plazmada fibrinojen seviyesi düşer. Düşük fibrinojen seviyeleri; konjenital ve kazanılmış hipo- ve afibrinojenemi tablolarında görülür.

Bu tez çalışması kapsamında kontrol grubu içinde FVL G1961A ve protrombin G20210A mutasyonu taşıyan bireyler ile iki mutasyonu da taşımayan bireyler arasında yapılan PDQuest ve SPSS 9.0 analizlerinde, protrombin G20210A genetik değişimi olan ve olmayan kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0.003). Ancak fibrinojen protein ifade azalışı olarak yansıyan bu fark (1.09) kontrol grubunda hiç bir tedavi alınmadığı (Heparin) ve birey sayısının az olduğu düşünülerek ihmal edilmiştir.

Ayrıca hasta grubu içinde FV G1961A gen değişimi olan ve Protrombin G20210A gen değişimi olan hastalarda MI geçiren ve MI geçirmeyen 3 hasta grubuna ayrılarak istatistik analiz yapılmıştır. (Kontrol grubu içinde gen değişimi olmayan kontrol bireylerin PDQuest programında hasta grubundaki bireyler ile normalizasyon uyumluğu sağlanamadığı için hasta grubunun kendi içinde normalizasyonu sağlanarak analiz yapılmıştır). Fibrinojen beta spotunun iki izotopunun gruplar arası anlamlı fark göstermektedir. 7503 SSP numaralı fibrinojen beta spotu için, MI geçiren ve geçirmeyen gruplar arasında protrombin ve FVL gen değişimlerini taşıyan gruplar arasındaki fark sırasıyla 2.22 ve 2.31 kat, 8406 SSP numaralı fibrinojen beta spotu için MI geçiren ve geçirmeyen gruplar arasında protrombin

ve FVL gen değişimlerini taşıyan gruplar arasındaki fark sırsıyla 2.57 ve 1.67 kattır ve fibrinojen beta ifadesinde MI geçiren hastalarda artış görölmektedir.

Yukarıda bahsedildiği gibi MI ve ateroskleroz hastalarında inflamasyon ilişkili proteinlerde, (ISPs) artış literatürde de yer almaktadır.

Yapılan analizlere göre 4404 SSP numaralı spot olan Alpha -1-antitripsin protein profilinde MI geçiren protrombin gen değişimi olan hasta grubu ile diğer hasta grupları (MI olmayan protrombin gen değişimi olan ve FV gen değişimi olan hasta grupları) arasında anlamlı fark bulunmuştur. MI geçiren ve geçirmeyen gruplar arasındaki bu fark 3.494 kat MI geçiren hastalarda ifade artışı olarak gösterilmiştir. Ayrıca MI geçiren hasta grubu ile FVL taşıyıcı hasta grubu arasında 2.364 kat ifade artışı MI geçiren hastalarda gösterilmiştir.

İnflamasyonlarda destekleyici olarak komplement sistemleri önemli rol oynamaktadır. Komplement C1 bu kaskatın anahtar başlatıcısı olarak bilinmektedir. Komplement C1 aktivatörlere bağlanarak birincil antijen-antikor kompleksi oluşturarak bu yolağın başlamasını aktive etmektedir. Çalışmalara göre komplement C1 endotelial hücre reseptörüne bağlanarak inflamasyon sitokinlerini (IL-8, IL-6 ve MCP-1) indüklemektedir.

Komplement sisteminin aktif olması inflamasyonda anahtar rol olarak obezite ve şeker direncinin patojenite belirtisidir. Komplement C1 aktivasyonu adipoz hücrelerde düzenleyicidir, obezite ve şeker direnci hastalıklarında artarak regülatör rol oynamaktadır. Kompleman sistemi, pıhtılaşma, kinin ve fibrinolitik sistem birbirileri ile ve bazı hücre zarı proteinleri ile etkileşim halindedir.

Hemostaz sisteminde yer alan bir çok protein ve bu proteinlerin hücre reseptörleri kompleman aktivasyonu, bağışıklık cevabı, sitokin salınımı, hücre proliferasyonu, büyüme ve farklılaşma gibi diğer sistemlerden etkilenmektedir. Kontak sisteminin, koagülasyon sisteminin yanı sıra fibrinoliz, kininogenez, kompleman ve anjiyogenez sistemleri gibi

diğer kan plazma proteolitik sistemlerinin aktivasyonunu da tetiklediğini gösteren araştırmalar mevcuttur (Hergenç 2004).

C1 INB kompleman ve koagölasyon yolundaki serin proteazları inhibe etmektedir. Sağlıklı insan trombositlerinin alfa granülleri C1 INB içermektedir. C1 INB'nin trombosit aktivitesindeki düzenleyici rolü, eksikliğinin artmış trombosit kümeleşmesi, FXIIa ve protrombin fragman F1.2'ye yol açması ile izah edilebilir.

E. coli, *Trypanosoma*, diğer parazitler, virüsle infekte olmuş hücreler, maya hücre duvarı, kobra venom faktörü, nefritik faktör, dekstran sülfat, polivinil sülfat, nöraminidaz ile muamele edilmiş eritrositler, insanda diğer memelilerin eritrositleri, antijen-antikor kompleksleri, Ig A ve klasik yolu aktive eden immunglobulinler, lipopolisakkarid ve diğer bakteri ürünleri kompleman sistemini alternatif yol aracılığı ile aktive ederler. Alternatif yol bakteri hücumunda ön safta yer alır ve henüz konağın antikor üretimi için yeterli zaman bulamadığı dönemde devreye girer. Klasik yolun etkinleştirilmesi sonucunda aktifleşen C3 de, alternatif yolu aktifleştirebilmektedir. C3 klasik ve alternatif yolun birleştiği noktada yer alır ve kompleman sisteminin en önemli üyelerinden biridir. Dolaşımında C3 proteolitik enzimlerin etkisi ile C3a ve C3b'ye ayrılmakta, ancak faktör I ve H ile sürekli olarak inaktive edilerek düşük düzeyde tutulmaktadır. Patojen mikroorganizmaların polisakkarid ve lipopolisakkaridleri varlığında bu denge bozulduğunda C3b, faktör B ve D ile etkileşime girer. Dolaşımında devamlı olarak hidrolize uğrayarak farklı bir konformasyona çevrilen C3, faktör B'ye, bu ikiliye de faktör D bağlanır ve sonuçta faktör B kırılır. Geride kalan kompleks, alternatif yol C3 konvertazdır. Properdin, bu konvertaza bağlanır ve onu stabilize eder ve kompleman kaskadının devamını sağlar. Faktör D, plazmada aktif halde bulunan bir proteazdır (Zhang et al 2007).

Bu tez çalışması kapsamında kontrol grubu içinde FV 1961 ve protrombin 20210 mutasyonu taşıyan bireylerde ve mutasyon taşımayan bireyler arasında yapılan PDQuest ve SPSS 9.0 istatistik analizlerinde inflamasyona karşı olarak komplement C1'de FV G1691A ve Protrombin G20210A gen değişimi olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ve protrombin gen değişimi taşıyanlarda protein ifadesi artış göstermektedir(P=0.033). Komplement C3'de FV G1691A gen değişimi ve gen değişimi

olmayan kontrol grubu arasında protein ifadesinde anlamlı bir fark yok iken protrombin G20210A gen değişimi ve protrombin gen değişimi olmayan kontrol grubu arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (P=0.016).

Hasta grubundaki kompleman protein ifadesine baktığımızda kompleman sisteminin alternatif yolu olan Kompleman faktör B protein ifadesinde MI olmayan protrombin gen değişimi olan grup ile FVL gen değişimi olan grup arasında anlamlı bir fark görölmektedir ve FVL hasta grubunda protein ifadesinde artış tespit edilmiştir (P=0.027).

IgG ağır zinciri protein ifadesi gruplar arasında hem protrombin gen değişimi hem de kontrol FVL gen değişimi olan grup ile protrombin ve FVL gen değişimi olmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir. Protrombin gen değişimi olan ve olmayan grup arasındaki fark (P=0.001) ve FV gen değişimi olan ve olmayan grup arasındaki fark (P=0.012) anlamlı bulunmuştur. Yani protrombin ve FVL protein gen değişimi olanlar gen değişimi olmayanlara göre protein ifadelerinde artış göstermektedir.

Bağışıklık sisteminin bir öğesi olup, kan ve vücut yağları, pıhtılaşma, kinin ve fibrinolitik sistemlerle ilişkili, son derece karmaşık ve sıkı düzenlenen bir sistem olan kompleman sisteminin ateroskleroz ve trombozdaki rolü, yakın bir gelecekte yoğun çalışmalara konu olacaktır. Kompleman sisteminin bazı komponentlerinin ölçümü ateroskleroz ve trombozu öngörmede, erken miyokard infarktüsünün tersinir iskemiden ayırıcı tanısında ve MI sonrasındaki reperfüzyonun inflamatuvar boyutunun kontrolünde faydalı belirteç olmaya adaydır (Hergenç 2004) .

Ayrıca literatüre göre lipokalin-2 protein seviyesi ateroskleroz ve Myocardial infarction(MI) hasalarında artış göstermektedir. Aigner ve arkadaşlarının raporuna göre lipokalin-2, iskemi ve reperfusion olaylarında düzenleyici rol almaktadır. Lipokalin-2 ailesinden olan Retino binding protein 4 yağ dokusunda salgılanmaktadır ve son zamanlarda obezite ve insulin direncine sebep olarak gösterilmektedir (Choi et al. 2008).

Bu tez çalışmasında 3 hasta grubu arasında yapılan istatistik analizlerinde. MI geçiren grubunda Retino binding protein 4 protein profilinde diğerlerine göre artış görülmektedir. Bu artış MI geçiren protrombin gen değişimi olan grubunda MI geçirmeyen protein gen değişimi olan hasta gruba nazaran 1.684 kat ve FV gen değişimi gösteren hasta grubuna nazaran 1.694 kat artış göstermektedir.

Çalışma sonucu belirtilen protein profil farklılıklarının: Tromboz ile ilişkili moleküler değişikliklerin anlaşılmasında, hastalığın tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde, yeni hedef moleküllerin bulunmasına ve çoklu biyobelirteç geliştirilmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ulaşılan bilgiler ışığında verilerin kabul edilebilirliğinin artırılması veya doğruluğunun kanıtlanması için daha fazla hasta sayısı üzerinden çalışmanın devamı planlanmaktadır.

Bu çalışmanın; trombozun başlaması, ilerlemesi veya şiddeti ile ilişkili olabilecek genlerin büyük bir çoğunluğu tarafından oynanan spesifik rollerin protein seviyesinde aydınlatılmasında da yararlı olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; bu tez çalışması kapsamında yapılan proteomik analizler ile tromboembolizm için risk faktörü olarak bilinen FVL ve Protrombin G20210A gen değişimlerinin plazma protein profiline etkisinin özellikle ifadesi yüksek abundant proteinler üzerinden olduğu düşünülmektedir.

Bu iki gen değişiminin Atheroskleroz ve özellikle erken MI için, inflamasyon yolağı üzerinden abundant proteinlerin ifade değişimine neden olarak riski arttırdığı gösterilmiştir.

Çalışmanın hasta-kontrol grubu artırılarak ve her bir nükleotid değişimini ayrı ayrı taşıyan ve birlikte taşıyan gruplar arasında devam ettirilmesi ile bulguların doğrulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR:

- Atahan, E., Çağlar, E., Şarkış, C., Uğurlu, S. 2009. Venöz tromboemboli ve kalıtsal trombofili. *Turkish J Thorac Cardiovasc*, 17(4); 302-311.
- Akar,N., Akar, E., Mısıroğlu, M., Avcu, F., Yalçın, A., and Cın, Ş.1998. Search For Factors Favoring Thrombosis İn Turkish population. *Thrombosis Research* 92; 79-82
- Akar N, Misirlioglu M, Akar E, Avcu F, Yalcin A, Sozuoz A. Prothrombin gene 20210 G-A mutation in the Turkish population. *Am J Hematol*, 1998 Jul;58(3):249.
- Akar N, Akar E, Deda G, Sipahi T, Orsal A. Factor V1691 G-A, prothrombin 20210 G-A, and methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T variants in Turkish children withcerebralinfarct.*J Child Neurol*. 1999 Nov;14(11):749-51.
- Aldreda, S., Grantb, M.M., Griffithsb, H.R.2004. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research, *Clinical Biochemistry*, 37; 943– 952.
- Barcelo-Batllori S, André M, Servis C. 2002. Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: implications for inflammatory bowel diseases, *Proteomics* 2; 551–60.
- Bayır, A. and Ak. 2003. Acil olgularda trombolitik tedavi. *Genel Tıp Dergisi*, 13(2);81-88
- Berber, E., Kavaklı, K., Akar, N., Berber, E., Çağlayan, S.H. 2003. R506Q (FV Leiden) and R485K Mutations in the Factor V Gene: Incidence in Deep Venous Thrombosis and Hemophilia A Patients. *Turk J Haematol*, 20(4); 221-225.
- Bilguvar, K., Yasuno, K., et al. 2008. Susceptibility Loci For İntracranial Aneurysm İn European And Japanese Populations. *Nat Genet*, 40(12); 1472-7.
- Choi, K M., Lee,J S., Kim,E J., Baik,S H., Seo, H S., Choi, D S., J, Oh and Park, C G.2008 Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease. *European Journal of Endocrinology*, 158; 203–207.
- Çelebi, H. 2004. 20 Yaşında Bir Erkek Tromboz Geçirirse. XXXI.Ulusal Hematoloji Kongresi IV. Hematoloji İlk Basamak Kursu, 53-60.
- D.Blann, A., Y. H.Lip,G. 2006. Venous thromboembolism. *BMJ Volume*, 332.
- Demiralp, D.Ö. 2009. Venöz Tromboembolizme proteomik Yaklaşımlar. *Yeni Tıp dergisi*, 26; 145-147.

- Demiralp, D., Akar, N., C. Haznedaroğlu, İ., Gümüştekin, Ç ve Göker, H. 2008. Kanama durdurucu Ankaferd ve etki mekanizmasının proteomik yaklaşımı. 10. ulusal iç hastalıkları kongresi. So4 ; 176
- Engström, G., Lind, P., Hedblad, B., Stavenow, L., Janzon, L., Lindgärde, F. 2002. Effects of Cholesterol and Inflammation-Sensitive Plasma Proteins on Incidence of Myocardial Infarction and Stroke in Men. *Circulation*, 105; 2632-2637
- Günel, T., 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri J Med*, 27; 763-767.
- Güran, Ş. 2005. Hastalıklara yeni bir tanı yaklaşımı: protein-çip teknolojisi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 47; 243-245
- Günel, A., Daniş, Ö., Demir, S., Ogan, A., Aker, R., Onat, F ve Gülçebi, M. 2009. Proteomiks Yaklaşımı Kullanılarak GAERS’lerde Farklılaşan Proteinlerin Tanımlanması. *Türk Norol Derg*, 15(Ek 1); 139-179.
- Greco, M., Chiriaco, F., Del Boccio, P., Tagliaferro, L., Acierno, R., Menegazzi, P., Pinca, E., Pignatelli, F., Storelli, C., Federici, G., Urbani, A. and Maffia, M. 2006. A proteomic approach for the characterization of C677T mutation of the human gene methylenetetrahydrofolate reductase. *Proteomics*, 6; 5350–5361.
- Ganidağlı, S., Gedik, R., Koruk, S., Mızrak, A. 2008. Yoğun Bakımda Koagülasyon. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(1); 36-44.
- Hamdan, M., Righetti, P. G (Eds). 2005. *Proteomics Today. Protein Assessment and Biomarkers Using Mass Spectrometry, 2D Electrophoresis, and Microarray Technology*. John Wiley & Sons, Inc., 426 p., New Jersey.
- Hergenç, Gülay. 2004. Kompleman Sisteminin Aterosklerozdaki Rolü. *Türk Kardiyol Dern Arş*; 32; 28-37.
- Kızkın, Ö., Hacıevliyagil, S. S., Mutlu, L. C., Günen, H., Yıldırım, Z. 2002. Pulmoner Tromboembolide Genetik Risk Faktörleri (Beş Olgu Nedeniyle). *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3); 215-218.
- Kılbaş, A. 2007. Genç Serebral İnfraktli Hastalarda Protrombotik Gen Mutasyonlarının Araştırılması. *Tıpta Uzmanlık Tezi*, 18-46.
- Kurt, N. Toluunay, M. Yüzbaşıoğlu Aslan, B. Total Kalça Protezi Operasyonlarında Postoperatif Venöz Yetmezlik ve Derin Ven Trombozu ve Epidural Anestezinin Etkileri. *Clinical Research*, Vol.13 No.4; 215-220
- Özdağ, H., Yonca, E., Akar, N. 2006. Protrombin Gen 20209 C-T Along With The First Description Of A Homozygous Polymorphism At The 3’ Downstream Region +4 C-T In Turkish population. *Laboratory Hematology*, 12; 131-133

- Poort, R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H., and Bertina, R.M. 1996. A Common Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene Is Associated With Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis. *Blood*, Vol 88, NO 10 (November 15) PP; 3698-3703.
- Silan, F., Ve Zafer, C. 2004. Faktör V Leiden Mutasyonu. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 1; 33-36.
- Steel LF, Shumpert D, Trotter M. 2003. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, 3; 601-9.
- Sayınalp, N. 2007. Koagülasyonun ABC'si: Protein C. 6. İlk Basamak Kursu, 29-31.
- Tangün, Y., Köroğlu, A. 2007. Kan Pıhtılaşması. <http://www.kanbilim.com>, (Erişim Tarihi; Nisan 2010).
- Tangün, Y., Köroğlu, A. 2007. Kan Pıhtılaşması. <http://www.kanbilim.com/Trombofili.htm>, (Erişim Tarihi; Nisan 2010).
- Türedi, A. 2006. Hemiplejik Serebral Palsili Çocuklarda Protrombotik Gen Mutasyonlarının Sıklığı. Uzmanlık Tezi, 19-36.
- Uzun, Ş., Sarıçoğlu, F., Çeliker, V. 2007. Derin Ven Trombozu. *Türkiye Klinikleri J Med*, 27; 853-861.
- Ulu, A., Yılmaz, E., Akar, E., Akar, N. 2003. Homozygosity For The HR2 Haplotype: Is It A Risk Factor For Theombosis?. *turk J Haematol*, 20(4); 213-215
- Yılmaz, E., Akar, E., Akar, N., Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thromboembolic patients with and without prothrombin 20210 G-A. *Turk J Haematol*, 21(2); 83-86.
- Y. Güneştutar, L., C. RODOP, M. 2009 Elektroferezde Yeni Yaklaşımlar. *Sigma* 27; 151-160.
- Zolotarjova, N., mrozinski, P., Chen, H., Martosella, J. 2008. Combination of affinity depletion of abundant proteins and reversed-phase fractionation in proteomic analysis of human Plasma/serum. *Journal of Chromatography A*, 1189; 332-338
- Zaatari, G.S., Otrock, Z.K., Sabbagh, A.S., Mahfouz, R.A.R. 2006. Prevalence of factor V R2 (H1299R) polymorphism in the Lebanese population. *Pathology (October)*, 38(5); PP, 442-444.
- Zhang, J., Wright, W., A. Bernlohr, D., W. Cushman, S and Chen, X. 2006. Alterations of the classic pathway of complement in adipose tissue of obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292; E1433-E1440.
- Wada, H., Mori, Y., Okabayashi, K., C. Gabazza, E., Kushiya, F., Masato Watanabe, M., Hiroshi Shiku, N. and Nobori, T. 2003. High Plasma Fibrinogen Level Is

Associated With Poor Clinical Outcome in DIC Patients. American Journal of Hematology, 72; 1–7.

<http://www.expasy.ch>(erişim tarihi: 29 Mart 2010)

(<http://www.scribd.com/doc/24603098/IPG-Ready-Strip-Instructions>

<http://www.scribd.com/doc/24603098/IPG-Ready-Strip-Instructions>

[http:// www.kanbilim.com/kanpıh.htm](http://www.kanbilim.com/kanpıh.htm)

dersetkinliklerii.blogcu.com/.../7137406

www.muhteva.com/pihtilasmanin-ilk-adimlari-tr

[www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=g \)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=g)

www.kanbilim.com/Trombofili.htm

[http://www.wellsphere.com/general-medicine-article/warfarin-part-1/743626\)](http://www.wellsphere.com/general-medicine-article/warfarin-part-1/743626)

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Tromboz>

[http:// www.kanbilim.com/kanpıh.htm](http://www.kanbilim.com/kanpıh.htm)

EKLER

EK1

KONTROL

Sıra	Adı soyadı	FVL	PT
1	A.K	G/G	G/G
2	A.E	G/G	G/G
3	A.K	G/G	G/G
4	A.Ö	G/G	G/G
5	A.S	G/G	G/G
6	A.T	G/G	G/A
7	A.C	G/G	G/G
8	A.Ö	G/G	G/G
9	A.Ö	G/G	G/G
10	A.E	G/G	G/G
11	A.B	G/A	G/G
12	A.E	G/G	G/A
13	A.Ö	G/G	G/G
14	B.E	G/G	G/G
15	B.A	G/G	G/G
16	B.A	G/G	G/G
17	A.U	G/A	G/G
18	A.S	G/G	G/G
19	B.C	G/G	G/G
20	B.A	G/G	G/G
21	C.K	G/G	G/G
22	D.G	G/G	G/G
23	E.A	G/G	G/G
24	E.U	G/G	G/A
25	R.G	G/G	G/G
26	Y.K	G/G	G/G
27	Y.E	G/A	G/A
28	A.Ç	G/G	G/G
29	B.D	G/G	G/G
30	D.A	G/A	G/G
31	E.Y	G/G	G/G
32	G.S	G/G	G/G
33	H.B	G/G	G/G
34	T.A	G/G	G/G
35	T.D	G/G	G/G
36	Y.Ç	G/G	G/G
37	Y.A	G/G	G/G
38	Z.Y	G/G	G/G

39	B.G	G/G	G/G
40	B.D	G/G	G/G
41	B.G	G/G	G/A
42	C.K	G/G	G/G
43	C.Y	G/G	G/G
44	Ç.A	G/G	G/G
45	D.A	G/G	G/G
46	D.T	G/G	G/G
47	D.G	G/G	G/G
48	D.A	G/G	G/G
49	D.T	G/G	G/G
50	D.F.A	G/G	G/G
51	D.Ç	G/G	G/G
52	D.G.G	G/G/	G/G
53	D.S	G/G	G/G
54	D.K	G/G	G/G
55	A.A	G/G	G/G
56	B.Ö	G/G	G/G
57	B.K.Y	G/G	G/G
58	C.A	G/G	G/G
59	C.K	G/G	G/A
60	F.D	G/A	G/G
61	F.Ç	G/G	G/G
62	G.Y	G/G	G/G
63	H.G	G/G	G/G
64	H.B	G/G	G/G
65	M.E	G/G	G/G
66	N.A	G/G	G/G
67	O.K	G/G	G/G
68	P.A	G/G	G/G
69	T.U	G/G	G/G
70	T.P	G/G	G/G
71	T.K	G/G	G/G
72	Z.U	G/G	G/G
73	E.K	G/G	G/G
74	Z.M		G/A
75	D.A	G/A	G/G
76	D.Ş	G/G	G/G
77	E.T	G/G	G/G
78	E.B	G/G	G/G
79	E.K	G/G	G/G
80	E.A	G/G	G/G
81	E.K	G/G	G/G
82	E.E	G/G	G/G
83	E.K	G/G	G/G
84	E.Ö	G/G	G/G
85	E.D	G/G	G/G
86	E.G	G/A	G/G

87	E.Y	G/G	G/G
88	E.K	G/G	G/G
89	F.H	G/G	G/G
90	F.A	G/G	G/G
91	F.E	G/A	G/G
92	F.Ö.E	G/G	G/G
93	F.E	G/A	G/G
94	G.Ö	G/G	G/G
95	G.A	G/G	G/G
96	G.Ş	G/G	G/G
97	H.Ö	G/G	G/G
98	H.Y	G/G	G/A
99	H.D	G/G	G/G
100	G.Ş	G/G	G/G
101	H.B	G/A	G/G
102	H.S	G/G	G/G
103	I.H	G/G	G/G
104	I.I	G/G	G/A
105	İ.A	G/G	G/G
106	İ.S	G/G	G/G
107	D.B	G/G	G/G
108	R.A	G/G	G/G
109	K.S	G/G	G/G
110	K.I	G/G	G/G
111	K.Y	G/G	G/G
112	K.Y	G/G	G/G
113	M.C	G/G	G/G
114	M.Ö	G/A	G/G
115	M.D	G/G	G/G
116	M.I	G/G	G/G
117	M.K	G/G	G/G
118	M.Ş	G/G	G/G
119	M.D	G/G	G/G
120	N.I	G/A	G/G
121	N.A	G/G	G/G
122	N.K	G/G	G/G
123	N.P	G/G	G/G
124	N.A	G/G	G/G
125	N.Ş	G/G	G/G
126	Ö.C	G/G	G/G
127	Ö.E	G/A	G/A
128	Ö.T	G/G	G/G
129	Ö.K	G/A	G/G
130	P.Ü	G/G	G/G

Hasta grubu

SIRA	ADI SOYADI	FVL	PT20210
1	N.M.	G/G	G/G
2	A.Z.	G/G	G/G
3	İ.A.	G/A	G/G
4	M.K.	G/G	G/G
5	M.G.	G/G	G/G
6	F.A.	G/G	G/G
7	M.E.	G/G	G/G
8	A.T.	G/G	G/G
9	B.S.	G/A	G/G
10	İ.Ö.	G/G	G/G
11	Y.G.	G/G	G/G
12	A.Ö.	G/G	G/G
13	C.S.	G/G	G/G
14	N.I.	G/G	G/G
15	M.Ö	G/G	G/G
16	Y.Ç.	G/G	G/G
17	K.K.	G/G	G/G
18	İ.Y.	G/G	G/G
19	Z.A.	G/G	G/G
20	C.S	G/G	G/G
21	O.K.	G/A	G/G
22	H.Y.Ö	G/G	G/G
23	M.Ü	G/A	G/G
24	V.Ş.	G/G	G/G
25	A.H.	G/G	G/G
26	A.Y.	G/G	G/G
27	C.Ç.	G/G	G/G
28	Ş.C.	G/A	G/G
29	Y.Ş.		
30	A.B.	G/A	G/G
31	N.B.		
32	M.S.	G/A	G/G
33	A.E.	G/G	G/G
34	Z.V.	G/G	G/G
35	M.İ.Ç.	G/G	G/G
36	V.K.	G/G	G/A

37	B.A.	G/G	G/G
38	A.A.	G/A	G/G
39	M.A.	G/G	G/G
40	A.U.T.	G/G	G/G
41	M.B.	G/G	G/G
42	Y.P.	G/G	G/G
43	A.Y.	G/G	G/G
44	M.T.	G/G	G/G
45	T.Ö.	G/G	G/G
46	F.K.	G/G	G/G
47	M.E.Y.	G/G	G/G
48	V.A.	G/G	G/G
49	N.D.	G/G	G/G
50	E.E.	G/G	G/G
51	A.G.	G/G	G/G
52	M.K.	G/G	G/G
53	B.E.	G/G	G/G
54	M.A.	G/G	G/G
55	M.K.	G/G	G/G
56	Z.B.	G/G	G/G
57	H.E.	G/G	G/A
58	A.İ.	G/G	G/G
59	İ.K.	G/G	G/G
60	L.H.E.	G/G	G/G
61	L.E.	G/G	G/G
62	M.A.	G/G	G/G
63	İ.Ç.	G/G	G/G
64	M.F.	G/G	G/G
65	R.A.	G/G	G/G
66	Z.G.	G/G	G/G
67	S.U.	G/G	G/G
68	F.K.	G/G	G/G
69	A.T.Ö.	G/G	G/G
70	F.K.	G/A	G/G
71	Y.Ş.	G/G	G/G
72	Y.B.	G/G	G/G
73	İ.U.	G/G	G/G
74	İ.Y.	G/G	G/G
75	F.Ö.	G/G	G/G
76	M.S.	G/G	G/A
77	Y.Ç.	G/G	G/G

78	S.G.	G/G	G/G
79	B.B.	G/G	G/G
80	N.K.	G/A	G/G
81	İ.K.	G/G	G/A
82	İ.Y.	G/G	G/G
83	İ.B.	G/G	G/G
84	E.İ.	G/G	G/G
85	M.T.	G/G	G/G
86	M.T.	G/G	G/G
87	S.M.	G/G	G/G
88	F.K.	G/G	G/G
89	İ.G.	G/G	G/G
90	V.G.	G/G	G/G
91	M.K.	G/G	G/G
92	İ.O.	G/G	G/G
93	K.T.	G/G	G/G
94	H.O.	G/G	G/G
95	A.N.	G/G	G/G
96	H.D.	G/G	G/G
97	M.O.	G/G	G/G
98	İ.G.	G/A	G/G
99	G.S.	G/G	G/G
100	D.A.	G/G	G/G
107	M.E.T.	G/A	G/G
108	G.P.	G/G	G/G
110	F.G.	G/G	G/G
111	A.R.E.	G/G	G/G
112	O.H.	G/G	G/G
113	S.U.	G/G	G/G
116	K.K.	G/G	G/G
117	Y.E.	G/G	G/G
118	A.Y.	G/G	G/G
101	H.D.	G/A	G/G
102	M.Ü.	G/G	G/G
103	H.A.	G/G	G/G
104	M.G.	G/G	G/G
105	M.E.	G/A	G/G
106	M.T.	G/G	G/G
109	N.Ç.	G/G	G/G
114	Y.K.	G/G	G/G
115	İ.O.	G/G	G/G

119	N.Y.	G/G	G/G
120	T.A.	G/A	G/G
121	F.Y.	G/G	G/G
122	C.Ç.	G/A	G/G
123	O.Ü.	G/G	G/G
124	Ş.Ç.	G/G	G/G
125	S.K.	G/G	G/G
126	K.G.	G/G	G/G
127	M.L.	G/G	G/G
128	C.C.E.	G/G	G/G
129	D.H.	G/A	G/G
130	S.S.	G/G	G/G
131	A.B.	G/G	G/G
132	A.A.	G/G	G/G

EK 2

Deneylerde kullanılan cihazlar ve programlar

Cihazın adı/modeli	Markası	Kullanım amacı
Protean IEF Cell	Bio-Rad	2 boyutlu jel elektroforezinde birinci boyutu oluşturan izoelektrik odaklama işlemi için
Protean Plus Dodeca Cell	Bio-Rad	İki boyutlu jel elektroforezinde 2. boyutu oluşturan moleküler ağırlığa göre ayırımın gerçekleştirilmesi için
Elektroforez güç kaynağı (PowerPac 1000)	Bio-Rad	Elektroforetik sistemlerde güç kaynağı olarak
Sirkülatörlü su banyosu		Elektroforez sistemlerinde soğutucu olarak
MALDI-TOF kütle spektrometresi (Micromass M@LDI)	Waters	2 Boyutlu jel elektroforezi sonrası elde edilecek protein kümelerinin jelden kesilip jel içinde peptitlere sindiriminden sonra protein tanımlaması yapmak amacıyla m/z değerlerini elde etmek
Mikroplaka okuyucu (SpectraMax)	Molecular Devices	Protein miktar tayini için
VersaDoc jel görüntüleme sistemi	Bio-Rad	Jellerin görüntülenmesi ve fotoğraflarının çekilmesi için
Proteome Works Spot Cutter	Bio-Rad	Kütle spektrometresi analizleri için jellerden proteinlerin geri kazanımı için
Soğutmalı santrifüj	Sigma	Örnek hazırlanmasında kullanılacaktır
Hassas tartı	Schimadzu	Örnek ve kimyasal hazırlanmasında
-30 C derin dondurucu	Sanyo	Deneylerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit, şerit ve örneklerin saklanması için
-80 C derin dondurucu	Sanyo	Deneylerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit ve örneklerin saklanması için
+4 C buzdolabı	Sanyo	Deneylerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit ve örneklerin saklanması için
Otomatik pipet seti	Gilson	Örnek hazırlanması ve reaksiyonların kurulmasında gerekli olan pipetlemelerin yapılması için
Otomatik elektronik çok kanallı pipet seti	Gilson	Tripsinizasyon işleminde
Saf su sistemi	Millipore	Moleküler analizlerde kullanılan solüsyonları hazırlamak üzere kullanılacak ultra saf suyun elde edilmesi için

Manyetik karıştırıcı	Cimarec	Deneylerde kullanılacak tamponların ve çeşitli çözeltilerin hazırlanmasında
Ultrasonik su banyosu	Elma	MALDI-TOF plakalarının yıkanmasında, MALDI-TOF ölçümleri için matriks hazırlanmasında ve analizlerde kullanılacak bazı solüsyonların hazırlanmasında
Çalkalayıcı	Finepcr	Jellerin boyanması aşamasında
SoftMax	Molecular Devices	Protein miktar tayininde kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için
PDQuest 8.0.1	Bio-Rad	Jel fotoğraflarının çekimi ve ifade analizlerinin yapılmasında

EK 3

Deneylerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler

Kimyasal	Firma	Katalog No
Agar	Sigma	
Akrilamid	Biorad	161-0141
Amonyum persülfat	Biorad	161-0700
Amonyum bikarbonat	Sigma	A6141
Asetik asit	Riedel-de haen	27225
Asetonitril	Sigma	34998
Boyasız marker	Biolabs	P7703S
BSA	Sigma	A-9647
DTT	Biorad	161-0611
EDTA	Sigma	E9884
Etanol	Sigma	34870
Formik asit	Riedel-de Haen	27001
Glisin	Applichem	4-1067
İyodoasetamid	Biorad	163-2109
Metanol	Sigma	34885
Mineral oil	Biorad	163-2129
Sodyum dodesil sülfat	Biorad	161-0302
Sypro ruby	Biorad	170-3138
TEMED	Biorad	161-0801
TFA	Pierce	28904
Tiyoüre	Sigma	7875
Tripsin	Progema	V511A
Trisma-Base	Sigma	T6066
Üre	Biorad	161-0731

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Afsar ABBASİ TAGHİDİZAJ
Doğum Yeri : ERDEBİL
Doğum Tarihi : 02.10.1977
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce, Azeri Türkçesi, Farsca

Eğitim Durumu(Kurum ve Yıl)

Lise : Farabi Lisesi; 1996
Lisans : Urumiye Üniversitesi Veterinerlik laboratuvar bilimleri ;
2001
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü
Başlama Tarihi: Kasim 2007

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez laboratuvarı;
Yüksek Lisans Öğrencisi, 2007-2010