

**T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PLAZMİNOJENAKTİVATÖR İNHİBİTOR-1(PAI-1) 4G/5G GEN
DEĞİŞİMİNİN UZUN YAŞAMA ETKİSİ**

Z.Gülin GÜLBAHAR

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Nejat AKAR**

2010-ANKARA

KABUL ONAY

Prof.Dr.Nejat AKAR danışmanlığında Z.Gülin Gülbahar tarafından hazırlanan bu çalışma .06.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Nejat AKAR

imza :

Üye : Prof. Dr. Zümrüt UYSAL

imza :

Üye : Prof. Dr. Muhit ÖZCAN

imza :

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Son yıllarda uzun yaşam genleriyle ilgili çalışmalar, “hasara karşı gelişen cevap” teorisinin de ortaya konulmasıyla farklı bir boyut kazanmıştır. Hasar yaratabilecek oluşumlardan bu teoride yer alanlardan en önemlisi metabolik olaylardır. Teoriye göre meydana gelen hasarlarla oluşan birikime karşı yanıt oluşumu gerçekleşmektedir. Bu mekanizmada genetik kontrolü sağlayan genlere “uzun yaşam genleri” denilmektedir. Tromboz multifaktöriyel nitelikte bir hastalıktır. Faktör V molekülünde 1691 nükleotid pozisyon mutasyonun tromboz oluşumunda en çok etkisi olduğu düşünülse de tromboz oluşumunda birçok kalıtsal etki birlikte rol oynar. Daha önce yapılan çalışmalar ışığında tromboz hastalarında artan plazminojen aktivator inhibitörü-1 (PAI-1) seviyeleri sonucu fibrinolitik aktivitenin azaldığı belirtilmiştir. PAI-1 artan plazma seviyesi ise genin promoter bölgesinin transkripsiyon başlama sekansından 675 baz çifti yukarıda görülen 4G/5G insersiyon/delesyon polimorfizmiyle ilişkilendirilmiştir. Bu bağlamda çalışmanın amacı, PAI-1 675 4G/5G insersiyon/delesyon gen değişiminin tek başına ve FVL mutasyonu ile birlikte uzun yaşam açısından etkisinin araştırılması olarak belirlenmiştir.

Tromboz tanısı olan bireyler ve olmayan sağlıklı bireyler, 0-18 ve 70 yaş üstü olmak üzere çalışma gruplarını oluşturmaktadır. Bireylerden alınan kan örneklerinden Fenol-Kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. PAI-1 4G/5G gen değişimi için F:5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3' ve R:5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3' primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılarak PAI-1 promotör bölgesinin çoğaltılması sağlanmıştır. Elde edilen 98/99 bç'lik PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde yürütülerek Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılan bölge kontrol edilmiştir. İlgili gen değişimini saptamak için BseLI restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim yapılmıştır. %7'lik Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile bant farklılıkları saptanarak gen değişimleri tespit edilmiştir.

Plazminojen aktivator inhibitör 4G/5G gen değişimi açısından 70 yaş üstü hasta ve sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında, 4G alelinin heterozigot olarak bulunması durumunda koruyucu faktör rolü olduğu bulunmuştur (OR:0.45, p:0.003). 4G alelinin homozigot olarak bulunduğu durumda yine 70 yaş ve üstü grupta koruyucu faktör olarak belirlenmiştir (OR: 0.50, p: 0.03). 5G aleli homozigotluğunda ise 1.98 risk faktörü ve 0.03 p-değeri ile 70 yaş ve üstü grupta hastalık için risk faktörü olarak tespit edilmiştir. FVL mutasyonu açısından 70 yaş üstü grupta PAI-1 4G/5G gen değişimine bakıldığında, 4G aleli heterozigotluğunun ve homozigotluğunun yine koruyucu faktör rolü üstlendiği bulunmuştur (p:0.004 OR:0.44, p:0.03 OR:0.48).

Artan plazma PAI-1 aktivitesinin kalp spazmı, diyabet ve miyokard infarktından kurtulan bireylerde azalmış fibrinolitik aktiviteden büyük ölçüde sorumlu olduğu gözlenmiştir. 4G/5G polimorfizmi PAI-1 geninin transkripsiyonel aktivasyonundaki değişimler ile ilişkilendirilmektedir. PAI-1 genindeki 4G motifinin varlığı 5G motifinin varlığından daha fazla transkripsiyonel aktiviteye neden olduğu belirlenmiş ve bu deneysel sonuçlarla paralel olarak 4G allelinin homozigot durumda olması plazma PAI-1 protein seviyeleri ve aktiviteleri bakımından 5G allele göre daha yüksek olduğu sonucunu doğurmuştur. Bazı çalışmalar, 4G allelinin yüksek PAI-1 seviyeleriyle ilişkilendirilmesini trombotik risk artışının bir habercisi olduğunu öne sürmüşlerdir. PAI-1 4G/5G polimorfizminin yukarıda sayılan ölümcül hastalıkların patogenezinde rol oynayabileceği düşünüldüğünden, bireylerin uzun yaşamasının da bu gen değişiminden etkilenebileceği düşünülebilir. Daha önce bölümümüzde yapılan tez çalışmasında FVL mutasyonunun doğumdan itibaren tromboz açısından risk faktörü olduğu ve morbiditeye etkisi olduğu gösterilmişti. Bu nedenle FVL mutasyonunun yaşam süresini kısaltması beklenmektedir. Ancak, elimizdeki DNA örneklerine bakıldığında bazı bireylerin FVL taşımalarına rağmen uzun yaşamakta oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarından hipotezlenen FVL ile PAI-1 4G/5G arasındaki ilişkiyi yola çıkarak, 0-18 ve 70 yaş üstü bireyler çalışmaya dâhil edilmiş ve 4G allelinin yaşlı grupta koruma rolü, 5G allelinin ise hastalık için risk faktörü rolü olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Tromboz, PAI-1 4G/5G ins/del, FV1691 G-A, Uzun Yaşam Genleri

ABSTRACT

Studies related to longevity genes gained a new perspective with the “damage due to response” theory in recent years. The most important of these in the theory formation are metabolic events. According to the theory, accumulation of damage process formed response. Genes that ensure genetic control in these mechanisms are called “longevity genes”. Thrombosis is a disease that has a multifactorial nature. Although it is thought that Factor V 1691 mutation has the leading effect for thrombosis, there are many other genetic effects play role together. Previous studies indicate that the increased plasminogen activator inhibitor-1 levels in thrombosis patients, fibrinolytic activity is decreased. The increased PAI-1 plasma level is related with the 4G/5G insertion/deletion polymorphism that found 675 upstream of the transkription start sequence in the promoter region. In this content, the aim of this study is to search the effect of PAI-1 675 4G/5G insertion/deletion alone and in combination with FVL on longevity.

The healthy and patient subjects were divided into mainly two groups, i.e. 1 to 18 years and 70 and older. Each group was also divided into two as thrombotic and non-thrombotic. Peripheral venous blood samples were collected and phenol- chloroform method was used to extract DNA. Analysis of PAI-1 4G/5G polymorphism was carried out by PCR with the forward 5’CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT3’and reverse 5’CCAACAGAGGACTCTTGGTCT3’ primers. The amplified 98/99 bp PCR products were controlled by running them on 3% agarose gel. BseLI restriction endonuclease enzyme used to detect 4G/5G polymorphism. band profiles were seen in the 7% polyacrylamide gel electrophoresis to detect gene variations.

For the PAI-1 4G/5G gene variation, when 70 and older patients compared to healthy group 4G allele heterozygosity is found to have has a protective role(OR:0.45, p:0.003). Homozygosity for 4G allele seen as also a protective factor for 70 and older patients groups(OR:0.50, p:0.03). Moreover 5G allele homozygosity is a risk factor for the disease with 1.98 odds ratio and 0.03 p-value . PAI-1 4G/5G gene variation in combination with FVL mutation also have protective role for 70 and older in case of 4G heterozygosity and homozygosity(p:0.004 OR:0.44, p:0.03 OR:0.48).

It is observed that increased plasma PAI-1 activity responsible for decreased fibrinolytic activity for the individuals that escape from angina pectoris, diabetes, myocardial infarction. 4G/5G polymorphism is related to transcriptional activation changes in the PAI-1 gene. PAI-1 gene 4G motif is determined to has more transcriptional activity than 5G motif and in correspondence with the experimental results 4G allele homozygosity cause increased PAI-1 protein levels and activity than 5G allele. Some studies suggested that 4G allele that relates with increased PAI-1 levels is a sign of increasing thrombotic risks. As PAI-1 4G/5G poymorphism is thought to play a role in pathogenesis of the mentioned fatal diseases, it is considered that the survival of individuals can be

affected by this gene variation. In the previous thesis study was done in our department, FVL mutation shown to be a risk factor for thrombosis after birth and have effects on morbidity. Therefore, FVL mutation are expected to shorten the life span. However, examined our DNA samples showed although some individuals carry FVL mutation, they were identified as long-lived. The contribution of the study hypothesis that FVL and PAI-1 4G/5G has a relation and by this relation 0-18 and 70 and over individuals been included in the study, as a result it is determined that, 4G allele found to have a protective role for the elderly group whereas 5G allele is a risk factor for the disease.

Key words: Thrombosis, PAI-1 4G/5G ins/del, FV1691 G-A, Longevity Genes

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince benden engin bilgisini ve desteğini, esirgemeyen, sonsuz imkanlar sunan bundan sonraki çalışma hayatım boyunca da bilgi, destek ve yardımına her zaman ihtiyaç duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR'a,

Güzel güler yüzü ve samimiyeti ile ilgi ve sevgisini her zaman bana hissettiren, yardımlarını esirgemeyen Uzm. Bio. Ece AKAR'a;

Tez dönemim sırasında bilgi ve önerileriyle her zaman yardımcı olan Bio. Dr. Erkan YILMAZ'a,

Çalışmalarım sırasında ilgisini ve tecrübelerini esirgemeyen Uzm.Bio Yonca EĞİN'e, Çalışmalarım boyunca motive edici yardımlarıyla yanımda olan Bio. Dr. Ayşenur ÖZTURK'e;

İlk günümünden beri yanımda olup, laboratuvarımızın değerli DNAlarının kaynağı olan Bio. Emel USLU'ya,

Ders dönemi ve tez dönemimin büyük zamanını yanında geçirdiğim, bilimsel çalışmalarda yorumlarını hiç esirgemeyen, yüksek lisans günlerimde en güzel ve en zor anlarımı benle paylaşan Bio.Sezen BALLI'ya,

Tez dönemim boyunca ortaya çıkan olumsuzluklarda çözüm üretmeye çalışan çalışma arkadaşlarım Uzman Bio. Didem TORUN, Uzman Bio. Afife Karabıyık'a, tez çalışmalarım sırasında desteklerini hep yanımda hissettiren ve hayatın keyifli anlarını paylaştığım Uzman Bio. Hamit Emre KIZIL'a, Tek. Çiğdem ARSLAN, Tek. Kadir SİPAHİ , Uzman Bio. Özge CUMAĞULLARI, Bio.Fatma Dilara Akın'a, Uzman Bio.S.Duygu Sanlıdilek'e, Uzman Bio. Duygu Duman, Bio.Dr. Filiz Başak CENGİZ'e, Bio.Arjan ESMAEL'e,

Her sabah beni gülümseyen günaydınlarla karşılayan Nurgül ŞEDİT, Hatice GÜÇLÜ, Dilek ÇETİN ve Gülsen ŞEKER'e

Kısacası tüm Pediatrik Moleküler Genetik Ailesine çok teşekkür ederim.

Benden desteğini, sevgisini ve ilgisini eksik etmeyen Prof.Dr Gönül OĞUR'a

Hayatım boyunca bana sonuna kadar güvenen, maddi ve özellikle manevi olarak bana destek olduklarını her zaman hissettiğim, emeklerini asla ödeyemeceğim canımdan çok sevdiğim aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Z.Gülin Gülbahar

Ankara, Haziran 2010

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
DİZİLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Değişen Yaşam Süreleri ve Ölüm Nedeni Olan Hastalıklar	3
2.2. Uzun Yaşam Genleri	4
2.3 Dünya da ve Türkiye’de Doğuşta Beklenen Yaşam Süreleri	6
2.4. Hemostaz	8
2.5. Pıhtılaşma Mekanizması	9
2.6. Fibrinolizis	10
2.7. Protein C Sistemi	11
2.8. Faktör V 1691 ve Tromboz	12
2.8.1. Antitrombin III Eksikliği	12
2.8.2. Protein C Eksikliği	13
2.8.3. Protein S Eksikliği	13
2.8.4. Aktive Protein C Direnci	13
2.8.5. Protrombin 20210A Mutasyonu	14
2.9. Plazminojen Aktivasyon Sistem	14
2.9.1. Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1’in Yapı ve Fonksiyon İlişkileri	16
2.10. Moleküler Teknikler	17
2.10.1. Çözeltiler ve Solüsyonlar	17
2.10.2. DNA Ekstraksiyonu	18
2.10.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR)	18
2.10.4. Restriksiyon Endonükleaz (RE) ile Muamele	19
2.10.5. “Site Directed Mutagenesis” ile PCR	19

3. METARYAL ve YÖNTEM	20
3.1. Yöntemler	20
3.1.1. DNA İzolasyonu	20
3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	21
3.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi	22
3.1.4.1. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzim ile Muamelesi.....	22
3.1.4.2. PAI-1 -675 4G/5G Gen Değişiminin BseL1 Enzimi ile İncelenmesi.....	23
3.1.4.3. Poliakrilamid Jel Hazırlanması.....	23
3.1.4.3.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	24
3.1.4.3.2. PAGE Jeli için Gümüş Boyama	24
3.1.4.4. İstatistiksel Analiz.....	24
4.ARAŞTIRMA BULGULARI	25
4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları	25
4.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi(PAGE) Bulguları.....	26
4.3. İstatistiksel Analiz Bulguları.....	27
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Dünya çapında doğuşta beklenen yaşam süreleri	6
Şekil 2.2.	Hemostaz Dengesi	8
Şekil 2.3.	Pıhtılaşma mekanizmasını oluşturan ekstresek, intrinsek ve ortak yol ile fibrinolizis yolu.....	9
Şekil 2.4	Fibrinolizis Mekanizması.....	11
Şekil 2.5.	PAI-1 gen lokalizasyonu	16
Şekil 2.6.	PAI-1 gen polimorfizmleri.....	16
Şekil 2.7.	4G ve 5G motiflerinin PAI-1 transkripsiyonuna etki mekanizması.....	17
Şekil 4.1.	PAI-1 promotor bölgesi 98/99bç'lik PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü, M(Markır).	25
Şekil 4.2.	PAI-1 PCR ürünlerinin BseL1 restriksiyon enzimiyle gerçekleştirilen RFLP sonrası PAGE de görüntüsü, M(markır),örnek 2,4,5,6,10,11,12,14 heterozigot;1,8,9 5G homozigot; 3,7,13, 4G homozigot ..	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Dünyadaki ilk on ölüm nedeni.....	3
Çizelge 2.2.	Türkiye’de ilk on ölüm nedeni.....	4
Çizelge 2.3.	Türkiye için doğuştan beklenen yaşam süreleri.....	7
Çizelge 4.1.	PAI-1 4G/5G gen değişiminin 0-18 yaş ve 70 yaş ve üstü gruplar için genotip dağılımı	27
Çizelge 4.2.	PAI-1 4G/5G gen değişiminin 0-18 yaş grubunda değerlendirilmesi.....	28
Çizelge 4.3.	PAI-1 4G/4G gen değişiminin 70 yaş ve üstü grubunda değerlendirilmesi.....	29
Çizelge 4.4.	PAI-1 4G/5G gen değişiminin 0-18 yaş grubunda değerlendirilmesi	29
Çizelge 4.5.	PAI-1 4G/4G gen değişiminin 70 yaş ve üstü grubunda değerlendirilmesi.....	30
Çizelge 4.6.	0-18 yaş kontrol ve hasta grubunda 4G ve 5G alelleri için frekans dağılımları.	30
Çizelge 4.7.	70 yaş ve üstü kontrol ve hasta grubunda 4G ve 5G alelleri için frekans dağılımları	31
Çizelge 4.8.	FV 1691 G-A ve PAI-1 -675 4G/5G gen değişimleri birlikteliğinin 0-18 yaş kontrol ve hasta gruplarındaki risk değerlendirmesi.....	32
Çizelge 4.9.	FV 1691 G-A ve PAI-1 -675 4G/5G gen değişimleri birlikteliğinin 70 yaş ve üstü kontrol ve hasta gruplarındaki risk değerlendirmesi.....	33
Çizelge 4.10.	FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A gen değişimlerinin görülmediği 0-18 yaş bireyler için PAI-1 4G/5G gen değişiminin kontrol ve hasta gruplarındaki korelasyonu	34
Çizelge 4.11.	FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A gen değişimlerinin görülmediği 70 yaş ve üstü bireyler için PAI-1 4G/5G gen değişiminin kontrol ve hasta gruplarındaki korelasyonu	35
Çizelge 4.12.	FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A gen değişimlerinin görülmediği 0-18 yaş bireyler için alel frekans dağılımları	36
Çizelge 4.13.	FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A gen değişimlerinin görülmediği 70 yaş ve üstü bireyler için alel frekans dağılımları	36

DİZİLERİN LİSTESİ

Dizi 3.1. PCR ile amplifiye edilen PAI-1 -675 4G/5G gen değişimi olan bölge26

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Mm	Mikromolar
A	Adenin
APC	Aktif Protein C
Arg	Arjinin
Asp	Aspartat
Bç	Baz çifti
C	Sitozin
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
ddH ₂ O	Deiyonize Su
del	Delesyon
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
DVT	Derin ven trombozu
FI	Fibrinojen
FII	Protrombin
FIII	Tromboplastin
FIV	Kalsiyum
FV	Proakselerin
FVII	Faktör VII
FVIIa	Aktif Faktör VII
FVIII	Faktör VIII, Antihemofilik Faktör
FVIIIa	Aktif Faktör VIII
FIX	Faktör IX
FIXa	Aktif Faktör IX
FX	Faktör X
Fxa	Aktif Faktör X
FXI	Plazma tromboplastin komponenti
FXII	Hageman Faktör
FXIII	Fibrin stabilize edici faktör
G	Gram
G	Guanin
İns	İnsersiyon
kDa	Kilo dalton
kb	Kilobaz
K ⁺	Potasyum
MgCl ₂	Magnezyum klorür
M	Molar
mM	Milimolar
ml	Mililitre
mg	Miligram
NaOH	Sodyum Hidroksit

Ng	Nanogram
p	Kromozomun kısa kolu
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pmol	Pikomol
q	Kromozomun uzun kolu
RE	Restriksiyon Endonükleaz
RFLP	Restriksiyon Fragment Length Polimorfizmi
S	Saniye
Ser	Serin
TE	Tris EDTA
TBE	Tris, Borik asit, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
TF	Doku Faktörü
T	Timin

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda artan insan yaşam süresi ve yaşlı birey sayısı ile buna bağlı olarak yaşla ilişkili hastalık artışı, yaşlanma ve uzun yaşamda rol oynayan faktörlerin araştırılmasını geliştirmektedir. İnsanoğlunun ölmeye önce ulaştığı yaş bireyden bireye farklılık göstermektedir. Ölüm yaşı, çevresel faktörler tarafından belirlendiği kadar genetik faktörlerden de etkilenmektedir. Gelişmiş ülkelerde yaşam süresindeki değişikliğin yaklaşık olarak dörtte birinin genetik faktörlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Herskind et al. 1996). Dünyadaki ölüm nedenlerine bakıldığında, kardiyovasküler hastalıklar (KVH) ilk sıralarda yer almaktadır. Buna rağmen bazı bireyler veya topluluklar kardiyovasküler hastalıklara yakalanmadan uzun yıllar yaşayabilmektedirler. Hem çevresel hem de genetik faktörler birlikte kardiyovasküler hastalıklar için risk oluşturduklarından, kardiyovasküler hastalıklarda risk azaltan genlerdeki genetik varyasyonların uzun yaşama katkıda bulunduğu öne sürülebilir (Bladbjerg et al.1999).

Hemostaz ve kan basıncı regülasyonunda görev alan genlerdeki varyasyonlar tromboz veya kanamaya götüren önemli faktörlerdir. Pıhtılaşmada rol oynayan faktörlerde görülen hasarlar trombus oluşturmada büyük etkindir. Trombozun en sık rastlanan kalıtsal risk faktörlerinden biri Faktör V 1691 G-A (FVL) mutasyonudur. Fakat FV 1691 mutasyonu taşıyan bireylerde tromboz tanısı konulsada bu kişilerin 70'li yaşlara ve sonrasında yaşamlarını sürdürdükleri tespit edilmiştir.

Tromboz multifaktoriyel ve multigenik bir hastalıktır. Alman bilimadamı Virchow'un 1856 yılında öne sürdüğü Triadına göre trombozu oluşturan üç etmen vardır. Damar duvarında hasar oluşumu, damar içinde kan akımındaki değişiklikler (staz) ve kan bileşenlerini oluşturan maddelerdeki değişimler (hiperkoagülabilite) tromboza sebep olan en önemli nedenlerdendir.

Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) seviyesindeki artış, fibrinolitik aktivitenin artışına neden olmaktadır. PAI-1 düzeyindeki artışın bu genin promotor bölgesinde -675'de yer alan 4G/5G (Ins/Del) polimorfizmine neden olan 4G aleli ile

ilişkilendirilmiştir. 4G/5G polimorfizminin daha önceki birçok araştırmada tromboz için bir risk faktörü olduğu öne sürülmüştür.

FVL ve PAI-1 4G/5G arasında bir ilişki olduğu göz önünde bulundurulursa, bazı kişiler de PAI-1 4G/5G polimorfizminin trombozdan koruyucu etkisi olabileceği düşünülebilir. Bu çalışmadaki amacımız, tromboz tanısı alan ve sağlıklı olan bireylerden oluşan gruplar kullanılarak PAI-1 4G/5G gen değişiminin uzun yaşam açısından etkisinin araştırılmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Değişen Yaşam Süreleri ve Ölüm Nedeni Olan Hastalıklar

Bir canlının ortalama olarak ne kadar yıl yaşayacağını hesaplayan istatistiki ölçüte “ beklenen yaşam süresi” denilmektedir. Farklı cinsiyet ve bölgeler için ayrı ayrı hesaplanan yaşam süresi her yaş için hesaplanabilir ve bir bireyin ölümüne kadar kalan yaşam süresi saptanabilir.

Farklı coğrafyalarda insanların ortalama yaşam süreleri farklılık gösterebilmektedir. Japonya’da 81 yıl olan yaşam süresi, Svaziland’da 39.9 yıl olarak hesaplanmıştır. Dünyanın en uzun yaşam süresine sahip olan ülkesi ise 83.5 yıl ile Andorra’dır.

Fiziksel olarak yaşlanma kan koagülasyon sistemindeki artan birçok proteinle, trombüsde görülen değişikliklerle ve fibrinolizis sırasındaki bozukluklarla ilişkilendirilir. Dünya Sağlık Örgütünün 2008 verilerine göre, dünya genelinde ölüme neden olan hastalıkların başında %12,2 ile koroner kalp hastalıklarını ve %9.7 ile inme ve diğer serebrovasküler hastalıkları ise ikinci sırada yer aldığını görmekteyiz.

Çizelge 2.1. Dünyadaki ilk on ölüm nedeni (Dünya Sağlık Örgütü,2008)

DÜNYA	ÖLÜM (MİLYON)	ÖLÜM (%)
KORONER KALP HASTALIKLARI	7.20	12.2
İNME VE DİĞER SEREBROVASKÜLER HASTALIKLAR	5.71	9.7
ALT SOLUNUM YOLU ENFEKSİYONLARI	4.18	7.1
KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALIĞI	3.02	5.1
İSHALLE İLGİLİ HASTALIKLAR	2.16	3.7
HIV/AIDS	2.04	3.5
TÜBERKÜLOZ	1.46	2.5
SOLUNUM YOLU KANSERLERİ	1.32	2.3
TRAFİK KAZALARI	1.27	2.2
PREMATÜRE VE DÜŞÜK AĞIRLIKTA DOĞUM	1.18	2.0

Türkiye'ye baktığımızda ölüm nedenlerinin ilk sırasında yine aynı şekilde kalp rahatsızlıklarının yer aldığını görmekteyiz. İkinci sırada da yine serebrovasküler hastalıklar yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Türkiye'de ilk on ölüm nedeni (Dünya Sağlık Örgütü,2008)

NEDENLER	ÖLÜM (%)
İskemik Kalp Hastalıkları	24
Serebrovasküler Hastalıklar	14
Perinatal Durumlar	5
Kronik Obstrüktif Akciğer hastalığı	4
Alt Solunum Yolu Enfeksiyonları	3
Hipertansif Kalp Hastalığı	3
Solunum Sistemi kanserleri	2
Menenjit	2
İshalle ilgili hastalıklar	2
Kalıtsal Anomaliler	2

2.2 Uzun Yaşam Genleri

Uzun yaşam insanlığın her zaman için bir arzusu olmuştur. M.Ö 221 yılında Çin Seddi'nin yapımını sağlayan Çin imparatoru Qin Shi Huang, yaşam iksirini çaresizce araştırmış fakat ölümsüzlüğü elde edemediğini anlayınca da çareyi kendisi için görkemli bir anıt mezarı yaptırmakta bulmuştu. 21.yüzyıla gelindiğinde, yaşlanmanın ve yaşlanmayla ilgili hastalıkların temel mekanizmalarını etkileyen genetik faktörlerin bulunması sonucu uzun yaşamı muhtemel kılan genomik araştırmalara yönelinmiştir.

Uzun yaşam, basit olarak uzun süre yaşama özelliği ya da türlere özgü maksimum hayat süresi olarak tanımlanabilir. Bir türün maksimum yaşam süresi, o türde görülen en büyük ölüm yaşına eşittir. Beklenen yaşam süresinin aksine (ortalama ölüm yaşı), maksimum ömür çevresel faktörlerden çok fazla etkilenmez.

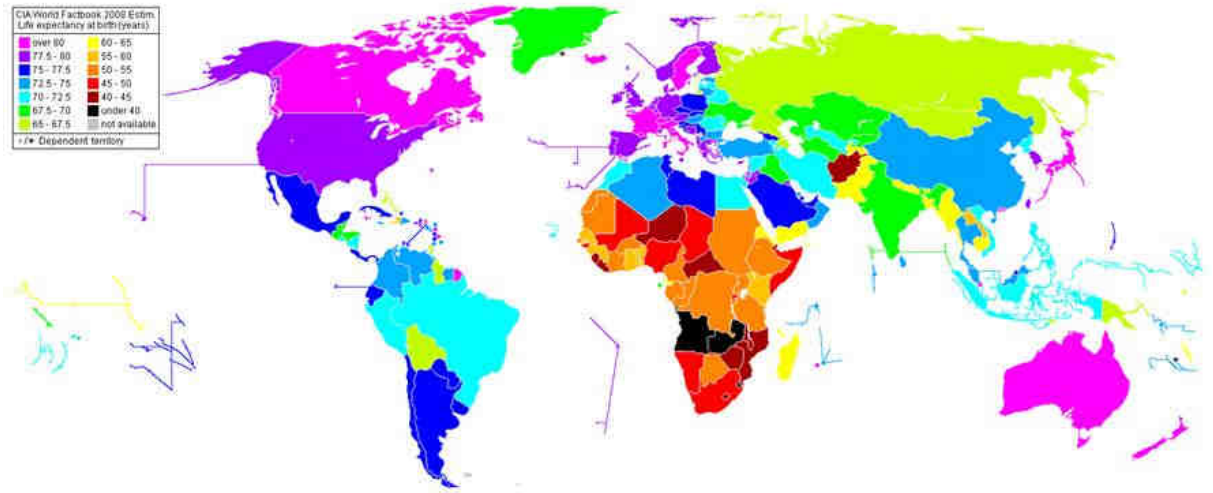
Türler arasındaki yaşam süresinin çok farklı olması, genetik faktörlerin bir organizmanın geç yaşa ulaşma potansiyelini belirlemesinden kaynaklanmaktadır. Nitekim, birçok canlı türünde bulunan birden fazla lokusun genetik bir özellik olarak uzun yaşamı etkilediği gösterilmiştir. Doğal ve değişmez yoldan uzun yaşamı kısıtlayan tek mekanizmaya, genetik olarak ulaşmanın genellikle çok daha zor olduğu kanıtlanmıştır. Uzun yaşamı kısıtlayan kazalar, afetler ve vahşet gibi bir çok durum arasında, yaşlanma hayatı kısıtlayan tek biyolojik süreç olarak görülmektedir (Vijg et al. 2005).

Yaşlanmanın evrimsel mantığı ile uygun olarak, uzun ömür ve yaşlanma oranları üremeye yapılan ve bedensel korunuma yapılan yatırımlar arasındaki dengeyle belirlenmelidir (Kirkwood et al.1977). Bu “kullan at vücut” teorisi, yaşlanmanın somatik bakım sistemlerinin yavaşlatılmasından kaynaklanabilecek somatik hasar birikimi sonucu ortaya çıkabileceğini öne sürmektedir. Antioksidan savunması ve DNA onarım sistemleri buna bir örnek teşkil edebilir. Bu durum somatik hücrelerin korunumu ve tamiri sonucu sadece uzun ömrü teşvik etmek üzere genlerin var olduğunu önermektedir. Yaşlanma genlerine karşın, “uzun yaşam genleri” gelişim ve olgunlaşmada direk rolleri olmaksızın organizmanın hayatta kalmasını sağlamaktadırlar. Pleotropik yaşlanma genlerini inaktive eden mutasyonlara tezat olarak, uzun yaşam genlerinin fonksiyonlarını önleyen mutasyonlar ömür süresini kısıtırken, yaşlanma fenotiplerinin ortaya çıkmasını da hızlandırmaktadır (Libina et al.2003). Ancak, uzun yaşam yollarının fonksiyonlarını etkileyen polimorfik değişimlerin etkisinin sadece geç yaşta görülebildiği düşünülmektedir. Buna ek olarak, antagonistik pleotropinin uzun yaşam genleri üzerinde etkili olduğu öne sürülebilir. Genomik bakım sistemi tarafından sağlanan aktif apoptoz sinyali erken yaşta avantaj sağlayabilir. Örnek olarak kanseri önlemek, ileri yaşlarda hızlanmış yaşlılık semptomları doğurabilir (Sampayo et al.2003).

Fonksiyonel genomiks alanında görülen ilerlemeler, uzun yaşam ve yaşlanmanın genetik bileşeninin aydınlatılmasını sağlayacaktır. Bu sayede genlerin belirlenmesi artık

sadece aile ağacı analizleri ile sınırlı kalmayacaktır. Binlerce vaka-kontrol çalışmalarına olanak sağlayacak şekilde genotipleme teknoloji çok büyük ilerleme kaydetmiştir. Uzun yaşam birleşeni tek başına çok önemli olmasına rağmen, yaşlanma olgusunu kapsayan farklı birey fenotiplerinin genetiğinin ortaya çıkarılması çok daha ilgi çekici olacaktır. Bu yüzden bir popülasyondaki bireylerin orta yaştan geç yaşa kadar yaşlanma fenotiplerinin ortaya çıkarılması önemlidir. Bu tarz çalışmalar bir hastalık gelişiminde anlık bir görüntüden çok hastalığın bütün basamaklarının tam olarak görüntülenmesini sağlar. Uzun yaşam ve yaşlanmayı kontrol eden genlerin araştırılmasındaki esas nokta ise popülasyon kaynaklarını seferber ederek günümüzdeki araştırma olanaklardan faydalanmaktır (Vijg et al. 2005).

2.3. Dünya’da ve Türkiye’de Doğuşta Beklenen Yaşam Süreleri



Şekil 2.1. Dünya çapında doğuşta beklenen yaşam süreleri (CIA,The World Factbook,2008)

Son yüzyıl boyunca batı toplumlardaki ortalama yaşam sürelerinin önemli derecede artmakta olduğu görülmüştür (Oeppen et al. 2002). Örneğin Japonya’da son altmış yıl içinde beklenen ortalama yaşam süresi 50’den 80’e yükselmiştir. Yaşam süresinde görülen bu artışın nedenini, bu süre içerisinde popülasyon genomunda değişikliklerle açıklamaktansa çevresel faktörler ve tıbbi bakım koşullarının geliştirilmesiyle açıklamak daha olasıdır. Fakat toplam popülasyondaki beklenen yaşam süresinin artışı, bireyler arasındaki yaşam süresi farklılığını değiştirilmemiş olarak göstermektedir. Bunu sosyo-

ekonomik faktörler açıklayabileceği gibi, genetik faktörlerin büyük ölçüde rol oynadığı da bilinmektedir. İkizler ve uzun ömürlü ailelerde yapılan çalışmalar sonucunda yaşam sürelerindeki %20–30 farklılığın genetik faktörlerle belirlendiğini ve bunun ilerki yaşlarda hayatta kalmada önemli bir etkisi olduğu öne sürülmüştür (Herskind et al.1996; Mitchell et al 2001; Hjelmberg et al.2006). Buna ek olarak, yüz yaşlarına kadar yaşamış olan bireylerin kardeşlerinin aynı yaşlara kadar ömürlerini sürdürme şanslarının, aynı zamanda doğmuş diğer bireylere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Perls et al.2002).

Türkiye’de 1935–40 yılları arasında 35.43 olan yaşam süresi Türk İstatistik Kurumunun 2008 yılı verileri itibarıyla 71.8 olması beklenmektedir.

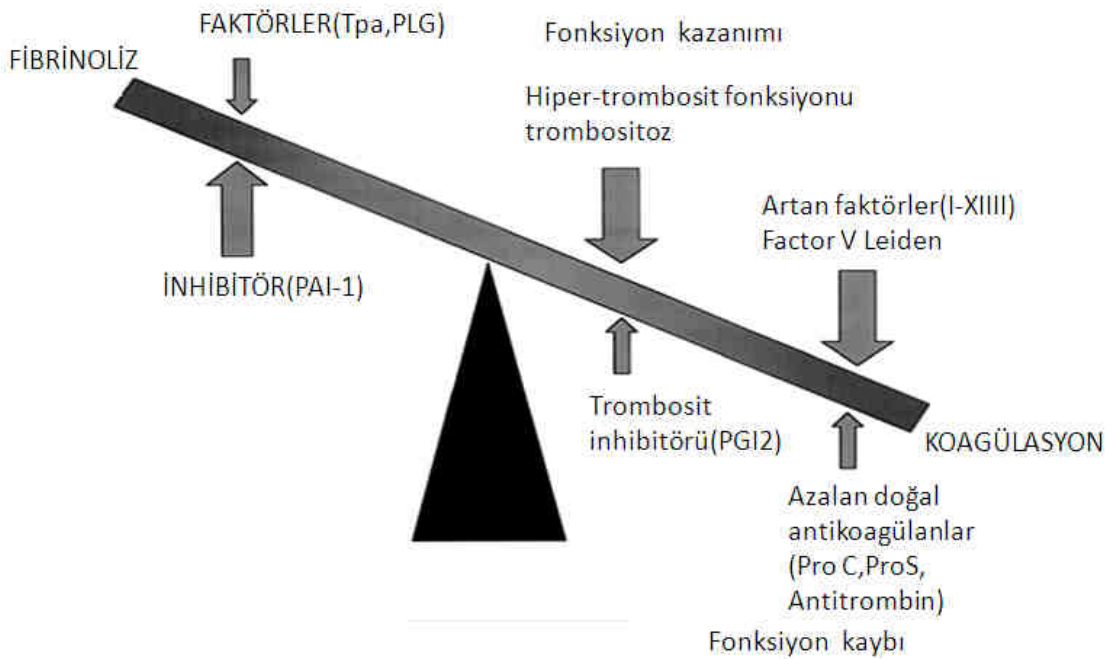
Çizelge 2.3. Türkiye için doğuştan beklenen yaşam süreleri (Türk İstatistik Kurumu, 2008)

<i>Turkey : Life expectancy at birth</i>			
	(years)		
Year	Males	Females	Total
1935-40	34,68	36,23	35,43
1940-45	30,1	32,65	31,34
1945-50	36,68	39,59	38,1
1950-55	41,96	45,16	43,52
1955-60	44,68	48,63	44,61
1960-65	47,93	52,02	49,93
1965-70	51,07	55,27	53,12
1970-75	52,99	57,3	55,09
1975-80	54,78	59,37	57,01
1980	55,8	60,3	58,0
1981	56,3	60,7	58,4
1982	56,7	61,1	58,8
1983	57,5	61,9	59,6
1984	58,6	63,1	60,8
1985	59,8	64,3	62,0
1986	60,9	65,5	63,2
1987	62,1	66,7	64,3
1988	62,9	67,5	65,2
1989	63,4	68,0	65,6
1990	63,8	68,3	66,0
1991	64,2	68,7	66,4
1992	64,5	69,1	66,7
1993	64,9	69,4	67,1
1994	65,2	69,8	67,4
1995	65,6	70,2	67,8
1996	65,9	70,6	68,2
1997	66,3	70,9	68,5
1998	66,7	71,3	68,9
1999	67,1	71,8	69,4
2000	68,1	72,8	70,4
2001	68,2	73,0	70,5
2002	68,4	73,2	70,7
2003	68,6	73,4	70,9
2004	68,8	73,6	71,1
2005	68,9	73,8	71,3
2006	69,1	74,0	71,5
2007	69,3	74,2	71,7
2008	69,4	74,3	71,8

Not : 1935-1980 yılları arası " Türkiye Nüfusu, 1923-1994 " adlı yayından alınmıştır. Diğer yıllar dolaylı yolla tahmin edilmiştir.

2.4 Hemostaz

Hemostaz koagülasyon ve fibrinolizis arasındaki hassas dengenin korunduğu fizyolojik bir süreçtir. Primer hemostazı trombositler ve vasküler endotel sağlarken sekonder hemostazda fibrinolitik sistem elemanları ve koagülasyonda rol oynayan proteinler görev alır. Hemostaz dengesinin sağlanması için birçok feed-back sistem kontrol mekanizması sağlamaktadır.



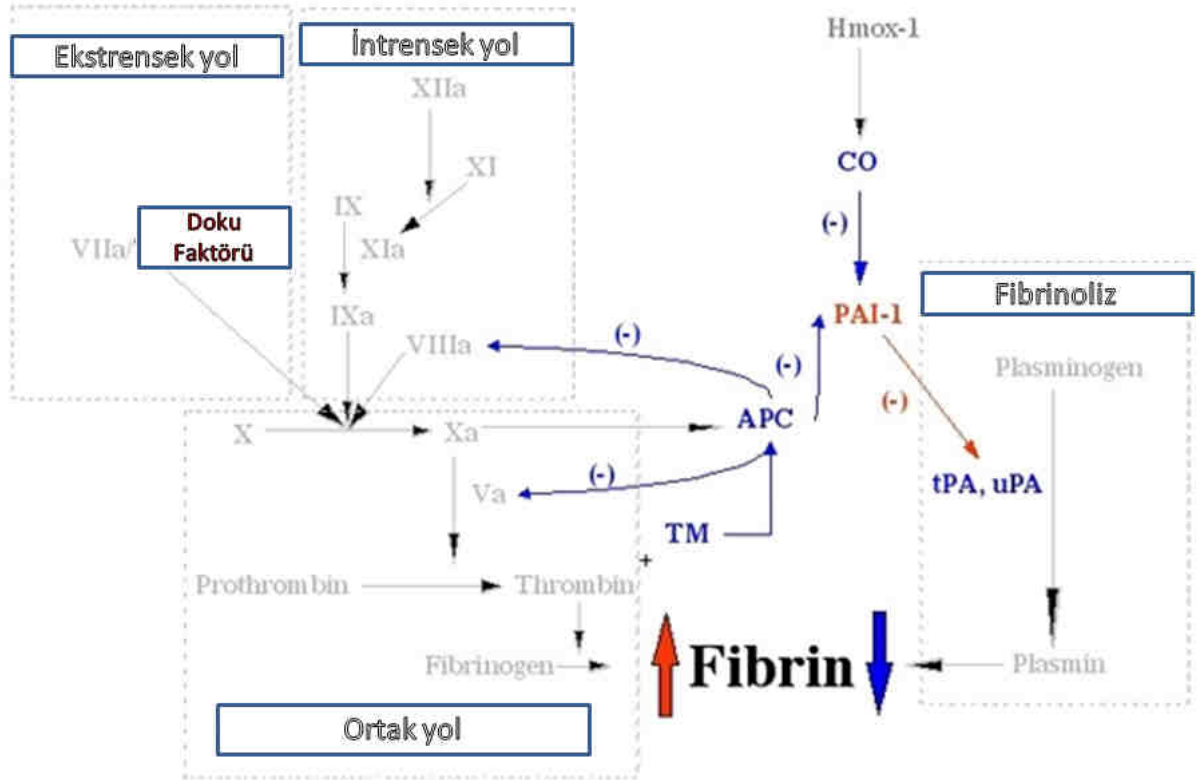
Şekil 2.2. Hemostaz Dengesi (Kandice Kottke-Marchant, 2001)

Doğal antikoagülanların fonksiyon kaybına neden olan veya prokoagülanların fonksiyon kazanımına neden olan mutasyonlara bağlı olarak kan komponentlerinde meydana gelen genetik bozukluklar, fibrinolitik fonksiyonun azalmasına veya artan fonksiyon sonucu trombüse yol açabilir (Şekil 1). Protrombotik ve antitrombotik faktörler farklı mekanizmalarla tromboz oluşumuna yol açabilir. Pıhtılaşmadaki fonksiyon artışı veya fibrinolizdeki azalış trombüse neden olabilir. Protein C, Protein S veya antitrombin gibi antikoagülanlarda görülen fonksiyon kaybı mutasyonları trombozla ilişkilendirilir. Bunun tersine, koagülasyon faktörlerinin fonksiyon kazanım mutasyonları da tromboz için bir risk oluşturmaktadır. Buna örnek olarak FVL ve protrombin mutasyonları verilebilir. Benzer bir biçimde artan trombüs oluşturuçu fonksiyon veya azalan trombüs inhibitörleri

yine tromboz öncüsü olabilir. Azalan profibrinolitik faktörler (Tpa/Plazminojen) veya artan fibrinolitik inhibitörler (PAI-1/A2PI) de öncül trombotik durum nedenlerindedir (Kottke-Marchant et al. 2002).

2.5 Pıhtılaşma mekanizması

Pıhtılaşma sisteminde birbirinin aktivasyonunu ya da inhibisyonunu kontrol eden çok sayıda protein görev alır. Ekstresek, intrinsek ve ortak yol sonucunda pıhtı oluşumu gerçekleşir.



Şekil 2.3. Pıhtılaşma mekanizmasının oluşturan ekstresek, intrinsek ve ortak yol

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=eurekah&part=A720>).

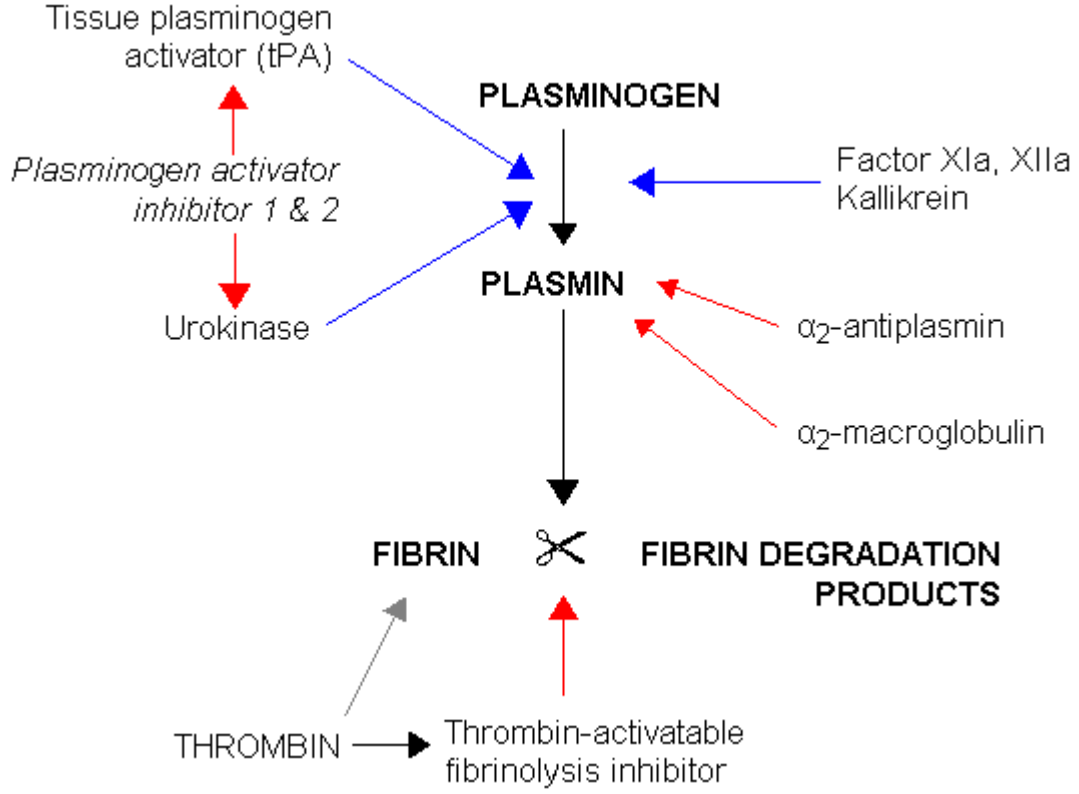
Damar hasarını takiben doku faktörünün salınımı ile kan pıhtılaşması başlar. Ayrıca aktive trombüs ve lökositler tarafından da ifadelenen tek zincirli glikoprotein yapısında olan doku faktörü, Faktör VII'ye bağlanarak kan pıhtılaşmasını başlatır. Plazmada zimojen halde bulunan FVII, doku faktörü ile kompleks oluşturup katalitik etkinliğini 4

kat arttırarak enzimatik reaksiyonların başlamasını sağlar. Protrombin aktifleştirici enzim sayesinde protrombinaz serin proteaz faktör Xa ve kofaktör olan Va ile kompleks oluşturur. Protrombinaz kompleksi adı verilen bu kompleks az seviyede protrombini (FII) trombine (FIIa)'e dönüştürür. Bu eser miktardaki trombin FV, FVIII ve FXI'i aktive ederek siklusa dönüp trombin oluşumunu arttırır. Trombüs yüzeyinde TF-VIIa veya FXIA tarafından aktive olan FIXa ve kalsiyum varlığında FVIIIa ile trombüs tenaz kompleksini oluşturur. Böylece daha fazla FX aktive olup aktive FV ile "trombin patlamasını" sağlar. İlk trombin aktivasyonundan daha çok bu trombin patlaması stabil hemostaz plağı oluşumu için önemlidir (Hoffman et al. 2007).

Pıhtılaşma antitrombin (AT) (Pike et al. 2005), Doku Faktör Yolu İnhibitörü (TAPI) (Sanset et al. 1996), Protein C yolağı (Dalhback et al. 2005) ve az olarak da heparin kofaktör II (HCII) (Tollefsen et al. 2007) ve Protein Z-bağımlı Proteaz İnhibitörü (ZPI) (Broze et al. 2001) tarafından regüle edilir. Protein C inhibitörü ve Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1 (PAI-1) (Cooper et al. 1995, Meijer M et al. 1997) de trombini inhibe ederek pıhtılaşmaya katkı sağlarlar.

2.6. Fibrinolizis

Fibrinoliz, kan pıhtısının engellenmesi ve çözülmesi için fibrinin fiziksel yıkımı olarak açıklanmaktadır (Cesarman-Maus et al. 2005). Zimojen olarak bulunan Plazminojen, bir serin proteaz olan Plazmine dönüştüğünde fibrinin ilk degradasyonunu sağlar. Fibrin plazminojenin aktivasyonu için bir kofaktör olarak rol oynarken, plazmin için de bir sübstrat olarak görev alır. Fibrin varlığında doku plazminojen aktivatörü (t-PA) plazminojeni, fibrin proteolizini sağlayan plazmine dönüştürür. Fibrin degradasyonu fazla plazminojen aktivasyonunu engeller (Wiman et al. 1978).



Şekil 2.4. Fibrinolizis Mekanizması (mavi oklar uyarımı, kırmızı oklar inhibisyonu göstermektedir) (<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fibrinolysis.png>)

Serin proteaz olan doku plazminojen aktivatör endotel hücreler tarafından sentezlenir ve salınır. t-PA fibrine bağlanmasının yanısıra Annexin II ve endotel hücrelerde ve trombüs yüzeyinde çok sayıda farklı reseptörlere bağlanır (Miles et al. 2005). Böylece plazmin oluşumu ve fibrinoliz trombüs oluşumunun gerçekleştiği alanda sınırlı kalır. Fibrinoliz çoğunlukla antiplasmin, plazminojen aktivatör inhibitörü olan PAI-1 ve trombin aktive edici fibrinoliz inhibitörü olan TAFI tarafından kontrol edilir (Mosnier et al. 2006).

2.7. Protein C Sistemi

Protein C yolu hemostazda pıhtıyı çevreleyen alanda trombin oluşumunu kontrol etmekte görev alır (Esmon et al. 2003). Zimojen protein C (PC), endotel hücre protein C reseptörü (EPCR) tarafından endotelyuma lokalize olur (Fukudome et al. 1996). Pıhtılaşma yolu ile oluşan trombin bir integral membran proteini olan Trombomoduline (TM) bağlanarak endotelyuma yerleşir. Endotel hücre yüzeyinde TM bağlı trombin, protein

C'yi bir serin proteaz olan aktif protein C'ye dönüştürür (Stearns-Kurosawa et al. 1996). Protein S varlığında APC, FVa ve FVIIIa'yı inaktif hale getirir (Lu D. et al. 1996). Böylece endotelyumun hasar görmediği kısımda pıhtı çevresinde daha fazla trombüs oluşumu engellenmiş olur (Esmon et al. 2003). FVa'nın APC tarafından inaktif hale gelmesi reseptör ve efektör mekanizmalarını bozarak FXa ile ilgili fonksiyonlarını da inhibe eder. Böylece FVa'nın APC tarafından gerçekleştirdiği inaktivasyon mekanizmasındaki düzensizlikler, protrombin aktivasyonunun sürdürülmesinden dolayı trombotik olaylarla, trombotik olayların şiddeti ise defektin moleküler temeli ile ilişkili olabilir. Ailesel trombüsdeki olgular Protein C, Protein S ve trombomodülün eksikliğiyle ilgilidir ve bu Protein C yolu fizyolojik açıdan anlamlılığı olduğunu göstermektedir. Faktör V'deki görülen 1691G-A mutasyonu ailevi tromboz ile ilişkilidir ve APC direnci Venöz Trombozlu hastalarda tespit edilmiştir.

2.8. Faktör V 1691 G-A ve Tromboz

Normal hemostatik dengenin korunmasında asıl rol oynayan enzim kofaktörü Faktör V (FV)'dir. FV 330kDa ağırlığında tek zincir bir glikoproteindir (Tracy PB et al. 1982). Plazmada serbest halde bulunmasının yanısıra trombositlerin α -granüllerinde de bulunurlar (Tracy PB et al. 1982, Chesney CM et al. 1981). Koagülasyon sırasında trombosit aktivasyonunun sonucunda FV salgılanır. Birçok hücre tipinin FV sentezlediği belirtilse de, öncelikli olarak karaciğer tarafından FV biyosentezinin gerçekleştiği ve tek zincir halinde sentezlenen bu molekülünün translasyon sonrası birçok modifikasyona uğradıktan sonra kana salındığı bilinmektedir (Owen CA Jr et al. 1977, Wilson DB et al. 1984).

Birinci kromozomun uzun kolunda lokalize olan FV geni 25 ekzondan meydana gelip 80 kb'lık bir alanı kapsar. İzole edilmiş cDNA'sı 6672 baz çifti uzunluğunda ve 2224 aminoasitlik bir öncü protein sentezler (Kane WH et al. 1987, Jenny RJ et al. 1987).

2.8.1. Antitrombin III eksikliği

Antitrombin III, başta trombin ve faktör X olmak üzere koagülasyon rol oynayan çok önemli aktive proteinlerin inhibitörüdür. Antitrombin III eksikliğinde öncelikle alt

ekstremitelerde derin ven trombozu görülmektedir. Antitrombin III eksikliği trombozlu bireylerin yaklaşık % 1-2'sinde gözlenmektedir (Federman et al.2001, Bick et al. 2001, Leebeek et al. 2001).

2.8.2. Protein C Eksikliği

Protein C, aktif faktör V ve Faktör VIII'in inhibitörüdür. Protein C eksikliği olan hastalarda derin ven trombozu görülmektedir. Trombozlu vakaların yaklaşık %2-5'inde Protein C eksikliği görülmektedir (Federman et al.2001, Bick et al. 2001, Leebeek et al. 2001).

2.8.3. Protein S Eksikliği

Protein S, Protein C'nin kofaktörüdür. Aktif faktör V ve Faktör VIII'in inhibisyonunda görev almaktadır. Protein C eksikliği olan hastalarda alt ekstremitelerde derin ven trombozu ile birlikte arteriyel tromboz da görülmektedir. Trombozlu bireylerin yaklaşık % 2-3'ünde Protein S eksikliği görülür (Federman et al.2001, Bick et al. 2001, Leebeek et al. 2001).

2.8.4. Aktive Protein C Direnci

Venöz trombozun en önemli nedenlerinden biri APC direnci olarak bilinir. FV geninde 1691 pozisyonundaki G-A yanlış anlam mutasyonu sonucu Arjinin amino asidi Glutamine dönüşmektedir. Bu değişim Faktör V molekülünde aktif protein C için yer alan kesim noktasını etkilemektedir. Böylece mutant faktör V, aktif protein C tarafından inaktive edilmeye dirençli hale gelir. FVLeiden olarak adlandırılan bu mutasyon şimdiye kadar tromboz için bilinen en yaygın risktir.

Aktive protein C direnci faktör V Leiden mutasyonu nedeniyle gelişen ve venöz tromboza neden olan en sık trombofili nedenidir. Toplumda bu mutasyonun sıklığı % 2-7 arasında değişmektedir. İdiyopatik derin ven trombozlu olguların yaklaşık % 40'undan

Aktive protein C direncinin sorumlu olduğu bildirilmektedir. Homozigotlarda tromboz riski 50-100 kat heterozigotlarda ise 5-10 kat artmıştır. Faktör V Leiden mutasyonu, protein C-S eksikliği veya antitrombin III eksikliği ile birlikte görüldüğünde tromboz riski katlanarak artmaktadır (Lee et al.2001, Rosenberg et al. 2001).

2.8.5. Protrombin 20210A Mutasyonu

Tromboza neden olan bir başka yaygın genetik risk faktörü ise protrombin genindeki G20210A mutasyonudur. Bu mutasyon genin 3'ucundaki 20210 nükleotid pozisyonunda gerçekteşmektedir. Fonksiyon kazanımı sağlayan bu mutasyon yüksek seviye plazma protrombinine ve trombüs oluşumuna neden olur (Kottke-Marchant et al.2002).

Protrombin genindeki G20210A mutasyonu ven trombozu için bir risk faktörü olduğu gibi arteriyel tromboza da neden olabilmektedir. Bu durumun artmış protrombin plazma düzeylerinin trombozla ilişkili olabileceğinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Protrombin G20210A mutasyonu, faktor V Leiden mutasyonu ile birlikte olduğunda tromboz riski artmaktadır (Mansilha et al.2002, Gemmati et al. 2001).

2.9. Plazminojen Aktivasyon Sistemi

Plazminojen aktivasyon sisteminin üyelerinden biri olan plazminojen aktivatör inhibitörü-1 birçok biyolojik süreçte rol oynar ve hastalıklara bağlı olarak fazla ve az ekspresyonu veya normal seviyesi bazen şaşırtıcı sonuçlar ortaya çıkarabilir. Plazminojen, ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) veya doku plazminojen aktivatörü (tPA) tarafından aktif formu olan plazmine dönüştürülen bir pro-enzimdir. Proteolitik bir enzim olan plazmin, bağ doku proteinleri ve bazal zarları parçayabilme özelliğine sahiptir. Ayrıca diğer latent proteolitik enzimleri aktive ederek, parçalanacak protein spektrumunu genişletir. Dokuların yeniden biçimlendirilmesinde, tümör invazyonunda, metastaz gelişimi ve anjigenez mekanizmalarında plazmin anahtar enzim rolü oynamaktadır (Iishi et al. 1995).

Ürokinaz plazminojen ve doku plazminojen aktivatörleri proteolitik kesim sonucu plasminojeni plazmine dönüştüren zayıf proteolitik enzimlerdir. Ürokinaz plazminojen aktivatörü, hücre göçü, yara iyileşmesi ve doku biçimlendirilmesi gibi birçok fiziksel ve patolojik durumda hücrel proteolizde yer almaktadır. Doku plazminojen aktivatörü ise intravasküler pıhtı eritilmesine aracı olmaktadır (Ossowski et al. 1988).

PAI-1,PAI-2,PAI-3 ve nexin proteini olmak üzere bilinen dört adet ürokinaz ve doku plazminojen aktivatörü inhibitör proteini bulunmaktadır. Bu proteinlerin hepsi aktivasyon düzeyinde proteolize aracılık eden regülator proteinlerdir. Bunlardan PAI-1 aktive, latent ve kesik olmak üzere üç farklı formda bulunur ve iki görevi vardır. Birinci görevi plazminojen aktivasyon sisteminin direk inhibitörü olması, ikinci görevi ise adezyon glikoprotein olan vitronektin ile olan etkileşimi sonucu metastaz ve doku modellemesidir. İkinci görevi proteinaz inhibisyon özelliğinden bağımsızdır. Bu serpene has olan özelliği ise konformasyonel ve fonksiyonel özellikleri arasında sıkı bir ilişki olmasıdır (Ngo et al. 2001).

Ürokinaz plasminojen aktivatörünün bağlanma bölgesi uPA reseptörü (uPAR) olarak adlandırılır. Bir glikoprotein olan uPAR ürokinaz plasminojen aktivatörünü hücre yüzeyine bağlarken aynı zamanda plazminojeni aktifleştirme görevini gerçekleştirir (Kwaan et al. 1991).

PAI-1 genindeki mutasyon sonucu plazminojen aktivatör inhibitörü fonksiyonunda defekt veya dokuya özel olarak PAI-1 ifadenmesinde azalma görülmektedir. Ayrıca PAI-1 ifadenmesini veya aktivasyonunu kontrol eden vitronektin gibi, herhangi bir faktördeki bir mutasyon da PAI-1 fonksiyonunda bozulmaya neden olabilir (Fay et al. 1997).

Kanser, obezite, renal hastalıklar ve metabolik sendromlar gibi hastalıklarda PAI-1 seviyesi ve aktivitesinde artış gözlenmektedir. Fibrinolizisin inhibe edilmesine bağlı olarak ortaya çıkan koroner kalp hastalıkları ve miyokard enfarktüsü yine PAI-1'in yüksek seviyeleriyle ilişkilendirilmektedir. Böbreklerdeki ürokinazın ana inhibitörü olarak fibrinin plazminojen tarafından yıkımını azaltır (Ma et al. 2009). Buna ek olarak PAI-1 4G/5G polimorfizmi ve yüksek seviye PAI-1 spontan düşüklerle ilişkilendirilen venöz trombozembolizm riskini arttırdığı düşünülmektedir (Schenk et al. 2008). Plazminojen aktivatör inhibitörünün yüksek seviyede bulunuşuyla obezite arasındaki ilişkinin 2.tip

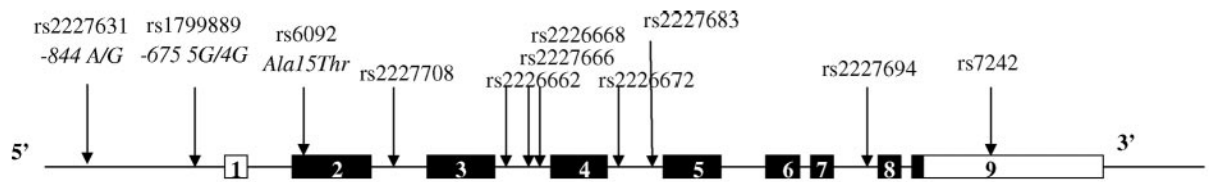
diyabetine ve kardiyovasküler komplikasyonlara neden olduğu gösterilmiştir (Schalkwijk et al. 2006).

2.9.1 Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1'in Yapı ve Fonksiyon İlişkileri



Şekil 2.5. PAI-1 gen lokalizasyonu

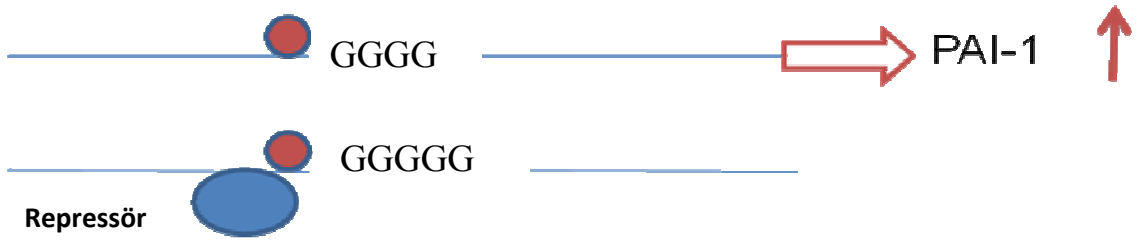
Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1'in (PAI-1) plazminojen aktivasyonunun fiziksel inhibitörlüğü öncelikli görevidir. Doku tipi ve urokinaz tipi plazminojen aktivatörleri ile birlikte Serin Proteaz İnhibitör süper ailesi üyesidir. 7.Kromozomun uzun kolunda q22.1 de lokalize (şekil 3) olan gen, 9 ekzon ve 8 introndan oluşmaktadır. 50kDa olan PAI-1, 379 amino asit içeren bir glikoproteindir. Karaciğer, endotel ve düz kas hücreleri ve trombositler tarafından salgınır (Francis C.W et al, 2002).



Şekil 2.6. PAI-1 gen polimorfizmleri

Şimdiye kadar bilinen 8 gen polimorfizmi vardır ve bunlardan en önemlisi transkripsiyon başlangıç bölgesinden 675 yukarı pozisyonda bulunan guanin bazı insersiyon/delesyonudur (Şekil 4).

PAI-1 -675 4G/5G polimorfizmi bir Guanin nükleotidinin 4G'ye eklenmesi ya da 5G'den çıkarılmasıyla ortaya çıkar. Genin transkripsiyon başlatma bölgesinde -675 noktasında aktivatör ve repressör bağlanma bölgeleri olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda 5G alleli ilave bir protein bağlanma bölgesi içerirken, 4G allelinde bu bölgenin olmadığı saptanmıştır. 4G'nin artan PAI-1 düzeyleriyle ilişkili olduğu bulunduktan sonra, 5G allelinde bulunan bu bağlanma bölgesinin bir repressör protein için yer aldığı düşünülmüştür (Şekil 5).



Şekil 2.7. 4G ve 5G motiflerinin PAI-1 transkripsiyonuna etki mekanizması

2.10. MOLEKÜLER TEKNİKLER

2.10.1. Çözeltiler ve Solüsyonlar

DNA izolasyonu sırasında kırmızı kan hücrelerini parçalamak için Red Blood Cell (RBC) lizis çözeltisi, DNA'nın saflaştırılma aşamasında, protein tabakasını ayırmak için fenol / kloroform karışımı, polimeraz zincir reaksiyonunu takiben kullandığımız agaroz jeli hazırlamak için TBE (Tris Hidrojen klorür Borik asit EDTA - Etilendiamin tetraasetikasit-), Restriksiyon enzimle kesim gerçekleştirildikten sonra kullandığımız PAGE jelini hazırlamak için akrilamid/ bisakrilamid çözeltisi, amonyum per sülfat çözeltisi (APS) ve TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin) solüsyonları kullanılmıştır.

2.10.2. DNA Ekstraksiyonu:

DNA, kan örneklerinden klasik fenol/kloroform izolasyon yöntemi ile elde edilmiştir. İzole edilen genomik DNA'nın çöktürülmesinde etanol kullanılmıştır.

2.10.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

1985 yılında Henry A.Erlich, Kary Mullis ve Randall K.Saiki tarafından geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu nükleik asitlerin uygun koşullarda bir tüp içerisinde çoğaltıldığı bir tür "in vitro klonlama"dır (Akar,1999).

PCR hedef DNA dizilerinin çoğaltılma reaksiyonu olan hızlı bir metottur. Reaksiyonu başlatmak için çoğaltılacak DNA örneği, çoğaltılacak bölgenin iki ucundaki DNA dizisini tanıyıp bağlanacak olan sentetik primerler, DNA primerlerine bağlanıp 3'ucuna nükleotidleri ekleyerek sentezlemeyi yapacak olan DNA polimeraz, sentez için kullanılacak olan deoksinükleotidfosfatlar ve polimerazın çalışma koşulları için uygun ortamı sağlayan tampon gereklidir (Akar,1999).

PCR üç aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama yüksek ısı ile DNA zincirlerinin birbirinden ayrılmasını sağlayan denatürasyondur. Çift zincir DNA yaklaşık 90 °C–95 °C'e kadar ısıtılarak tek zincir haline getirilir. Bir sonraki adım ise, 18–20 baz uzunluğundaki sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA bölgelerine bağlanma basamağıdır. Bu aşamada ise sıcaklık düşürülerek primerlerin DNA uçlarına bağlanıp kalıp DNA sentezini başlatmaları sağlanır. Son aşamada olarak adlandırılan zincir uzamasında ise ortamda bulunan dNTP'lerle 72°C'de, hedef DNA'nın polimerizasyonunun sağlanır. PCR'in bir siklusu bu üç basamaktan oluşur ve bu 20–30 kere tekrarlanır. Tekrar sayısına bağlı olarak elde edilecek ürün miktarı da artar. Böylece hedef DNA amplikasyonu gerçekleşmiş olur (Akar, 1999).

2.10.4. Restriksiyon Endonükleaz (RE) ile Muamele

Çoğaltılan PCR ürünlerinin incelenmesi için uygulanan bir yöntemdir. Restriksiyon endonükleazlar çift sarmal DNA parçalarını çok spesifik noktalardan keserek DNA manüplasyonunu sağlayan enzimlerdir. Bakterilere özgü olan restriksiyon enzimlerin esas görevleri dışarıdan bakteriye giren yabancı gen veya markır taşıyan materyalleri ayırıştırıp mutasyonları önlemektir. Bakteri türlerinin genetik stabilitesini sağlayan bu enzimler DNA üzerindeki özgün palindromik bir bölgeyi tanıyarak çift sarmal DNA'yı fosfodiester bağından keserek iki parçaya ayırır. Bu kesilen parçalar iki yönde simetrikdir (Akar,1999).

2.10.5 “Site-Directed Mutagenesis” ile PCR

Moleküler tekniklerde yer alan bu yöntem bir rekombinant-DNA oluşturma yöntemidir. Restriksiyon enzimleri ile muamele yapılacak PCR ürünlerinde kesim noktaları oluşturmak ve PCR'da özgünlüğü arttırmak amacıyla uygulanır. Primer bağlanmaları sırasında 5'ucuna yakın bölgelerde yapılan bir ya da birkaç bazlık değişiklikler özgünlüğü arttırıp bir kesim noktası yaratabilir ya da ortadan kaldırabilir. PCR sonucu oluşan ürünler baz değişikliği olan primere uygun olarak çoğalacak ve istenen dizinin amplifikasyonu sağlanmış olacaktır (Akar,1999). Çalışmamızda kullanılan PAI-1 primerleri için “site-directed mutagenesis” kullanılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı; Çocuk Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. 0–18 yaş aralığında 222 Pediatrik İnme ve 70 yaş üzeri olmak üzere 170 Derin Ven Tromboz tanısı olan bireyler hasta grubu olarak kullanılmıştır. 0–18 yaş aralığında 191 ve 70 yaş üzeri 221 birey de negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 0-18 yaş aralığındaki hastaların % 51.87'si erkek ve % 48.13'ü kadın bireylerden oluşmaktadır. Aynı grubun negatif kontrolü ise % 45.64'ü erkek ve % 54.36'sı kadın bireylerden oluşmaktadır. 70 yaş ve üstü hasta grubundaki cinsiyet dağılımı ise % 48.15 erkek ve % 51.85 kadın şeklinde olup bu grup için kullanılan negatif kontrollerin ise %50.31'i erkek ve %49.69'u kadın bireylerden oluşmaktadır. Bu bireylerin ailevi tromboz öyküleri bulunmamaktadır. Çalışmaya ait bütün DNA örnekleri laboratuvarımızın "DNA Bankası"ndan temin edilmiş ve bireylerden gönüllü onam formları alınmıştır.

3.1.YÖNTEMLER

3.1.1. DNA İzolasyonu

Çalışmamızda kullanılan DNA'lar laboratuvarımızın kan bankasından temin edilip klasik fenol/kloroform yöntemiyle izole edilmiştir. Bu yöntemde hasta kanları 0,5 M EDTA (Sigma, ABD)'lı tüp içersine 10cc alındıktan sonra 25cc Red blood cell (RBC) lizis solüsyonu[155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] ile 20 dk buzda bekletilir. +4°C de, 4000rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılır ve bu işlem tüm eritrositler patlatılana kadar devam edilir. Kırmızı küreler elimine edildikten sonra çekirdekli hücrelerle; 20µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0.5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Merck, Almanya) ve beyaz küre hacminin 2.5 katı olacak şekilde Nükleaz solüsyonu [Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100mM Sodyum Klorid (Merck,

Almanya), 1mM pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya)] ilave edilerek bir gece 56°C’de su banyosunda (Nüve, Türkiye) bekletilir. Ertesi gün 1:1 oranda Fenol/Kloroform[Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzooamilalkol (Merck, Almanya)] ilave edilerek 10 dk elde iyi bir şekilde çalkalanır. 20 dk buzda gömülü bir şekilde bekletildikten sonra +4°C, 4000rpm’de 20 dk santrifüj edilir. Süpernatant ayrı bir tüpe aktarılır ve 1\10’u kadar 2M sodyum asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95’lik alkol (Tekel, Türkiye) ilave edilir. Tüp nazikçe çalkalanır ve DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C’de bir gece bekletilir. Bir sonraki gün +4°C’de 4000rpm’de 20 dk santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır, DNA dipte çökelek halinde kalır. 15 dk kurutulduktan sonra TE [Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)] solüsyonunda 37°C’de bir gece çözülmesi için bekletilir. Elde edilen DNA +4°C veya -20°C’de saklanır.

3.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PAI-1 geni promotor bölgesi, F: 5’CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT3’, R:5’CCAACAGAGGACTCTTGGTCT3’primerleri kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır.

PCR için;10X Taq tampon çözeltisi (Bioron, Almanya), 25mM MgCl₂ (Fermentas, ABD), son konsantrasyon 2mM olacak şekilde dNTP [(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Bioron, Almanya)], son konsantrasyonu 10pmol/μl Forward ve Reverse primerler (Alpha, Kanada), Taq DNA polimeraz (Fermentas, ABD)kullanılmış ve son hacim 50μl’e ddH₂O ile tamamlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları 95 derecede 5 dk, 94 derecede 1dk, 60 derecede 1dk, 72 derecede 1dk olmak üzere 34 siklüs tekrar olarak ve son siklusta 72 derecede 1dk olarak PCR cihaz programı ayarlanmıştır (Thermal Cycle, Biometra, Almanya). Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda 98/99 baz çifti uzunluğunda ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir.

cacagagagagtctggccacgtggggagtcagccgtgtatcatcggaggcgg
ccgggcacatggcagggatgagggaaagaccaagagtcctctgttggccca
agtcctagacagacaaaacctagacaatcacgtggctggc

Dizi 3.1. PCR ile amplifiye edilen PAI-1 -675 4G/5G gen değişimi olan bölge.

3.1.3 Agaroz Jel Elektroforezi:

54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20ml 0.5M pH:8 EDTA (AppliChem, Almanya) karıştırılıp 1000mL distile su (ddH₂O) eklenmesiyle TBE 5X hazırlanır. TBE 5X solüsyonu 1/5 oranında seyreltilip TBE 1X elde edilir. %3'lük hazırlanan agaroz (Sigma, ABD) jel için 4.5g agaroz 150 ml TBE 1X solüsyonuyla karıştırılır. Hazırlanan karışımı agarozun erimesi için mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılır. Homojen bir karışım halini alan karışım buharlaşması duracak kadar soğutulup ve %5'lik stok solüsyondan 7 µl Etidyum Bromid (Sigma, ABD)ilave edilir. İyi bir şekilde çalkanan karışım hava kabarcıkları olmaksızın uygun taraklarla önceden hazırlanmış olan jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür ve donması için 30 dk bekletilir. Donan agaroz jel elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilip üzeri TBE 1X ile doldurulur. 10µl PCR ürünü 2µl Brom-Fenol Mavisini (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılıp,75 V akımda 30 dk yürütülmüştür. Çoğalan PCR ürünlerinin tespit edilmesi için, marker (ΦX174 DNA-HaeIII BioLabs, ABD; ΦX174 DNA-HinfI BioLabs, ABD) PCR ürünleriyle birlikte jele 3µl yüklenir. Ultraviyole ışık (Spectroline, ABD) altında incelenen bantlar, fotoğraflanır (Alpha Imager, ABD).

3.1.4.1. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzim ile Muamelesi

PAI-1 Geni promotor bölgesinin PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesini takiben BseLI (5'...CCN↓NNNNNNGG...3') restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon endonükleaz tamponu, 10 Unite restriksiyon enzimiyle birlikte 12,5µl PCR ürünleri için 55C^ode 16 saat inkübasyonla kesim gerçekleştirilmiştir.

3.1.4.2. PAI-1 -675 4G/5G Gen Değişiminin BseLI Enzimi ile İncelenmesi

PCR ile çoğaltılan 98/99 bç uzunluğundaki PAI-1 promotor bölgesi BseLI restriksiyon endonükleazi ile muamele edilmiştir. Bu bölgede bir Guanin insersiyon/delesyonuyla oluşan 4G ve 5G olmak üzere iki genotip görülmektedir. BseLI enzimi için beş Guanin bulunan dizi bir kesim noktası yaratırken, enzim 4G için bu noktayı tanıyamamaktadır. Bu durumda beş guanin içeren PCR ürünü BseLI ile kesim yapıldığında 77 ve 22 olmak üzere 2 farklı bant profili göstermektedir. Dört Guanin dizisinin bulunduğu durumda ise kesim gerçekleşmemekte ve 98 baz çiftlik tek bant görülmektedir. Her iki 4G/5G motifinin birlikte bulunması durumunda ise 98/99, 77, 22bç'lik bant profilleri meydana gelmektedir.

3.1.4.3 Poliakrilamid Jel Hazırlanması

Poliakrilamid jel %7'lik olacak miktarlarda, %30'luk stok akrilamid solüsyonu, TBE5X tamponu, Amonium Persulfat, TEMED ve distile su magnetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. 49:1 oranında %30'luk akrilamid/bisakrilamid solüsyonunun hazırlanması için 196 g akrilamid (Merck, Almanya) ve 4 gr N,N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) 200 ml distile su içinde 37°C'de ısıtılarak çözdürülür ve hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. TBE 5X için 54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5 g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20 ml 0,5 M pH8 EDTA (AppliChem, Almanya) 1000 ml distile su içinde çözdürülerek yapılmıştır. 0.3 g Amonyum Persulfat (AppliChem, Almanya) 3ml distile su ile karıştırıp %10'luk amonyum persulfat jel polimerizasyonu için kullanılır. Monomerlerin polimerleşmesini için kullanılan TEMED (Tetra Etil Metilen Deamin) ise hazır halde kullanılır.

Vertikal jel elektroforezi için kullanılan camlar bol su ile iyi bir şekilde yıkanıp, distile sudan geçirilir. En son %70'lik alkolle temizlenir ve kurulanır. Camların arasına 1,5 mm'lik spacerlar konular ve klempler yardımıyla camlar sabitlenir. Hazırlanan düzeneğe jel dökülüp, uygun tarak hava kabarcıkları olmaksızın yerleştirilir. 30-60 dk bekletilerek polimerleşmesi beklenir. Polimerleşen jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılır ve elektroforeze yerleştirilip TBE 1X tamponuyla camların üstü doldurulur. PCR ile amplifiye

edilip, kesim gerçekleştirilmiş ürünlerden 8 µl, 2 µl yükleme boyasıyla karıştırılıp kuyucuklara yüklenir.

3.1.4.3.1 Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Sabit 150 V'da soğutma yapılmaksızın 3 saat yürütülen poliakrilamid jel, Gümüş boyamaya tabii tutulduktan sonra bant profilleri incelenir.

3.1.4.3.2 PAGE Jeli İçin Gümüş Boyama

Gümüş boyama tekniği üç farklı solüsyon kullanılarak 3 basamakta gerçekleştirilir. % 1'lik gümüş nitrat zltisi için 5 g gümüş nitrat ($AgNO_3$) (AppliChem, Almanya) tartılır ve 500 ml distile su ile karıştırılır. İkinici olarak kullanılan % 15'lik sodyum hidroksit ($NaOH$) zltisi, 150 g katı sodyum hidroksitin 1000 ml'ye distile suda znmesiyle hazırlanır. Son olarak kullanılan % 7,5'luk Sodyum bikarbonat solüsyonu % 7,5'luk sodyum bikarbonat'ın (Na_2CO_3) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanır.

Elektroforez tankından alınan jel, stok solüsyonundan distile su ile 9:1 oranında seyreltilerek hazırlanan % 0,1'lik gümüş nitrat solüsyonunda 5 dk bekletilir. Formaldehit eklenmiş % 1,5'luk sodyum hidroksit solüsyonu ikinci basamak olarak jele uygulanır. Son olarak % 0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonuna alınan jel 1–2 dakika bekletilip gümüş boyama işlemi basamakları tamamlanmış olur.

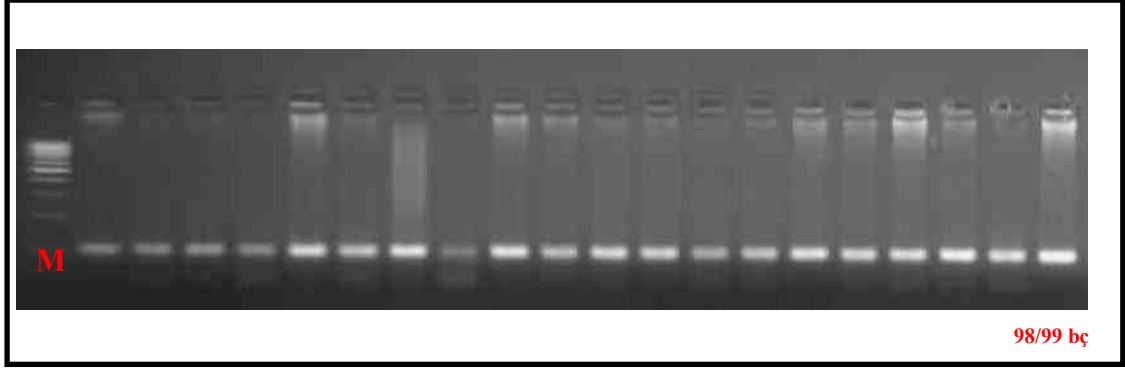
3.1.4.4 İstatistiksel Analiz

Bütün veriler TAD VE D-R istatistik programları ile hesaplanmıştır. Sıklıklar yüzde (%), karışlaştırma ve risk değerlendirmeleri Odds Ratio (risk katsayısı) ve Confidence Interval (güven aralığı) hesapları %95'lik güvenirlik düzeyinde hesaplandı. Sonuçlar Hardy-Weinberg denkleminde uygunluk açısından teyit edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

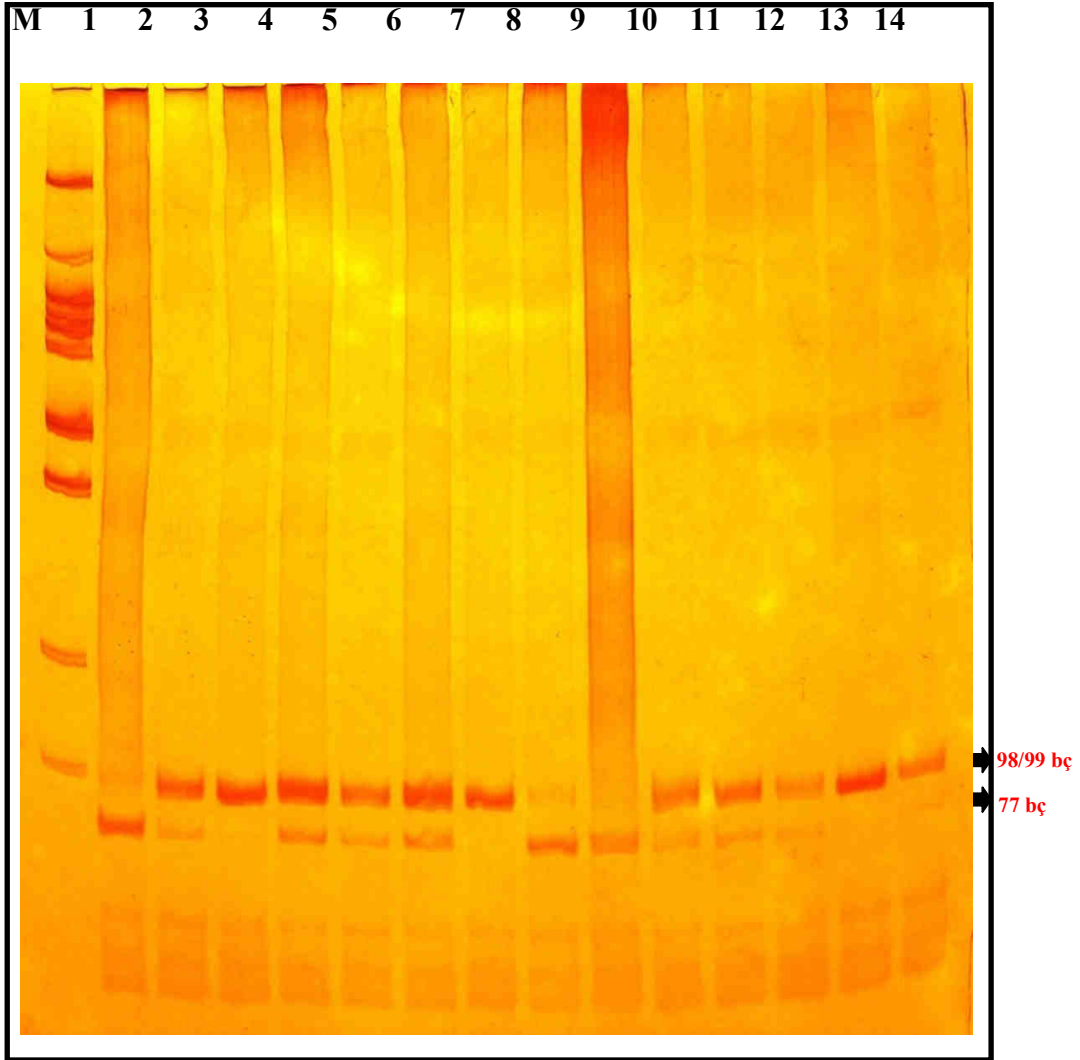
Bu çalışmaya 392 derin ven trombozu/ pediatrik inme tanısı olan 0–18 ve 70 yaş üstü hasta gruplarıyla birlikte, 412 kiŐiden oluşan 0–18 ve 70 yaş üstü kontrol grupları dâhil edilmiştir.

4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon Bulguları



Şekil 4.1. PAI-1 promotor bölgesi 98/99 bç'lik PCR rnlerinin agaroz jel görüntüsü, M (Markır)

4.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) Bulguları



Şekil 4.2. PAI-1 PCR ürünlerinin BseL1 restriksiyon enzimi ile RFLP sonrası PAGE görüntüsü, M (Markır), örnekler 2,4,5,6,10,11,12,14 heterozigot, 1,8,9 5G homozigot ve 3,7,13 4G homozigot

4.3 İstatiksel Analiz Bulguları

Çizelge 4.1. PAI-1 4G/5G gen değişiminin 0-18 yaş ve 70 yaş&üstü gruplar için genotip dağılımı

Yaş Grupları PAI-1 4G/5G	<i>0- 18 yaş</i>	<i>70yaş&üstü</i>	<i>0- 18 yaş</i>	<i>70 yaş&üstü</i>
	<i>Kontrol</i> <i>n=191 (%)</i>	<i>Kontrol</i> <i>n=221 (%)</i>	<i>Hasta</i> <i>n=222 (%)</i>	<i>Hasta</i> <i>n=170 (%)</i>
5G/5G	38 (19.25)	30 (13.57)	57 (25.67)	43 (25.29)
4G/5G	115 (61.50)	148 (66.96)	124 (55.86)	96 (56.47)
4G/4G	38 (19.25)	43 (19.45)	41 (18.47)	31 (18.23)

PAI-1 -675 gen değişiminin hastalara göre dağılımına bakıldığında, 5G/5G genotipine sahip 0–18 yaş grubunda 57 birey (%25.67), 70 yaş ve üstü grupta ise 43 birey (%25.29); 4G/5G genotipine sahip 0–18 yaş grubunda 124 birey (%55.86), 70 yaş ve üstü grupta ise 96 birey (%56.47); 4G/4G genotipine sahip 0–18 yaş grubunda 41 birey (%18.47), 70 yaş ve üstü grupta ise 31 birey (%18.23) bulunmuştur.

Kontrol gruplarının dağılımına bakıldığında ise, 5G/5G genotipine sahip 0–18 yaş grubunda 38 birey (%19.25), 70 yaş ve üstü grupta ise 30 birey (%13.57); 4G/5G genotipine sahip 0–18 yaş grubunda 115 birey (%61.50), 70 yaş ve üstü grupta ise 148 birey (%66.96); 4G/4G genotipine sahip 0-18 yaş grubunda 38 birey (%19.25), 70 yaş ve üstü grupta ise 43 birey (%19.45) bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.2. PAI-1 4G/5G gen değişiminin 0-18 yaşı grubunda değerlendirilmesi

Yaşı Grupları	0- 18 yaşı		OR	CI (%95)	p
	Kontrol n=191 (%)	Hasta n=222 (%)			
PAI-1 4G/5G					
5G/5G	38 (%19.25)	57 (%25.67)	1		
4G/5G	88 (%59.1)	124 (%55.86)	0.71	0.44-1.16	0.27
4G/4G	31 (%20.8)	41 (%18.47)	0.72	0.39-1.31	0.84

0–18 yaşı grubunda 4G/5G genotipinde 0.44–1.16 güven aralığında OR değeri 0.71, 4G/4G genotipinde ise 0.39–1.31 güven aralığında 0.84 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.3. PAI-1 4G/5G gen değişiminin 70 yaş ve üstü grubunda değerlendirilmesi

Yaş Grupları	70 yaş&üstü		OR	CI (%95)	P
	Kontrol n=221 (%)	Hasta n=170 (%)			
PAI-1 4G/5G					
5G/5G	30 (%13.57)	43 (%25.29)	1		
4G/5G	148 (%66.96)	96 (%56.47)	0.45	0.26–0.77	0.003
4G/4G	43 (%19.45)	31 (%18.23)	0.50	0.26–0.96	0.03

70 yaş ve üstü grupta 4G/5G genotipinde 0.26–0.77 güven aralığındaki OR 0.45 iken 4G/4G genotipinde 0.26–0.96 güven aralığındaki OR 0,5 olarak bulunmuş ve bu değerler sırasıyla 0.003 ve 0.03 p-değerleriyle anlamlandırılmıştır (Çizelge 4,3).

Çizelge 4.4. PAI-1 4G/5G gen değişiminin 0-18 yaş grubunda değerlendirilmesi

Yaş Grupları	0-18 yaş		OR	CI (%95)	P
	Kontrol n=191 (%)	Hasta n=222 (%)			
PAI-1 4G/5G					
4G/4G	38 (%19.89)	41 (%18.46)	1		
4G/5G	115 (%60.20)	124 (%55.85)	0.99	0.6-1.6	0.9
5G/5G	38 (%19.89)	57 (%25.67)	1.39	0.7-2.5	0.2

PAI-1 -675 polimorfizminde 5G alleli açısından hastalara göre dağılıma bakıldığında ise 0–18 yaş grubunda 4G/5G genotipinde 0.6–1.8 güven aralığında OR değeri 0.99, 5G/5G genotipinde ise 0.7–2.5 güven aralığında 1.39 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.5: PAI-1 4G/5G gen değişiminin 70yaş&üstü grubunda değerlendirilmesi

Yaş Grupları	70 yaş&üstü		OR	CI (%95)	P
	Kontrol n=221 (%)	Hasta n=170 (%)			
PAI-1 4G/5G					
4G/4G	43 (%15.38)	31 (%25.29)	1		
4G/5G	148 (%66.96)	96 (%56.47)	0.89	0.5- 1.5	0.6
5G/5G	30 (%17.65)	43 (%18.24)	1.98	1.0- 3.8	0.03

70 yaş ve üstü grupta 4G/5G genotipinde 0,5–1,5 güven aralığındaki OR değer, 0.89 iken 5G/5G genotipinde 1,0–3,8 güven aralığındaki risk katsayısı 1.98 olarak bulunmuş ve bu değer 0.03 p-değerleriyle anlamlandırılmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.6. 0–18 yaş kontrol ve hasta grubunda 4G ve 5G alelleri için frekans dağılımları

PAI-1	0-18 Yaş Kontrol	0-18 Yaş Hasta	OR	CI (%95)	P
4G	191 (0.50)	206 (0.46)	1		
5G	191 (0.50)	238 (0.54)	1.15	0.80-1.50	0.06

Çizelge 4.7. 70 yaş ve üstü kontrol ve hasta grubunda 4G ve 5G alelleri için frekans dağılımları

PAI-1	70 Yaş&üstü Kontrol	70 Yaş&üstü Hasta	OR	CI (%95)	P
4G	234 (0.53)	158 (0.46)	1		
5G	208 (0.47)	182 (0.54)	1.29	0.9-1.7	0.06

0–18 grubunda 191 kontrol ve 206 hasta, 70 yaş ve üstünde ise 234 kontrol ve 158 hasta grubunda 4G alleli, 0–18 grubunda 191 kontrol ve 238 hasta, 70 yaş ve üstünde 208 kontrol 182 hastaya ait 5G alleli tespit edilmiştir. 0–18 yaş grubu için hesaplanan risk katsayısı 1.15 iken 70 yaş üstü için hesaplanan risk katsayısı 1.29 olarak bulunmuştur. Her iki grup için de p-değeri 0.06 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.8. FV 1691 G-A ve PAI-1 -675 4G/5G gen değişimleri birlikteliğinin 0-18 yaş kontrol ve hasta gruplarındaki risk değerlendirmesi

Yaş Grupları	Yaş Grupları	0-18 Yaş	0-18 yaş	OR	(CI% 95)	P
		Kontrol n=221 (%)	Hasta n=170 (%)			
FV 1691 G-A	PAI-1 4G/5G					
	G/G	34 (17.80)	50 (22.52)	1		
	G/G	102 (53.40)	104 (46.84)	0.69	0.41-1.15	0.15
	G/G	32 (16.75)	34 (15.31)	0.72	0.37-1.38	0.67
	G/A	4 (2.09)	5 (2.25)	0.85	0.21-3.39	0.89
	G/A	12 (6.28)	21 (9.46)	1.19	0.51-2.73	0.68
	G/A	6 (3.14)	5 (2.25)	0.56	0.16-2.00	0.58
	A/A	-	2 (0.90)	2.72	0.11-62.18	0.99
	A/A	1 (0.52)	1 (0.45)	0.68	0.04-11.24	0.65
	A/A	-	-	0.68	0.01-35.10	0.58

0-18 yaş hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, FV açısından gen değişimi olmadığı durumda 4G alelinin heterozigot olarak taşınması 0.69, homozgot olarak taşınması ise 0.72 OR değeri getirdiği hesaplanmıştır. FV G/A ve PAI-1 4G/5G

durumunda risk katsayısı 1.19 iken 4G homozigot olarak bulunduğu durumda OR değeri 0.56 olarak hesaplanmıştır. FV A/A ve PAI-1 5G/5G olarak taşındığı durumda 2.72 kat risk getirirken, 4G heterozigot veya homozigot olarak bulunduğu durumda OR değeri 0.68 olarak hesap edilmiştir. (Çizelge 4,8)

Çizelge 4.9. FV 1691 G-A ve PAI-1 -675 4G/5G gen değişimleri birlikteliğinin 70 yaş ve üstü kontrol ve hasta gruplarındaki risk değerlendirmesi

Yaş Grupları	Yaş Grupları	70	70	OR	(CI%95)	P
		Yaş&üstü Kontrol n=221 (%)	yaş&üstü Hasta n=170 (%)			
FV 1691 G-A	PAI-1 4G/5G					
	G/G	28 (12.6)	39 (22.94)	1		
	G/G	130 (58.82)	80 (47.05)	0.44	0.25-0.77	0.004
	G/G	40 (18.09)	27 (15.88)	0.48	0.24-0.96	0.03
	G/A	2 (0.90)	4 (2.35)	1.43	0.24-8.39	0.97
	G/A	18 (8.14)	14 (8.23)	0.55	0.23-1.30	0.17
	G/A	3 (1.35)	4 (2.35)	0.95	0.19-4.61	0.72
	A/A	-	-	0.71	0.01-37.28	0.60
	A/A	-	1 (0.58)	1.43	0.05-44.30	0.53
A/A	-	1 (0.58)	1.43	0.05-44.30	0.53	

70 yaş ve üstü hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, FV açısından gen değişimi olmadığı durumda 4G alelinin heterozigot olarak taşınması 0.44, homozigot olarak taşınması ise 0.48 OR değeri getirdiği hesaplanmış, bu değerler sırasıyla 0.004 ve 0.03 p-değerleriyle anlamlandırılmıştır. FV G/A ve PAI-1 5G/5G olarak taşındığında risk katsayısı 1.43 iken 4G heterozigot olarak bulunduğu durumda OR değeri 0.55, homozigot olarak bulunduğu ise OR değeri 0.95 olarak hesaplanmıştır. FV A/A ve PAI-1 5G/5G olarak taşındığı durumda OR değeri 0.71 ve 4G heterozigot veya homozigot olarak bulunduğu OR değeri 1.43 olarak hesap edilmiştir. (Çizelge 4,9)

Çizelge 4.10. FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A gen değişimlerinin görülmediği 0–18 yaş bireyler için PAI-1 4G/5G gen değişiminin kontrol ve hasta gruplarındaki korelasyonu

Yaş Grupları	0- 18 yaş		OR	(CI%95)	P
	Kontrol n=126 (%)	0–18 yaş Hasta n=188 (%)			
PAI-1					
4G/5G					
5G/5G	27 (21.43)	42 (22.34)	1		
4G/5G	74 (58.73)	119 (63.30)	1.03	0.58-1.81	0.9
4G/4G	25 (19.84)	27 (14.36)	0.69	0.33-1.43	0.6

0–18 yaş aralığında FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A gen değişimlerinin görülmediği hasta ve sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında, 4G alelinin heterozigot olarak taşınması durumunda 1.03 risk getirdiği, homozigot olarak bulunması durumunda ise OR değerinin 0.69 olarak hesaplandığı görülmektedir.

Çizelge 4.11. FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A gen değişimlerinin görülmediği 70 yaş ve üstü bireyler için PAI-1 4G/5G gen değişiminin kontrol ve hasta gruplarındaki korelasyonu

Yaş Grupları PAI-1 4G/5G	70 yaş&üstü Kontrol n=193 (%)	70 yaş&üstü Hasta n=150 (%)	OR	(CI%95)	P
	5G/5G	24 (12.44)	34 (22.66)	1	
4G/5G	136 (70.47)	94 (62.66)	0.48	0.27-0.87	0.01
4G/4G	33 (17.10)	22 (14.66)	0.47	0.22-0.99	0.04

70 yaş ve üstü grup için FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A gen değişimlerinin görülmediği hasta ve sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında, 4G alelinin heterozigot olarak taşınması durumunda OR değerinin 0.48 homozigot olarak bulunması durumunda ise OR değerinin 0.47 olarak hesaplandığı görülmektedir. 4G alelinin koruyucu heterozigotluğu durumunda 0.01 ve homozigotluğu 0.04 p-değerleriyle anlamlandırılmıştır.

Çizelge 4.12. FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A gen değişimlerinin görölmediği 0–18 yaşı bireyler için alel frekans dağılımları

PAI-1	0-18 Yaşı Kontrol	0-18 Yaşı Hasta	OR	CI (%95)	P
5G	128 (0.51)	203 (0.54)	1		
4G	124 (0.49)	173 (0.46)	0.88	0.64-1.21	0.5

Çizelge 4.13. FV 1691 G-A ve PT 20210 G-A gen değişimlerinin görölmediği 70 yaşı ve üstü bireyler için alel frekans dağılımları

PAI-1	70 Yaşı&üstü Kontrol	70 Yaşı&üstü Hasta	OR	CI (%95)	P
5G	184 (0.48)	162 (0.54)	1		
4G	202 (0.52)	138 (0.46)	0.78	0.57-1.04	0.09

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda uzun yaşam genleriyle ilgili çalışmalar, “hasara karşı gelişen cevap” teorisinin de ortaya konulmasıyla farklı bir boyut kazanmıştır. Hasar yaratabilecek oluşumlardan bu teoride yer alanlardan en önemlisi metabolik olaylardır. Teoriye göre meydana gelen hasarlarla oluşan birikime karşı yanıt oluşumu gerçekleşmektedir. Bu mekanizmada genetik kontrolü sağlayan genlere “uzun yaşam genleri” denilmektedir (Jazwinski et al. 1996)

Hemostazın korunmasında prokoagülan ve antikoagülan faktörler arasındaki hassas dengenin korunabilmesi gerekmektedir. Çeşitli kontrol mekanizmaları bulunmasına rağmen dengenin koagülasyon yönünde bozulması sağlam damarlarda trombus oluşumuna ve yaşam açısından riskli klinik tabloların oluşumuna neden olabilir. Tromboz tek başına veya diğer hastalıklarla birlikte ortaya çıkabilen birçok faktörün ve genin etmen olduğu önemli bir hastalıktır. Damar duvarındaki değişiklikler, kan akım hızları ve koagülasyon mekanizmasında ortaya çıkan bozukluklar tromboza yol açabilir.

Faktör V hemostazda başlıca düzenleyici rol oynar (Tracy et al. 1987). İnaktif olarak sentezlenen Faktör V öncüsü, serin proteaz faktör Xa ile birlikte protrombinaz kompleksi oluşturur. Bu kompleks protrombini aktif trombin haline dönüştürür. Faktör V’de mutasyon sonucu 506. sırada bulunan Arginin amino asitinin Glutamine değişimiyle ortaya çıkan Faktör V Leiden (FVL), bireylerde sık görülen trombozun önemli bir risk faktörüdür. Bu mutasyon sonucu FV aktif protein C (APC) ye karşı dirençli hale gelir. Koagülasyon sisteminde görülen bu gibi bozukluklar kalıtsal tromboz için bir risk faktörü oluşturur ve FV1691A mutasyonu da bir risk faktörüdür (Margaglione et al. 1997). Bazı gen değişimleri tromboz geçirme riskini artırır (Ny et al. 1986). Bunlardan biri de PAI-1 geni değişimleridir (Rosendaal et al. 1997).

Daha önce yapılan çalışmalar ışığında tromboz hastalarında artan plazminojen aktivator inhibitörü-1 (PAI-1) seviyeleri sonucu fibrinolitik aktivitenin azaldığı belirtilmiştir. PAI-1 artan plazma seviyesi ise genin promoter bölgesinin transkripsiyon başlama sekansından 675 baz çifti yukarıda görülen 4G/5G insersiyon/delesyon

polimorfizmiyle ilişkilendirilmiştir. PAI-1 4G/5G polimorfizminin birçok ölümcül hastalığın patogeneğinde rol oynayabileceği düşünüldüğünden, bireylerin uzun yaşamasının da bu gen değişiminden etkilenebileceği ileri sürülebilir.

Önceki yıllarda yapılan çalışmalar, 4G allelinin birçok genetik risk faktörleri için arttırıcı rolü olduğunu kanıtlar niteliktedir. (Visanji et al.,) FaktörVLeiden için bir risk faktörü olduğunu belirtirken Barcellona et al. da Protrombin200210 mutasyonu için bir enhanser rolü olduğunu bulmuşlardır. Protein S eksikliği için 4G alleli Zöller&ark. tarafından bir risk faktörü olarak nitelendirilmiştir. Ayrıca antifosfolipid sendromu (Tassies et al.) ve Obezite (Akar et al.) için de 4G allelinin bir risk getirdiği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır.

2003 yılında Schouten &ark. larının yaptıkları çalışmaya göre 4G alelinin inme için ilerleyen yaşlarda koruyucu bir rolü olduğu bulunmuştur.100 yaşını aşmış Danimarkalı ve İskoç grupların yer aldığı Mannucci&ark.'nın çalışmasında, PAI-1 aleli ve genotip frekans dağılımı gençlerden oluşan kontrollerle farklılık göstermiştir (Mannucci et al. 1997). Bir başka 100 yaş üzeri İtalyanlar ve kontrol grubuyla yapılan araştırmaya göre 4G alelinin uzun yaşamla ilişkili olduğu fakat cinsiyetle ilişkilendirilmediği öne sürülmüştür (Mannucci PM et al. 1997).

PAI-1 geninin uzun yaşamla ilişkili olabileceğini öne süren Bruce M. Psaty &ark fibrinolitik aktivite veya proteoliz modülatörlerinin yaşlanma veya yaşlılıkla ilgili hastalıklarda genel bir etkisi olabileceğini belirtmişlerdir.

Yon Ko&ark. yaptığı araştırmada 4G/5G PAI-1 polimorfizminin allel dağılımları, 80 yaş ve üstü gruplarda bakıldığında ve daha önceki yayınlarda çalışılan farklı yaş gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik göstermediği bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak, farklı genetik değişkenler ve çevresel faktörlerin uzun yaşam açısından PAI-1 4G/5G polimorfizmden daha güçlü bir belirleyici olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda, 0-18 yaş ile 70 yaş üstü gruplarda PAI-1 -675 4G/5G gen değişimine bakıldığında, 4G aleli koruyucu bir etki gösterirken, 5G alelinin ise hastalık açısından risk getirdiği bulunmuştur. 4G aleli tromboz vakalarında homozigot ve

heterozigot olarak bulunması durumunda yaşam uzatıcı olurken, 5G aleli ise tromboz açısından risk getirici olduğundan uzun yaşamı negatif olarak etkilemektedir

6. KAYNAKLAR

- Bick R. Vascular thrombohemorrhagic disorders: hereditary and acquired. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2001;7:178-94.
- Bladbjerg Else M., Andersen-Ranberg Karen, de Maat Monrek PM, Kristensen Soren Risom, Jeune Bernard, Gram Jorgen, Jespersen Jorgen. Longevity is Independent of Common Variations in Genes Associated with Cardiovascular Risk. *Thromb Haemost.* 1999;82:1100.
- Bladbjerg EM, de Maat MP, Christensen K, Bathum L, Jespersen J, Hjelmberg J. Genetic influence on thrombotic risk markers in the elderly--a Danish twin study. *J Thromb Haemost.* 2006 Mar;4 (3):599-607.
- Broze GJ Jr. Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 8–13.
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005; 129: 307–21.
- Chesney CM, Pifer D, Colman RW. Subcellular localization and secretion of factor V from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:5180–5184.
- Cooper ST, Whinna HC, Jackson TP, Boyd JM, Church FC. Intermolecular interactions between protein C inhibitor and coagulation proteases. *Biochemistry* 1995; 34: 12991–7.
- Dahlback B, Villoutreix BO. The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 2005; 579: 3310–6.
- Esmon CT. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003;1: 1343–8.
- Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003; 3 (Suppl. 3): 26–32.
- Fay WP, Parker AC, Condrey LR, et al. Human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) deficiency: characterization of a large kindred with a null mutation in the PAI-1 gene. *Blood.* 1997; 90: 204-208.
- Federman DG, Kirsner RS. An update on hypercoagulable disorders. *Arch Intern Med.* 2001;161:1051-56.

- Francis CW., Plasminogen activator inhibitor-1 levels and polymorphisms. *Arch Pathol Lab Med.* 2002 Nov;126 (11):1401-4.
- Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 17491–8.
- Gemmati D, Serino ML, Moratelli S, TAognazzo S, Ongaro A, Scapoli GL. Coexistence of factor V G1691A and factor II G20210A gene mutations in a thrombotic family is associated with recurrence and early onset of venous thrombosis. *Haemostasis.* 2001;31:99-105.
- Greenfield L, *Venous and Lymphatic Disease, Principles of Surgery.* 1994;6: 989-1014.
- Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen TI, Harvald B, Vaupel JW. The heritability of human longevity: a population based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Hum Genet* 1996;97:319-23.
- Hoffman M, Monroe DM. *Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis.* *Hematol. Oncol Clin North Am* 2007;21:1-11.
- Iishi H, Tatsuta M, Baba M, et al. Suppression by amiloride of bombesin-enhanced peritoneal metastasis of intestinal adenocarcinomas induced by azoxymethane. *Int J Cancer.* 1995; 63: 716-719.
- Jan Vijg, Yousin Suh, *Genetics of Longevity and Aging.* *Annu. Rev. Med.* 2005. 56:193–212.
- Jazwinski SM. Longevity, genes, and aging. *Science* 1996;273:54-9.
- Jenny RJ, Pittman DD, Toole JT, Kriz RW, Aldape RA, Hewick MH, Kaufman RJ, Mann KG. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:4846–4850.
- Kandice Kettke-Marchant, MD, PhD. *Genetic Polymorphisms Associated With Venous and Arterial Thrombosis.* *Arch Pathol Lab Med-Vol126,* 2002.
- Kane WH, Ichinose A, Hagen FS, Davie EW. Cloning of cDNAs coding for the heavy chain region and connecting region of human factor V, a blood coagulation factor with four types of internal repeats. *Biochemistry.* 1987;26:6508–6514.
- Kirkwood TB. 1977. Evolution of ageing. *Nature* 270:301–4.
- Kwaan HC, Keer HN, Radosevich JA, et al. Components of the plasminogen-plasmin system in human tumor cell lines. *Semin Thromb Hemost.* 1991; 17: 175-182.

- Lee R. Factor V Leiden: a clinical review. *Am J Med Sci.* 2001;322:88-102.
- Leebeek FW, Stadhouders NA, van Stein D, Gomez-Garcia EB, Kappers-Klunne MC. Hypercoagulability states in upper-extremity deep venous thrombosis. *Am J Hematol.* 2001;67:15-19.
- Libina N, Berman JR, Kenyon C. 2003. Tissue-specific activities of *C. Elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* 115:489–502.
- Lu D, Kalafatis M, Mann KG, Long GL. Comparison of activated protein C/protein S-mediated inactivation of human factor VIII and factor V. *Blood* 1996; 87: 4708–17.
- Ma LJ, Fogo AB. PAI-1 and kidney fibrosis. *Front Biosci.* 2009; 14: 2028-2041.
- Mannucci PM, Mari D, Merati G, Peyvandi F, Tagliabue L, Sacchi E, Taioli E, Sansoni P, Bertolini S, Franceschi C. Gene polymorphisms predicting high plasma levels of coagulation and fibrinolysis proteins. A study in centenarians. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997.
- Mansilha A, Araujo F, Sampaio S, Cunha Ribeiro LM, Braga A. The PORtromb Project: prothrombin G20210A mutation and venous thromboembolism in young people. *Cardiovasc Surg.* 2002;10:45-48.
- Margaglione M, Grandone E, Capucci G, Giuliani N, Vechione G, De Addeda M, Minno G. An alternative method for PAI-1 promoter polymorphism (4G/5G) typing. *Thromb Haemost* 1997;77:605–6.
- Miles LA, Hawley SB, Baik N, Andronicos NM, Castellino FJ, Parmer RJ. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Front Biosci* 2005; 10: 1754–62.
- Mosnier LO, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2445–53.
- Ngo TH, Hoylaerts MF, Knockaert I, et al. Identification of a target site in plasminogen activator inhibitor-1 that allows neutralization of its inhibitor properties concomitant with an allosteric up-regulation of its antiadhesive properties. *J Biol Chem.* 2001; 276: 26243-26248.
- Ny, T., Sawdey, M., Lawrence, D., Millan, J., and Loskutoff, D. Cloning and sequence of a cDNA coding for the human a-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 6776-6780.

- Oeppen, James; Vaupel, James W, Broken limits to life expectancy. 2002, *Science*, 296:5570, 1029- 1031.
- Ossowski L. In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface-bound urokinase. *J Cell Biol.* 1988; 107: 2437-2445.
- Owen CA Jr, Bowie EJ. Generation of coagulation factors V, XI, and XII by the isolated rat liver. *Haemostasis.* 1977;6:205-212.
- Perls T, Kunkel LM, Puca AA. The genetics of exceptional human longevity. *J Mol Neurosci.* 2002 Aug-Oct;19 (1-2):233-8.
- Pike RN, Buckle AM, le Bonniec BF, Church FC. Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS J* 2005; 272: 4842–51.
- Rosenberg RD. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states: clinical utility of activation peptide assays in predicting thrombotic events in different clinical populations. *Thromb Haemost.* 2001;86:41-50.
- Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk, and interaction. *Seminars in Hematology* 1997;34:171-87.
- Sampayo JN, Gill MS, Lithgow GJ. 2003.Oxidative stress and aging—the use of superoxide dismutase/catalase mimetics to extend lifespan. *Biochem. Soc. Trans.*31:1305–7.
- Sandset PM. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) – an update.*Haemostasis* 1996; 26 (Suppl. 4): 154–65.
- Schalkwijk CG, Stehouwer CD. PAI-1 inhibition in obesity and the metabolic syndrome: a promising therapeutic strategy. *Thromb Haemost.* 2006; 96: 698-699.
- Schenk JF, Stephan B, Zewinger S, et al. Comparison of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism in females with venous thromboembolism during pregnancy or spontaneous abortion. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008; 39: 329-332.
- Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10212–6.
- Tollefsen DM. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 454–60.

- Tracy PB, Eide LL, Bowie EJ. Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets. *Blood*. 1982;60:59–63.
- Tracy PB, Mann KG. Abnormal formation of the prothrombinase complex: factor V deficiency and related disorders. *Hum Pathol*. 1987;18:162-169.
- Meijer M, Smilde A, Tans G, Nesheim ME, Pannekoek H, Horrevoets AJ. The suicide substrate reaction between plasminogen activator inhibitor 1 and thrombin is regulated by the cofactors vitronectin and heparin. *Blood* 1997; 90: 1874–82.
- Wilson DB, Salem HH, Mruk JS, Maruyama I, Majerus PW. Biosynthesis of coagulation factor V by a human hepatocellular carcinoma cell line. *J Clin Invest*. 1984;73:654–658.
- Wiman B, Collen D. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature* 1978; 272: 549–50.

ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı: Zerrin Gülin Gülbahar

Doğum Tarihi: 01.03.1983

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Durumu: Bekar

Yabancı Dili:

İngilizce(İleri Seviyede)

Almanca(Başlangıç)

Eğitim Durumu:

2002-2007 Bilkent Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

2001-1998 Özel Arı Lisesi

Staj: 2004-Gen-Med Laboratuvarları

2005-Bilkent Üniversitesi Genetik Laboratuvarı

Katıldığı Kongreler:

4-5 Mayıs 2006-Genetik Regülasyon ve Kanser Sempozyumu-Bilkent Üniversitesi

13-14 Kasım 2008- VII. Biyoteknoloji Günleri-Ankara Üniversitesi

25 Mart 2009- I.Prof.Dr Orhan Ulutin Trombogenetik Sempozyumu-Marmara Üniversitesi

27-30 Eylül 2009- Biyoteknoloji: Gelişmeler ve Trendler- Ortadoğu Teknik Üniversitesi

28-30 Nisan 2010- I.Prof.Dr Orhan Ulutin Trombogenetik Sempozyumu-
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (Sözlü Sunum)

Tezler ve Yayınlar:

Dursun A, Durakbasi-Dursun HG, Zamani AG, Gulbahar ZG, Dursun R, Yakicier C. Genetic Analysis of MEFV Gene Pysin Domain in PatientsWith Behçet's Disease, Mediators Inflamm. 2006;2006(3):41783

Ocak 2006- Mayıs 2007- Hepatoselüler ve Tiroid Karsinomalarda Aday Gen Araştırması- Bitirme Tezi