

T.C  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HOMOZİGOT FVL TAŞIYICILARINDA *F5* GENİ PROMOTOR  
BÖLGESİNDE YER ALAN -426G/A GEN DEĞİŞİMİNİN ETKİSİ

Arjan Jalil Esmael

Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. Nejat AKAR

ANKARA  
2010

## KABUL ONAY

Prof.Dr. Nejat AKAR danışmanlığında Arjan Jalil Esmael tarafından hazırlanan bu çalışma, ..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof Dr. Nejat AKAR

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Ankara'da Yüksek Lisans eğitimimin süresince, master diploması kadar benim için önemli olan, manevi ve geniş bir çevreye sahip olmak oldu. Bu çevremdekileri büyük ailem olarak benimsedim, en başında danışmanım değerli hocam Sayın Prof.Dr. Nejat AKAR geliyor. Değerli hocamın bana her zaman verdiği her türlü destekten ömür boyu minnetdarım.

Bu tezin deney aşamasından yazılmasına kadar, değerli fikirleriyle ve her zaman yanımda olan, Bio. Dr.Ayşenur ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İlgi ve sevgisini, ihtiyaç duyduğumuz zaman, güler yüzlü Uzm. Bio. Ece AKAR'a saygılarımla, ne denli teşekkür etsek azdır.

Tez çalışmalarımızın en önemli materyali olan DNA'ların izole edilmesini sağlayan ve bizlere her zaman yardımcı olan Bio. Emel USLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yardıma gerek duyduğumuzda, her an yardımımıza gelen, bilgisini bize aktarmaktan sevinç duyan ve yardımını esirgemeyen Uzm. Bio. Yonca EĞİN'e çok teşekkürler.

Çalışmam süresince bilgi ve önerilerini esirgemeyen birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, keyifli birçok anı paylaştığımız çalışma arkadaşlarım; Uzm. Bio. Özge CUMAOĞULLARI, Tek. Kadir SİPAHİ, Tek. Çiğdem ARSLAN, Uzm. Bio. Didem TORUN, Uzm. Bio. Dilara Fatma Akın, Uzm. Bio Afife KARABIYIK ,Bio. Gülin GÜLBAHAR, Bio. Sezen BALLI, Uzm. Bio. Duygu DUMAN ve ismini daha sayamadığım tüm Pediatrik Moleküler Genetik Ailesi' ne; nice teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan Annem, Babam ve Kardeşime teşekkürlerimi sunarım...

## ÖZET

Kan pıhtılaşma faktörü V (FV), hemostazda hem prokoagülant hem de antikoagülant yollarda önemli rol oynayan bir proteindir. Genetik ve edinsel bozukluklar, FV molekülünün aktivitesini veya ekspresyon düzeyini etkileyerek trombotik veya hemorajik olaylara neden olabilmektedir. Venöz tromboz hastalarında FVL mutasyonu vakaların %20'sinde görülmekte olup, seçilen trombofili hastalarında bu oran %50'ye kadar ulaşmaktadır. FVL mutasyonu, koagülasyon inhibitörlerinin eksiklikleri ile aynı etkide risk faktörü olarak görülmektedir. Mutasyonu heterozigot olarak taşımanın tromboz açısından 5 kat risk getirdiği gözlenirken, homozigotluğunun ise bu riski 50-100 kat arasında arttırdığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, FVL mutasyon tespiti için eş zamanlı PCR (Real-Time PCR) tekniği kullanılmıştır. *F5* geni, promotor bölgesi için uygun primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle amplifiye edilmiştir. RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) yöntemiyle elde edilen bant profilleri %3'lük agaroz jelde görüntülenerek -426 G/A gen değişimi saptanmıştır.

*F5* geni promotor bölgesinde yer alan -426 G/A gen değişiminin tromboz oluşumu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. FVL mutasyonunu homozigot olarak taşıyan, tromboz geçirmiş ve geçirmemiş bireylerde, -426 G/A gen değişiminin tromboz oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. FVL mutasyonunu homozigot olarak taşıyan tromboz geçirmiş ve geçirmemiş bireyler arasında -426 G/A polimorfizminin genotip ve allel dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

**Anahtar Kelimeler :** Koagülasyon faktörü V, *F5* geni, FVL, Mutasyon, Polimorfizm

## ABSTRACT

Blood clotting factor V is a protein that plays an important role in both procoagulant and anticoagulant pathways of hemostasis. Genetic and acquired disorders can lead to thrombotic and hemorrhagic events by affecting the activity or expression of FV molecule. FVL mutation is seen in 20% of patients with venous thrombosis and this proportion rises to 50% in selected thrombophilia patients. FVL mutation is a risk factor with the same effects as coagulation inhibitor deficiencies. The risk of thrombosis increases 5-fold with heterozygote mutation while a 50-100 fold increase in thrombosis is seen with homozygote mutation.

In this study, real time PCR technique is used to detect FVL mutation. F5 gene is amplified by polimerase chain reaction (PCR) using appropriate primers for promotor region. -426 G/A change is detected by imaging band profiles obtained by RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfizm) in 3% agaroz gel.

The objective of this study is to find the effect of -426 G/A gene change present in the promotor region of F5 gene on thrombosis. The effect of -426 G/A gene change on thrombosis in individuals who are homozygote for FVL mutation and have or have not had a thrombotic episode is investigated. No significant difference with respect to genotype and allele distribution of -426 G/A polimorfizm was detected between homozygote carriers of the FVL mutation who did or did not suffer a thrombotic episode.

**Key words:** Coagulation factor V, F5 gene, FVL, Mutation, Polimorfizm

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER DİZİNİ .....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
DİZİLER LİSTESİ.....	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. HEMOSTAZ .....	3
2.1.1. Vasküler Endotel .....	3
2.1.2. Trombositler .....	4
2.1.3. Koagülasyon Sistemi .....	6
2.1.3.1. Ekstrinsik Yol .....	7
2.1.3.2. İntrinsik Yol .....	8
2.2. HEMOSTAZDA BİYOLOJİK KONTROL .....	8
2.2.1. Feed-Back İnhibisyon .....	9
2.2.2. Fibrinoliz .....	9
2.2.3. Doğal İnhibitörler .....	10
2.3. TROMBOZ .....	10
2.4. Faktör V .....	13
2.4.1. Faktör V Gen Değişimleri ve Faktör V Leiden (1691 G-A) Mutasyonu.....	15
2.4.2. Faktör V Geninde Yer Alan Diğer Gen Değişimleri.....	17
2.4.3. F5 -426 G/A Gen Değişimi .....	18
2.5. MOLEKÜLER TEKNİKLER .....	19
2.5.1. Kullanılan Çözeltiler .....	19
2.5.2. DNA Ekstraksiyonu.....	19

2.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( PCR ) .....	19
2.5.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR) .....	21
2.5.5. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kesim .....	24
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. YÖNTEM .....</b>	<b>25</b>
3.1.1. DNA İzolasyonu .....	25
3.1.2. FV 1691 G – A Değişiminin Belirlenmesi .....	26
3.1.3 -426 G/A Polimorfiziminin İncelenmesi .....	28
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>30</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>31</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>33</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>40</b>

## SİMGELER DİZİNİ

<b>A</b>	: Adenin bazı
<b>APC</b>	: Aktif Protein C
<b>Arg</b>	: Arginin aminoasidi
<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>C</b>	: Sitozin bazı
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>ddH20</b>	: Deiyonize Su
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotid tri fosfat
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleotid
<b>DVT</b>	: Derin Ven Trombozu
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetikasit
<b>FVL</b>	: Faktör V Leiden
<b>G</b>	: Guanin bazı
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>kDa</b>	: Kilo dalton
<b>LDL</b>	: Düşük dansiteli Lipoprotein
<b>Lip (a)</b>	: Lipoprotein a
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>M</b>	: Molar
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>p</b>	: Kromozomun kısa kolu
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PT</b>	: Protrombin
<b>Pmol</b>	: Pikomol
<b>RBC</b>	: Red Blood Cell
<b>RFLP</b>	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi



<b>q</b>	: Kromozomun uzun kolu
<b>T</b>	: Timin bazı
<b>vWF</b>	: von Willebrand Faktör
<b>FII</b>	: Protrombin
<b>FVIII</b>	: Faktör VIII, Antihemofilik Faktör
<b>FVIIIa</b>	: Aktif Faktör VIII
<b>FVII</b>	: Faktör VII
<b>FVIIa</b>	: Aktif Faktör VII
<b>FVL</b>	: Faktör V Leiden
<b>FIX</b>	: Faktör IX
<b>FIXa</b>	: Aktif Faktör IX
<b>FX</b>	: Faktör X
<b>FXa</b>	: Aktif Faktör X
<b>FXII</b>	: Hageman Faktör
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>kb</b>	: Kilo Baz
<b>TE</b>	: Tris EDTA
<b>TBE</b>	: Tris borik asit, EDTA

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa No:</b>
<b>Tablo 2.1.</b> Edinsel Tromboz Nedenleri .....	12
<b>Tablo 2.2.</b> Belirlenmiş Kalıtsal Tromboz Risk Faktörleri.....	13
<b>Tablo 3.1.</b> Light Cycler cihazında kullanılan FVL kiti içerikleri ve reaksiyonda kullanılan miktarlar .....	27
<b>Tablo 3.2.</b> Light Cycler cihazında FVL analizinde kullanılan primer dizileri ve hibridizasyon problemleri .....	27
<b>Tablo 4.1.</b> FVL (+/+) tromboz geçiren hastalar ile kontrol gruplarında -426 G/A polimorfizminin genotip dağılımı .....	30

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No:
Şekil 2.1. Koagülasyon Sistem .....	7
Şekil 2.2. Faktör V molekülünün kesim noktalarının şematik gösterilmesi.....	15
Şekil 2.3. kromozom üzerinde F5 geni lokalizasyon.....	15
Şekil 2.4. Light Cycler mutasyon analiz yönteminin çalışma prensibi .....	23
Şekil 2.5. Erime Eğrisi Analizi: Faktör V Leiden oluşabilecek genotiplerin görünümü.....	23
Şekil 2.6. LC FVL primerlerinin bağlanarak çoğalttıkları gen bölgesi .....	28

## RESİMLER DİZİNİ

**Resim**

**Sayfa No:**

<b>Resim 3.1.</b> Polimeraz Zincir Reaksiyonu Görüntüsü.....	29
<b>Resim 3.2.</b> Enzimle Kesim ve Agaroz Jel Elektorforez Görüntüsü.....	29

## DİZİLERİN LİSTESİ

<b>Dizi</b>	<b>Sayfa No:</b>
<b>Dizi 3.1.</b> FV geni için gerçek zamanlı PCR ile çoğaltılmış dizi.....	28
<b>Dizi 3.2.</b> PCR reaksiyonuyla çoğaltılan bölge.....	29

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kan, endotelle kaplı kan damarları içinde dolaşır. Damar zedelendiğinde, kanamayı durdurmak için trombüs adı verilen kan pıhtısı oluşturulur. Normal fizyolojik koşullarda prokoagulant ve antikoagulant mekanizmalar dengededir. Dengenin bozulması halinde, tromboemboli ya da kanamayla kendini gösteren patolojik durumlar ortaya çıkar (Eskandari *et al.* 2002). Normal bir koagülasyon akışında hasarlı damarda kanın pıhtılaşması normal hemostazı sağlarken, sağlam damar içinde pıhtılaşmanın meydana gelmesi tromboza neden olmakta, sonucunda ise hücre ve dokuların ölümü yani infarkt meydana gelmektedir. Beyin, kalp ve akciğerde oluşan tromboembolitik infarktlar gelişmiş ülkelerde başta gelen ölüm nedenlerindedir (Kumar *et al.* 1992).

Dünya çapında çok önemli morbidite ve mortalite etmenlerinden biri olan trombozun oluşumu multifaktoriyeldir. Birden fazla kalıtsal ve edinsel faktörün çeşitli mekanizmalarla tromboz oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Rossendaal 1999). Arteriyel ve venöz sistemde farklı etiyojilerin rol oynadığı düşünülmektedir. Arteriyel sistemde; endotel hasarı ve trombosit fonksiyon bozuklukları tromboz oluşumuna neden olurken, venöz sistemde çoğunlukla pıhtılaşma sistemini kontrol altında tutan doğal inhibitör mekanizmaların bozuklukları gözlenmektedir (Bucciralli *et al.* 1999).

Kan pıhtılaşma faktörü V (FV), hemostazda hem prokoagülant hem de antikoagülant yollarda önemli rol oynayan bir proteindir. Aktif formu; protrombinin trombine dönüşümünü katalizleyen protrombinaz kompleksinde FXa'nın, inaktif formu ise; FVIIIa aktivitesinin regülasyonunda APC'nin kofaktörü olarak görev yapar. Genetik ve edinsel bozukluklar, FV molekülünün aktivitesini veya ekspresyon düzeyini etkileyerek trombotik veya hemorajik olaylara neden olabilmektedir (Vos HL 2006, Asselta R 2006).

FV geni (*F5*) 1. kromozomun uzun kolunda lokalizedir (1q23). Yaklaşık olarak 80 kb uzunluğunda olup, 25 ekzon içermekte ve 2,224 aminoasitlik bir protein sentezlemektedir (Jenny RJ 1987, Cripe LD 1992). Plazmada dolaşan FV karaciğerde sentezlenirken, trombositlerde bulunan FV'in bir kısmı megakaryositlerde sentezlenir, bir kısmı ise endositoz yolu ile plazmadan absorbe edilir (Suehiro Y 2005).

Faktör V'i kodlayan gende, 10. ekzondaki 1691. nükleotide Guanin'in Adenin ile yer değiştirmesi (G1691A) sonucu 506. pozisyonda Arginin→Glisin (Arg506Gln) aminoasit değişikliği, FV Leiden mutasyonu olarak adlandırılmış ve FVa'nın ağır zincir domaininde APC kesim noktasını ortadan kaldırarak, APC rezistansına neden olan en önemli faktör olduğu bildirilmiştir (Dahlbäck B 1995). APC rezistansı, özellikle venöz tromboz için en sık görülen bağımsız bir risk faktörü olarak belirlenmiştir (Svensson PJ 1994). FVL mutasyonunun sıklığı Türklerde %10.4, Kıbrıslı Türklerde ise bu oran %12.2 olarak bildirilmiştir (Akar N 1997, Akar N 2009).

FVL mutasyonunun ardından, *F5* geninde trombozla ilişkili olabileceği düşünülen diğer gen değişimleri de tanımlanmıştır. *F5* promotor bölgesi, plazma FV seviyelerini arttıran polimorfik adayların varlığının belirlenmesi amacıyla araştırılmıştır. Bu bölgede yer alan, -426G/A gen değişiminin, 3. ekzonda bulunan D79H mutasyonu ile birlikteliği durumunda, FV düzeyi üzerine etkisini arttırdığı gösterilmiştir (Lunghi 2005).

FVL'nın risk getirdiği bilinmekle beraber, mutasyonu homozigot olarak taşıyan bazı bireylerin ileri yaşlarda dahi tromboz geçirmediği daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar arasındadır. Homozigot FVL taşıyan erken yaş döneminde tromboz geçiren ve homozigot FVL taşıyan geç dönemde tromboz geçirmeyen bireylerin varlığı başka gen içi veya diğer farklı gen değişimlerinin etkili olabileceğini de düşündürmektedir. Bu nedenle, FVL mutasyonunu homozigot olarak taşıyan, tromboz geçirmiş ve geçirmemiş 60 yaş ve üstü ile 60 yaş altı bireylerde, *F5* geni promotor bölgesinde yer alan -426 G/A gen değişiminin tromboz oluşumu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

FVL mutasyonunun varlığında -426 G/A gen değişiminin tromboz oluşumu üzerinde ne gibi etkiye sahip olduğu haplotipler oluşturularak incelenecektir. Bu çalışma, trombozda rolü olabilecek FVL/-426 G/A haplotiplerinin ortaya çıkartılabilmesi açısından önemlidir. Hedeflenen amaç açısından da orjinalitesi bulunmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. HEMOSTAZ

Kan, gaz taşınımı, metabolizma, immün savunma ve hormonlar yoluyla hücreler arası iletişim dahil birden fazla fizyolojik olaydan sorumludur. Kan sıvı halini korumak zorundadır. Sıvı halini korumak amacı ile yaralanma sonrasında koagülasyonu sağlar (Guyton and Hall 1996). Koagülasyon, enzimatik reaksiyonlar dizisidir. Pıhtılaşma gerçekleştiği an çok sayıda kofaktör yer alır (Ulutin T vd 2000). Bu aktivitelerin toplamına “Hemostaz” denilir. Hemostaz 3 ana elementten oluşmaktadır (Guyton and Hall 1996).

1. Vasküler Endotel
2. Trombositler
3. Koagülasyon Sistemi

#### 2.1.1. Vasküler Endotel

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

Damar endotel hücrelerinin dış membranı antitrombotik özelliklerden sorumludur. Hücre membranının yüzeyi heparan sülfat gibi karmaşık mukopolisakkaritlerden oluşan glikokaliks tabakasıyla kaplıdır. Heparan sülfat AT-III adı verilen doğal antikoagulanı üretmektedir. AT-III, fibrinojeni fibrine dönüştürmekten sorumlu enzim olan trombinin inhibe eder. Dış membran ayrıca bazı reseptörleri de içerir. Bir membran reseptörü olan trombomodulin, trombinle etkileşir ve Protein C’yi aktif hale dönüştürür. Aktive olan Protein C, Faktör V ve Faktör VIII’i inaktive eder. Ayrıca Protein C damar endotelini



uyararak “Doku Plazminojen Aktivatörü”nün (TPA) salgılanmasını sağlar. TPA, plazminojeni plazmine dönüştürür. Plazmin, fibrinin parçalanmasından sorumlu olan proteolitik bir enzimdir. Damar endoteli bunların dışında prostasiklin ve diğer antitrombotik özellikleri ileleten maddelerin üretiminden sorumludur. Prostrasiklin trombosit aktivasyonunu inhibe eder ve kan damarının çapını arttırarak vazodilatasyonu uyarır (Noll and Luschner 1995).

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

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

### **2.1.2. Trombositler**

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

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

Aktive edilmemiş (pıhtı oluşumuna katılmamış) trombositte plazma zarı, hücre içine doğru ileri derecede ceplenmeler yaparak bir açık zar sistemi oluşturur. Plazma zarında pıhtılaşma olayını hızlandıran reseptör ve fosfolipitlerin bulunması nedeniyle bu

zar sistemi pıhtılaşma tepkimeleri için potansiyel olarak kullanılabilir zar yüzey alanını önemli derecede artırır. Trombositin içinde mikroflamanlar ve yaygın bir aktin/ miyozin sistemi bulunur. Endotel hasarına cevap olarak trombositin aktivleşmesi, kontraktıl elemanlara  $Ca^{+2}$  un bağlanmasıyla değişim oluşur ve bunlar da plazma zarının mimarisini önemli ölçüde değiştirir. Uzun yalancı ayaklar oluşur ve bu da pıhtı oluşumu başladığında zarın yüzey alanını genişletir (Smith 2007).

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

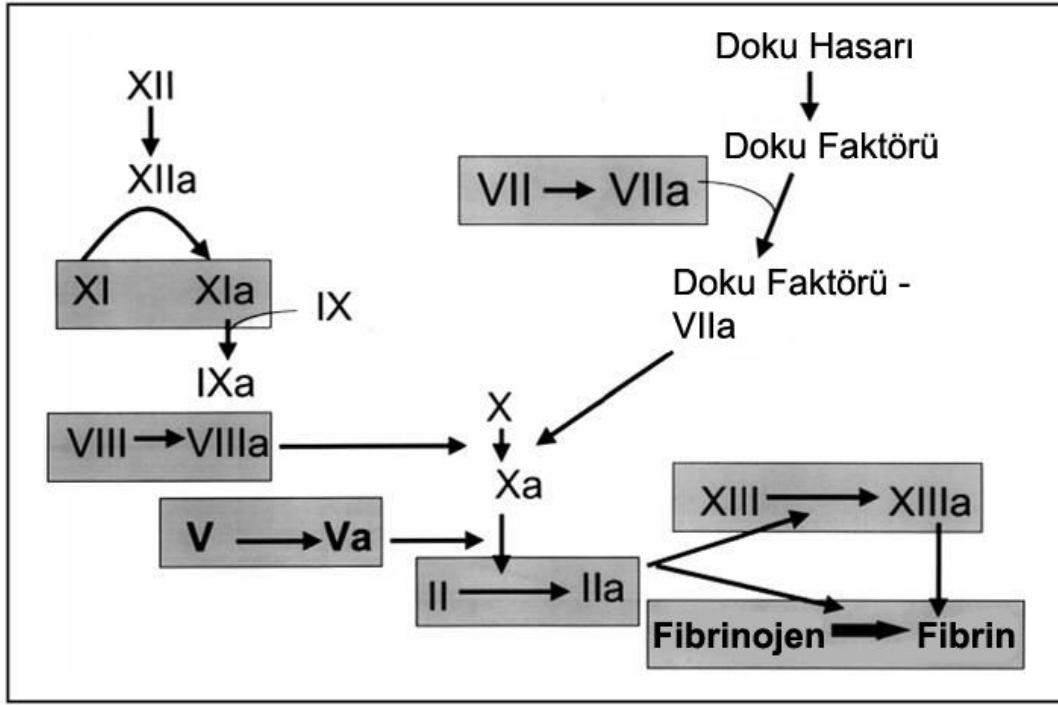
Kan pıhtılaşması esnasında trombosit işlevine 3 temel mekanizma katılır: Yapışma, Kümelenme, Salgılama. Yapışma trombosit aktivasyonu ile gelişen bir dizi reaksiyondur ve trombosit granüllerinin içeriklerinin salgılanmasına yol açar. Yapışma basamağı esas olarak; trombositlerin damardaki hasarlı noktalara yapıştığı zaman görülen trombosit-subendotel etkileşimini tanımlar. Damar hasarı; kollajeni, vWF'yi ve diğer bileşenleri açığa çıkarır. vWF, endotel hücreleri ve megakaryositlerde sentezlenen bir proteindir. Subendotelde, özgül trombosit taneciklerinde ve dolaşımında Faktör VIII'e bağlı halde bulunur. Trombosit hücre zarı, kollajen ve vWF' ye bağlanan, trombositin subendotele yapışmasına neden olan glikoproteinler içerir. Glikoprotein (integrin  $\alpha 2\beta 1$ ) yardımıyla kollajene bağlanan trombositlerin şekli yassıdan küreye değişir ve uzun yalancı ayaklar çıkararak trombosit–trombosit etkileşmelerini teşvik eder. Şekil değişikliğiyle birlikte  $\alpha$ -granüller ve yoğun cisimcikler yüzey sistemi içine bileşenlerini salarlar ve bu bileşenler trombosit membranının iç kısmına ve çevresine yerleşir. Granüllerin boşalmasıyla birlikte trombosit aktivatörü olan ADP salınımı da gerçekleşir. ADP, aktive olmuş trombositlerin şişmesini, trombosit–trombosit temasını ve yapışmasını sağlar. ADP uyarımı olmaksızın trombosit kümeleşmesi gerçekleşemez (Smith 2007). Agregasyon, trombosit ya da hemostatik tıkaçın oluşumuyla sonuçlanır ve değişiklikler koagülasyon faktörlerinin fibrin oluşturmak için etkileşeceği yüzeye destek verir. Trombosit tıkaçı daha sonra kan pıhtısına dönüşür (Lee vd. 1993).

### 2.1.3. Koagülasyon Sistemi

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

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

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



Şekil 2.1.Koagülasyon Sistemi

### 2.1.3.1. Ekstrinsik Yol

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

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

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

### **2.1.3.2. İntrinsik Yol**

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

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

## **2.2. HEMOSTAZDA BİYOLOJİK KONTROL**

Koagülasyonu aktive eden her yol aynı seviyede bir inhibitör sistemle kontrol altında tutulmaktadır. Bu şekilde hemostatik mekanizmanın sadece hasar bölgesinde aktive olması ve tamir projesi tamamlanır tamamlanmaz zarar gören vasküler yapının dolaşıma

açılması mümkün hale gelir (Ferhanoğlu 2003). Hemostatik cevap kontrol mekanizmalarıyla düzenlenir. En önemlileri:

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

### **2.2.1. Feed–Back İnhibisyon**

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

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

### **2.2.2. Fibrinoliz**

Hemostatik bir tıkaçın başarı ile oluşmasından sonra bu pıhtının daha fazla ilerlemesinin önlenmesi zorunludur. Bu olay kısmen kan pıhtılaşmasının durdurulması ve kısmen fibrinoliz olayının başlatılması ile sağlanır. Fibrinoliz, pıhtı içindeki fibrinin, plazminojenden oluşturulan bir serin proteaz olan plazmin tarafından yıkılmasını içerir. Plazminojen dolaşımında yer alan bir serum proteini olup fibrine karşı yüksek bir affinite gösterir ve bu affinite plazminojenin gelişmekte olan pıhtıya yerleşmesini teşvik eder. Plazminojenin etkinliğine plazminojen aktivatörleri olarak bilinen proteinler aracılık eder.

Plazminojenin plazminojen aktivatörleri tarafından plazmine çevrilmesi kanın hem sıvı kısmında hem pıhtının yüzeyinde görülür. Aktive edilmiş Protein C (APC), kan pıhtılaşma akışını durdurmasına ek olarak dokulardan plazminojen aktivatörünün salınımını da uyarır (Smith 2007).

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

### **2.2.3. Doğal İnhibitörler**

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

## **2.3. TROMBOZ**

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

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

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

Tromboz gelişimi multifaktöriyeldir, çok sayıda edinsel ve kalıtsal faktör değişik mekanizmalarla gelişime katkıda bulunur (Tablo2.1-2.2). Arteriyel sistemdeki trombozlar için temel risk faktörü endotel hasarı iken, ven trombozlarında staz ve kanın pıhtılaşma yeteneğindeki abartılı artış (hiperkoagulabilite) esas etkileyici faktörlerdir. Hiperkoagulabilite varlığında aktif pıhtılaşma faktörlerinin ortamdan uzaklaştırılmayıp yüksek konsantrasyonlara ulaşmalarına neden olur ve bu süreç pıhtı oluşumuna yol açar.

Derin ven trombozları çoğunlukla stazın en bariz olduğu saha olan ven kapakçıklarının ceplerinden başlamakta ve histolojik incelemelerde trombüs lokalizasyonunda endotel zedelenmesi izlenmemektedir. Arteriyel ve venöz sistemlerde trombozu tetikleyen faktörlerin ve trombüs morfolojisinin farklı olmasının temel nedeni vasküler sistemin iki yatakta farklı reolojik özellikler (kanın akış özellikleri ve bunlara bağlı olarak damar duvarı ve kan hücrelerinde gelişen deformasyon) göstermesidir.

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

Özetle; venlerde kan akımı daha yavaş olduğu için venöz trombozların gelişmesi arteriyel trombozlara göre daha sıktır ve venöz trombozlarda endotel lezyonunun trombüse yol açması seyrek görülen bir nedendir. Venöz trombüsler genellikle bol fibrin, az



miktarda trombosit ve birçok alyuvardan oluşur. Arteriyel trombüslerde damar çeperlerindeki stres ve turbulans çok fazladır, endotelyal değişiklikler ve ateromatoz değişiklikler vardır, trombositler kolayca agrege olur (Dündar 2005).

**Tablo 2.1.**Edinsel Tromboz Nedenleri (İliçin vd. 1996)

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

**Tablo 2.2.**Belirlenmiş Kalıtsal Tromboz Risk Faktörleri (Akar vd 2005)

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

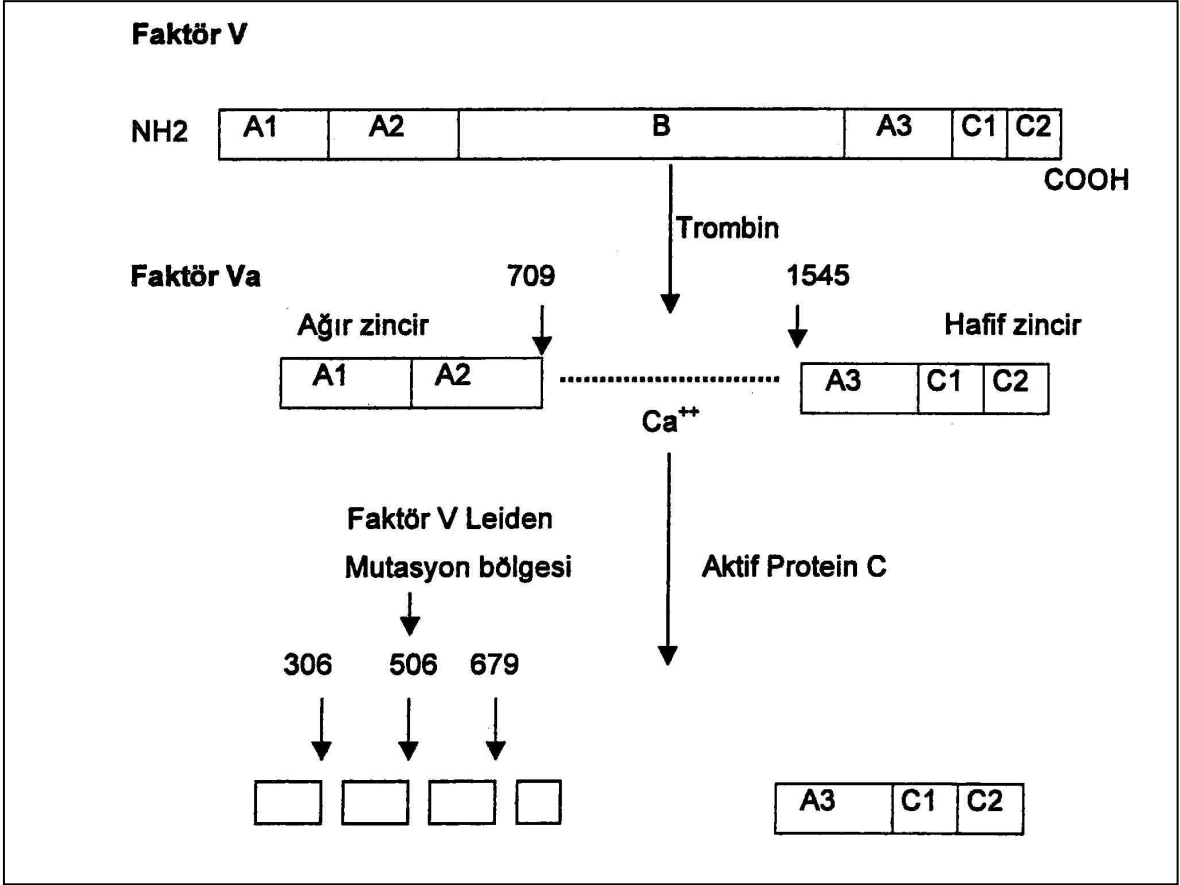
#### 2.4. FAKTÖR V

Faktör V, molekül ağırlığı 330.000 dalton olan, 2196 aminoasitten oluşan, tek zincirli bir glikoproteindir. Plazma konsantrasyonu 4–10 ng/ml olup, yarılanma ömrü 12–36 saattir. FV'in %75-80'i plazmada, %20-25'i trombositlerde bulunur. Molekül, yapısında A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, A<sub>3</sub>, C<sub>1</sub> ve C<sub>2</sub> domainlerini bulundurur. A<sub>1</sub> ve A<sub>2</sub> domainleri ağır zincir olarak adlandırılan, 110.000 dalton molekül ağırlığındaki, 709 aminoasit içeren bölgeyi; A<sub>3</sub>, C<sub>1</sub> ve C<sub>2</sub> domainleri 651 aminoasit içeren, 78.000 dalton molekül ağırlığındaki hafif zinciri oluştururlar. B domaini ise; 836 aminoasitten oluşan, iki zincir arasında bulunan bölgedir. B domaini trombinin FV'i kesme noktalarını içerir. Ağır zincir üzerinde protrombin bağlanma bölgesi, hafif zincir üzerinde ise FXa ve fosfolipit bağlanma

bölgeleri bulunur. Ağır ve hafif zincirler üzerinde ayrıca protein C'nin kesim bölgeleri de bulunur. FV, karaciğerin dışında megakaryositler ve lökositler tarafından da üretilir. Trombositlerin, endotelial hücrelerin ve monositlerin yüzeyinde bulunur. Trombositlerin içinde bulunan FV,  $\alpha$ -granülde depolanır ve trombosit aktivasyonu sırasında salınır (Uçar vd. 2000, Altınışık 2001, Sılan ve Zafer 2004).

FV proteini, koagülasyon mekanizmasının hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarında kofaktör olarak görev yapar. İntrinsik mekanizmada FXa ve trombosit fosfolipitleri ile, ekstrinsik mekanizmada ise doku tromboplastinin bir parçası olarak sentezlenen fosfolipit ve FXa ile birleşerek protrombin aktivatörünü oluşturur, bu kompleks de protrombini (FII) trombine dönüştürür. Pıhtılaşma mekanizmasının aktive olmasıyla ortaya çıkan trombin bir yandan fibrinojeni fibrine dönüştürürken, diğer yandan endotelial bir membran proteini olan trombomoduline bağlanır. Bu olay trombinin prokoagulan formdan antikoagulan bir forma dönüşmesine yol açar. Daha sonra trombin, protein C'yi aktive eder. Protrombin aktivatör kompleksi içinde FV tek zincirli ve inaktiftir. Pıhtılaşma başlayınca FV molekülü; trombin tarafından, B domainindeki, Arg709–Ser710, Arg1018–Thr1019, Arg1545–Ser1546 noktalarından kesilerek aktive edilir. Tek zincirli FV molekülü, birbirlerine  $Ca^{+2}$  iyonları ile bağlı olan çift zincirli aktif molekül (FVa) haline dönüşür (Guyton 1991, İliçin 1996, Haliloğlu 2004).

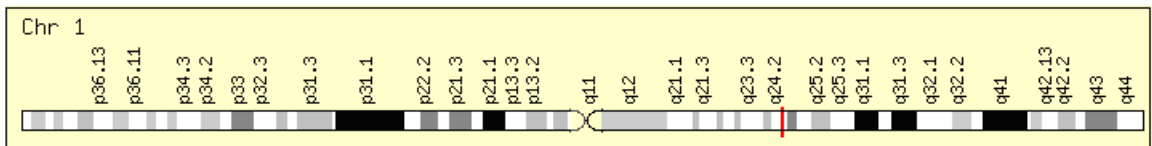
Aktive protein C (APC), kofaktör protein S varlığında FVa'yı ilk olarak 506. pozisyondan kestiğinde FVa $\alpha$  oluşur. Bu form, %70 oranında prokoagulan aktiviteye sahiptir. FVa'nın tam inaktivasyonu için 306. pozisyondan da kesilmesi gerekir. Bu reaksiyon protein S tarafından 20 kat hızlandırılır,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



Şekil 2.2.Faktör V molekülünün kesim noktalarının şematik gösterilmesi (Esmon 2001)

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

Faktör V geni, ilk kez 1992 yılında Cripe ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. FV geni (*F5*) 1. kromozomun uzun kolunda lokalize (1q23) olup, yaklaşık olarak 80 kb uzunluğundadır ve 25 ekzon içermektedir (Jenny *et al.* 1987, Cripe *et al.* 1992). *F5* geninin transkripsiyonu ile 6.8 kb'lık olgun mRNA oluşur ve kodlanan protein endoplazmik retikuluma translokasyonu sonrasında uzaklaştırılan 28 a.a'lık uzun sinyal peptidi ile birlikte 2,224 aminoasitten oluşur.



Şekil 2.3.kromozom üzerinde F5 geni lokalizasyonu

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

APC, FVa ve FVIIIa’ yı inaktive ederek pıhtılaşmayı kontrol eder. APC, FVa proteinini 679, 506 ve 306. pozisyonundaki arginin bölgelerinden keserek inaktive eder. FVa ilk önce 506’dan daha sonra 306’dan kesilerek inaktive olur. Fakat Faktör V Leiden mutasyonu, Faktör V geninin 10.ekzonundaki 1691. nükleotidin guaninden adenine dönüşmesine neden olur. Bu dönüşüm de 506. argininin glutamin olmasıyla sonuçlanır. Böylece 506’daki kesim engellenmiş olur. Mutant FV, 306.arginin bölgesinden kesilmesiyle inaktive olabilir. Fakat bu işlem yaklaşık 10 kat daha yavaştır. Böylece FV molekülü proteolitik inaktivasyona dirençli (resistant) olur. Bu durum trombin konsantrasyonunda yükselmeye ve hiperkoagülasyona neden olur. FV prokoagulan olmaya devam eder (Sılan ve Zafer 2004). Bu mutasyon sonucunda oluşan mutant FV’in, doğal antikoagulan protein C–protein S’ye karşı duyarlılığı azalır ve FVa, APC tarafından inaktive edilmeye karşı dirençli hale gelir ve koagülasyona yatkınlık ortaya çıkar (Rosen and Sturk 1997, Silan ve Zafer 2004).

Venöz tromboz hastalarında FVL mutasyonu vak’aların %20’sinde görülmekte olup, seçilen trombofili hastalarında bu oran %50’ye kadar ulaşmaktadır. FVL mutasyonu, koagülasyon inhibitörlerinin eksiklikleri ile aynı etkide risk faktörü olarak görülmektedir. Mutasyonu heterozigot olarak taşımanın tromboz açısından 5 kat risk getirdiği gözlenirken, homozigotluğunun ise bu riski 50-100 kat arasında arttırdığı düşünülmektedir (Emmerich *et al.* 2001).

FVL mutasyonunun neden olduğu APC rezistansının en yaygın klinik belirtileri, venöz tromboz ve pulmoner embolizmde görülmektedir. Mutasyon ile arteriel tromboz arasında ise bir bağlantı olmadığı düşüncesine karşın yapılan son çalışmalar, FVL’nın arteriyel tromboz için önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur (Page *et al.* 2005, de Paula Sabino ve ark., 2006). Aynı zamanda aralarında direkt bir ilişkinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Ridker *et al.*1995).

#### 2.4.2. Faktör V Geninde Yer Alan Diğer Gen Değişimleri

FVL mutasyonunun ardından, *F5* geninde trombozla ilişkili olabileceği düşünülen diğer gen değişimleri de tanımlanmıştır. APC yarıma bölgesi pozisyon 306'da; FV Cambridge Arg-Thr (Williamson *et al.*1998) ve FV Hong Kong Arg-Gly aminoasit değişikliği (Chan *et al.*1998) ile sonlanan 2 yanlış anlamlı mutasyon bulunmaktadır. FV Cambridge ile fenotipik olarak benzerlik gösterse de FV Hong Kong mutasyonunun APC direnci ile ilişkisi bulunmamaktadır (Chan *et al.*1998). Ancak, rekombinant FV Cambridge ve FV Hong Kong molekülleri ile yapılan *in-vitro* çalışmalar iki varyantın da kısmen APC kofaktör aktivitesini azaltarak hafif APC direncinin ortaya çıkmasına neden oldukları gösterilmiştir (Norstrom *et al.*2002).

FV Liverpool mutasyonu kodon 359'da Ile-Thr aminoasit değişimi ile sonlanan bir yanlış anlamlı mutasyon olup, Asn357'de yeni bir glikozilasyon konsensus dizisi oluşturmaktadır (Mumford *et al.*2003). Bu pozisyonda bir karbonhidrat zincirinin varlığı, Arg306 ve Arg506'dan APC yarımasını engellemekte ve FVIIIa'nın degradasyonu sırasında FV'in APC kofaktör fonksiyonunu bozmaktadır (Steen *et al.*2004).

R485K mutasyonu, Doğu toplumlarında yüksek oranda bulunmakla birlikte venöz tromboz (Hiyoshi *et al.* 1998) ve koroner arter hastalıkları (Le *et al.*2000) ile ilişkilendirilmiştir. Ancak R485K mutasyonunu taşıyanlarda APC rezistansının varlığını moleküler mekanizmalarla açıklayan veriler mevcut değildir. R485K mutasyonunun allel frekansı sağlıklı Türk toplumunda %4.7, derin ven trombozlu hastalar da ise %6.8 olarak bildirilmiştir (Page *et al.*2005).

FV geninde yaygın görülen bir diğer genetik varyasyon, B domaininde yer alan, 1299. pozisyonda His-Arg aminoasit değişimi ile karakterize, R2 polimorfizmidir (Lunghi *et al.* 1996). Yapılan çalışmalarda derin ven trombozu oluşumunda A4070G gen değişiminin etkisi tartışmalı olsa da venöz tromboembolide, FV1691A ve FV1299G birlikteliklerinin, tek başına FV R506Q taşıma ile karşılaştırıldığında 3-4 kat daha fazla risk getirdiği bulunmuştur (Faioni *et al.*2003). Akar ve ark. (2000) tarafından venöz tromboemboli hastaları (VTE) ile yapılan bir çalışmada, FV His1299Arg gen değişiminin sıklığı sağlıklı Türk toplumunda %8.5 olarak bulunmuş ve VTE oluşumunda tek başına bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Türk pediatrik inme hastalarında ise, FV A4070G gen değişiminin tromboz açısından 2.5 katlık bir risk getirdiği, FV G1691A ve PT G20210A

mutasyonlarını taşıyan hastalar çıkartıldıktan sonra ise tek başına 3.9 kat risk getirdiği saptanmıştır (Akar vd 2000). Tromboemboli hastalarında FV G1691A ve FV A1299G mutasyonlarının birlikteliklerine bakıldığında bir kere daha FV1691A taşımanın tromboz açısından risk getirdiği halde FV4070G'nin risk taşımadığı bulunmuştur. Ancak semptomatik FV1691A taşıyıcılarında FV4070G allelinin sıklıkla birlikte olduğu gösterilmiştir (Akar vd 2000).

FV geninde yer alan bir dizi mutasyon R2 polimorfizmi ile sıkı bağlantılıdır. Bu mutasyonların tamamı (Met385Thr, His1299Arg, Met1736Val, Asp2194Gly) R2 haplotipi olarak adlandırılır ve aminoasit değişimleri, ağır ve hafif zincirlerle birlikte B domaininde ,yer almaktadır (Castoldi *et al.* 2000, Bernardi *et al.* 1997). R2 haplotipi içerisinde özellikle Asp2194Gly mutasyonunun azalmış FV düzeyi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Castoldi *et al.* 2000).

FV geni B domaininde de çok sayıda polimorfizm tanımlanmış ve bunların APC rezistansında etkili olduğu gösterilmiştir (Kostka *et al.* 2003). S739S, K830R, H837R ve K897N mutasyonları A>G transisyonu ile meydana gelmekte ve G allelinin FV'in antikoagülant fonksiyonunu etkilediği tahmin edilmektedir (Segers *et al.* 2007).

#### **2.4.3. F5 -426 G/A Gen Değişimi**

F5 promotor bölgesi, plazma FV seviyelerini arttıran polimorfik adayların varlığının belirlenmesi amacıyla araştırılmıştır. Bu bölgede yer alan, -426G/A gen değişiminin, 3. ekzonda bulunan D79H mutasyonunun FV düzeyi üzerine etkisini arttırdığı gösterilmiştir. D79H taşıyıcılarında, -426G/A homozigotluğunun FV seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir (Lunghi vd 2005).

## 2.5. MOLEKÜLER TEKNİKLER

### 2.5.1. Kullanılan Çözeltiler

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

### 2.5.2. DNA Ekstraksiyonu

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

### 2.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( PCR )

Hücreden kaynaklanmış bir yöntem olarak polimeraz zincir reaksiyonu, DNA klonlanmasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur ve pek çok durumda konakçı hücrelerin kullanıldığı klonlamanın yerini almıştır. Yani, bir çeşit in vitro klonlamadır.

1984'te Kary Mullis'in geliştirdiği bu yöntem, günümüzde tıbbi ve biyolojik çalışmalarda araştırma laboratuvarlarında sık kullanılan vazgeçilmez bir teknik haline gelmiştir. Bu yöntem dizileme için DNA klonlanması, DNA temelli filogenetik analiz, genetik parmak izi ile tanımlama, enfeksiyon hastalıklarının belirlenmesi ve tedavisinde kullanılmaktadır. 1993'te Mullis, Nobel Kimya Ödülüne layık görülmüştür (Saiki *et al.* 1985).

Bu yöntemin Polimeraz zincir reaksiyonu olarak adlandırılmasının sebebi, döngünün anahtar elemanlarından biri olan DNA polimerazdan türetilmesidir. DNA



polimeraz, invitro enzimatik replikasyon ile DNA'nın bir parçasını çoğaltmak için kullanılır.

Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin 2 ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı, bir çift sentetik oligonükleotit (18–20 baz uzunluğunda) kullanılarak, bu primerler ile sağdan ve soldan sınırlandırılan bölgenin DNA primelerine bağlanarak bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan ısıya dayanıklı DNA polimeraz, sentezde kullanılacak olan deoksिनükleotidtrifosfatlar ( d NTP 'ler; A, G,C,T), polimerazın çalışması için uygun PH ve iyon koşullarını ( $Mg^{+2}$ ) sağlayan tampon karışımı ile enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır (Akar 1999, Bölüm 7).

PCR, DNA ipliklerinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılmasını (**denatürasyon**), sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (**hibridizasyon**), daha sonra da zincir uzamasını (**polimerizasyon**), ve bu döngülerin istenilen belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur. Elde edilecek ürünün miktarı teorik olarak, bu üç temel basamağın tekrar sayısına bağlıdır. Bir PCR işleminde “n” döngü sonunda kalıp DNA'nın istenilen bir bölgesi yaklaşık  $2^n$  kez çoğaltılmış olur. Oluşturulan DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. İşlem ısı dönüştürücüsü (thermocycler) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklık koşulları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemle; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere bol miktarda hedef DNA fragmantleri elde edilir (Akar 1999, Bölüm 7).

PCR reaksiyonunda ilk adımda çoğaltılacak olan çift zincirli DNA, 90–95°C de yaklaşık 5 dakika ısıtılmak suretiyle denatüre edilir ve tek zincirli hale getirilir. İkinci adımda, sıcaklık 50–70°C arasında bir değere düşürülerek (bağlanma sıcaklığı) primerlerin tek zincirli DNA' ya bağlanması sağlanır. 18–25 nükleotid uzunluğunda olan yapay oligonükleotidlerden oluşan bu primerler; çoğaltılacak DNA' nın sınırlandırılması için başlangıç noktası ve bitiş noktası olarak görev yaparlar. Üçüncü aşama olan DNA sentezi aşaması ise 70–75°C sıcaklıkları arasında gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, nükleotidleri 5'ucundan 3'ucuna doğru ekleyerek, primelerin uzamasını sağlar ve hedef DNA 'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Klug 2000).

PCR'dan iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlıdır. DNA polimerazın iyi çalışabilmesi en etkin olduğu pH'ın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerdendir. Bu amaçla genellikle Tris.HCl pH: 8.4 tepkime karışımında son değişimi 10mM olacak şekilde kullanılır. PCR karışımında tek değerli katyonların özellikle 50–60 mM düzeyinde K<sup>+</sup> bulunmasının, çoğaltılmayı önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır. Yine karışımda 100µg/ml jelatin bulunmasının da benzer etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, serbest magnezyum (MgCl<sub>2</sub>) konsantrasyonunun azaltılması ile Taq polimeraz doğruluğu artırılabilir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü Mg<sup>+2</sup> iyonuna bağlandıkları için her PCR protokolünde Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonu ampirik olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg<sup>+2</sup>, enzimin spesifikliğini azaltır, azı ise; enzimin inaktif olmasına yol açar (Akar 1999, Bölüm 7).

PCR için gerekli elementlerden olan primerlerin, hedef bölgeye özün olacak şekilde tasarlanır. 18–25 baz uzunluğundaki primerlerin baz dizilimi ve kompozisyonu rastgele olmamalı, %45–55 oranında G/C' den oluşmalıdır. Uygun bir primer çifti için, iki primer arasındaki kompozisyonu 100–600 bç kadar olmalıdır. Aynı zamanda primerlerler birbirlerinin tamamlayıcısı olmamalıdır. Primerlerin DNA bağlanma sıcaklığı kabaca T<sub>m</sub> (erime sıcaklığı); 4(GC)+2(AT) formülü ile hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmekte olup hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini artırmaktadır (Akar, 1999, Bölüm 7).

PCR yöntemi çok az miktarlardaki materyalin analizine olanak vermesi nedeniyle tıbbi genetik ve moleküler genetikte önemli işlemlerden biri haline gelmiştir.

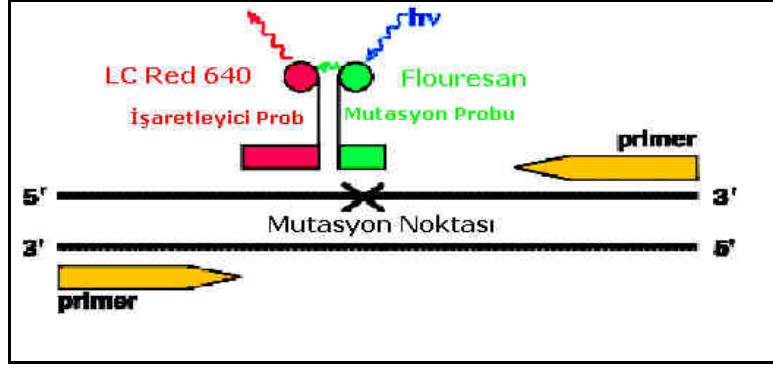
#### **2.5.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR)**

Mutasyon saptamalarında yaygın olarak kullanılan Light Cycler cihazı, erime eğrisi prensibine göre çalışır. İlk basamak olarak; insan genomik DNA'sında bulunan 220 baz çiftlik Faktör V Leiden gen bölgesi spesifik primerlerle amplifiye edilerek çoğaltılır. Daha sonra, amplifikasyonun yapıldığı kapiller tüp içerisine spesifik hibridizasyon problemleri eklenir. Amplifikasyon ve hibridizasyon problemlerinin genomik DNA'ya bağlanması aynı kapiller içerisinde ve aynı zamanda gerçekteşir. Light Cycler–Red 640 işaretili hibridizasyon problemleri, mutasyon olmayan hedef sekansı hibridize ederek işaretleyci prob olarak fonksiyon kazanmasını sağlar. Diğer hibridizasyon probu, floresan ile işaretili olup,

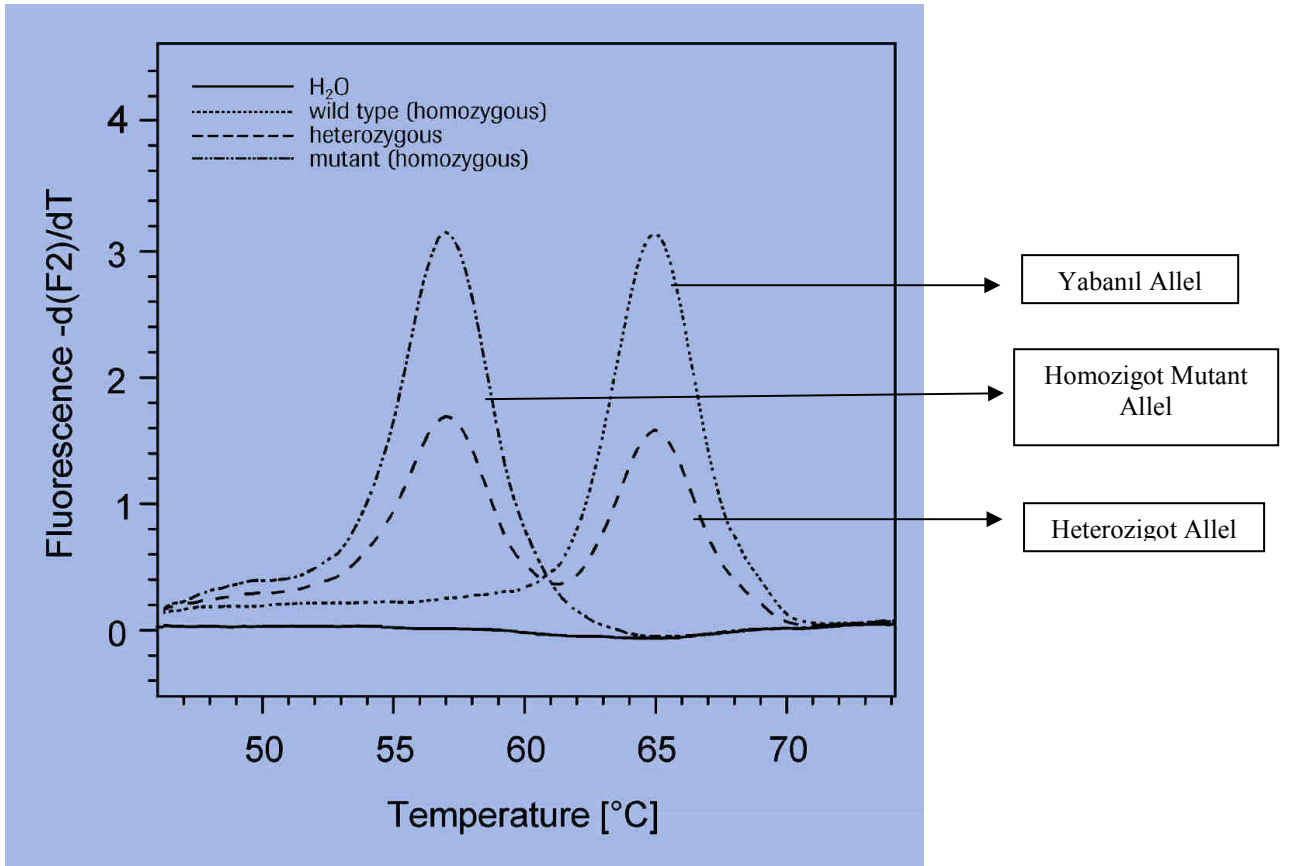
mutasyon probuna sıkı olarak bağlanır. Kalıp DNA'ya hibridize olduktan sonra, bu iki prob çok yakın olacak şekilde yan yana araya gelirler. Ve bu iki floresans arasında Resonance Energy Transferi (FRET) gerçekleşir. Erime eğrisi analizi sırasında, ısı yavaş yavaş yükselirken, hibridizasyon problemleri erir ve birbirine çok yakın duran iki floresan boya birbirinden ayrılır, böylelikle floresan ışımaya miktarı düşer.

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

Eğer bir mutasyon varsa; mutasyon probu ile hedef DNA arasındaki uyumsuzluk hibridin stabilizasyonunu bozar. Yabancıl tip genotipte ise uyumsuzluk oluşmaz ve hedef DNA ile birebir örtüşen hibrit daha yüksek erime ısısına sahip olur. Mutant genotiplerde ise; hedef DNA ile hibrit birebir örtüşemediğinden bazılar arasında oluşan bağlar daha gevşek olur ve bunun sonucunda ise düşük erime ısısına sahip olur. Erime eğrisi analizi sonucu elde edilen pikler; homozigot (yabancıl tip veya mutant) genotip ile heterozigot genotip arasındaki farkın ayırt edilmesini sağlar. İşaretleyici prob (anchor prob) mutasyon probunun erime ısısından daha yüksek erime ısısına sahiptir. Bunun nedeni, erime eğrisi analizi sırasında oluşan sinyalin sadece mutasyon probundan gelmesini sağlamaktır (Roche-applied-science. PDF).



Şekil 2.4. Light Cycler mutasyon analiz yönteminin çalışma prensibi



Şekil 2.5. Erime Eğrisi Analizi: Dizide (Örn. Faktör V Leiden) oluşabilecek genotiplerin görünümü

### **2.5.5. Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kesim**

PCR ürünlerinin incelenmesinde değişik moleküler teknikler bulunmaktadır. Bunlardan birisi PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile muamele edilerek incelenmesidir. Restriksiyon endonükleazlar, çok uzun çift sarmal DNA moleküllerini spesifik parçalara kesen ve bu şekilde DNA' yı manüple etmeyi mümkün kılan çok önemli enzimlerdir. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde RE sentezlerler. Esas görevleri, dışarıdan bakteriye giren ve bazı özel gen veya markerları taşıyan genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonlara mani olmak ve türlerin genetik yönden stabilitesini korumaktadır. Bu gerçekte bir çeşit savunmadır. Bakteriye özgü bu enzimler çift sarmallı DNA üzerinde özgün bir bölgeyi tanırlar ve çift sarmallı DNA' nın her iki zincirindeki fosfo-diester bağına keserek DNA'yı iki parçaya ayırırlar. Bu enzimlerin bir çoğunun tanıdığı bölge palindromiktir. Yeni oluşan parçalar birbirine iki yönlü simetriklerdir. İzozimerler ise; farklı mikroorganizmalardan elde edilip, DNA üzerinde aynı diziyi tanıyıp kesim yapan RE'lerdir (Akar 1999).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı; Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. DNA örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı “DNA Bankası”ndan temin edilmiştir. Çalışmaya katılan bireylerden çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır.

Bölümümüze başvuran hastalardan alınan kan örneklerinden fenol–kloroform yöntemiyle DNA elde edilmiş, elde edilen DNA’lardan FVL 1691 G-A mutasyonu Light Cycler “Factor V Leiden” Mutation Detection System (Roche Diagnostics, USA) kitleri kullanılmıştır.

Bu çalışma, “Tromboz Geçiren ve Geçirmeyen Faktör V Leiden Taşıyıcılarında Farklı Gen Polimorfizmlerin Araştırılması” adlı BAP projesi kapsamında yapılmıştır.

#### 3.1. YÖNTEM

##### 3.1.1. DNA İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan 1 ml 0,5 M etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma, ABD) içeren polietilen tüp içerisine 9 ml kan örneği alınır. Alınan kan örneği 50 ml lik flakon tüp içerisinde 25 ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya), 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya), 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] eklenir, çalkalanarak 20 dk buzda bekletilir. Soğumalı santrifüjde (Hettich, Almanya) +4 °C’de 4000 rpm’de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülür, çökelek üzerine tekrar 25 ml RBC Lizis solüsyonu eklenir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000 µL RBC lizis solüsyonu eklenir ve

bu karışımın 800 µL'si ependorf tüpüne alınarak -20 ° C'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200 µL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/mL olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu [10 mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8, 100 mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1 mM pH: 8,0 EDTA (AppliChem, Almanya) ] eklenerek bir gece 56 °C'de sıcak su banyosunda (Almanya) bekletilir.

İkinci gün tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya)], izoamil alkol (Merck, Almanya) eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4 °C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10' u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20 °C' de bir gece bekletilir.

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

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

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

genomik DNA'sı kullanılarak cam kapiller tüplerde hazırlandı ve real time PCR cihazı (Light Cycler, Roche Diagnostics, USA) kullanılarak analiz edildi.

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

**Tablo 3.1.** Light Cycler cihazında kullanılan FVL kiti içerikleri ve reaksiyonda kullanılan miktarlar (FVL Kit for use with the Light Cycler 1.2 Instrument manuel: page1-8)

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

**Tablo 3.2.** Light Cycler cihazında FVL analizinde kullanılan primer dizileri ve hibridizasyon prob ları(Frank 2000)

Primer sequences and hybridization probes for factor V genotyping.		
Primer Sequence	Orientation	PCR product
Factor V G1691A		220 bp
5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3'	Sense	
5'-CTTGAAGGAAATGCCCATTA-3'	Antisense	
5'-GGCGAGGAATACAGGTAT-3'-fluorescein	Sense	
(Mutation probe)		
5'-LC-Red705-TGTCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTG-3'-PHO	Sense	

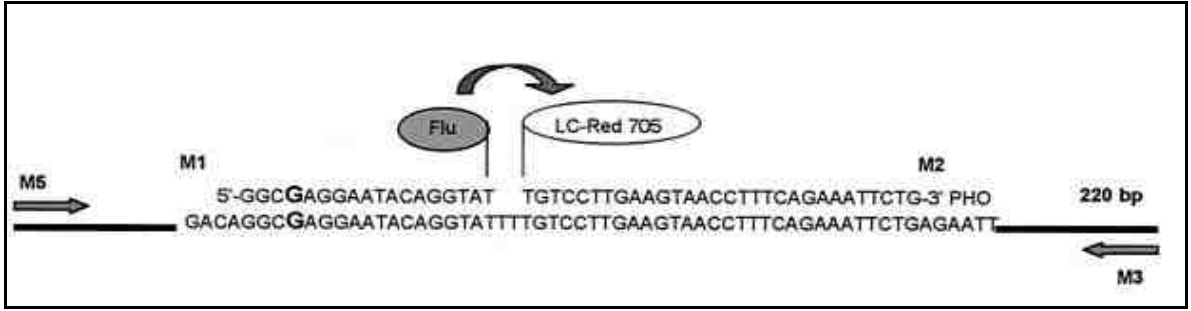


Light Cycler cihazında FVL mutasyonu analizinde kullanılan primer ve probler tabloda gösterilmiştir (Tablo 3.2).

(Anchor probe)

TGCCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACATCGCCTCTG  
GGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGC**G/A**AAGGAATACAGGT  
ATTTTGCCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCTAGAACATGTTAGGTC  
TCCTGGCTAAATTAATGGGGCATTTCCTTCAAG

**Dizi 3.1.**FV geni için gerçek zamanlı pcr ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir. (GenBank accession no. L32764)



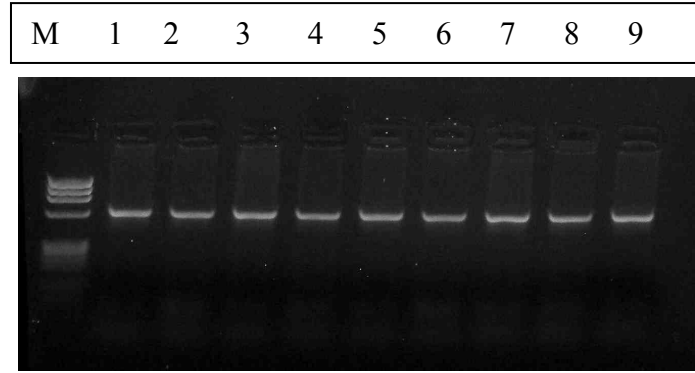
**Şekil 2.6.** LC FVL primerlerinin bağlanarak çoğalttıkları gen bölgesi

### 3.1.3 -426 G/A Polimorfiziminin İncelenmesi

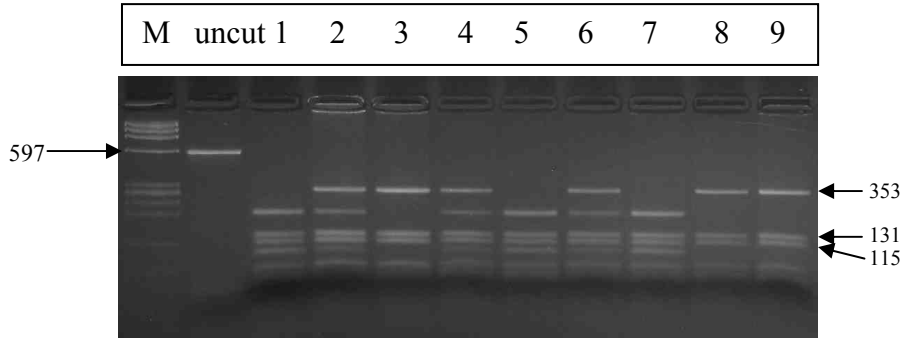
*F5* geni, promotor bölgesi için F:5'-CTATGCTGCAGCTTAGCTGG-3' ve R:5'-GCTGCAATGA GCTCTAGAGG-3' primerleri kullanılarak 597 bp uzunluğunda fragmentler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle amplifiye edildikten sonra, *MvaI* restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak Normal örneklerde (-426GG) 257, 131, 115, 94 bçlik bölgeleri, Heterozigot örneklerde (-426GA) 353, 257, 131, 115, 94 bçlik bölgeleri, Homozigot örneklerde (-426AA) 353, 131, 115 bçlik bölgeleri elde edilerek RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) yöntemiyle bant profilleri %3'lük agaroz jelde görüntülenerek -426 G/A gen değişimi saptanmıştır.

AAGTGAAACTGAAATCTGGACAACCTGATTTTTTTCAGCCAAGCTCTTCAAGCCCGCTGCTATGC  
TGCAGCTTAGCTGGCGACAGGCCCTTATCAAGGCAGAAGCTGTGCCTTGATAGAGGCCAGGAAG  
GCGATTCAGAGCAGTAGGCCTTGTCCATGTGTTTGTTCCTGCTTCTTCACCACTTGAAAATAGT  
GTTTCAGTGCCAGTAACAGGGCACAATACTCTTTTCTCAGATTAAGGGGAGCCATCTGCT  
TAAGGTTGTTGGGTGCCACTGCACTGCACAGAAGGTTCTCCAAGTGTGAGCTTGGACCCAG/AG  
CAGGCCTCAGGTCAGTGGTAACGGACGACTGCTTCCGTGGTGTGGCAGGTGGAAATGGAGGG  
ATACAGCTTTGTCCGGCTCATGAATGGGTGGGCATTGTCCCGCTGCTAGAGCCTCTGATCTCTG  
CCCCTTCTTCACCTGCAGTAAACAGTCACTAGTTTGGTTGCTCTCCCTAATACCTCTGGTCACT  
GGGAGCTGTGATCTCACAAACCCCTGCCAGGAAAAGCCCCAGAAAAAGCGGAGGGAGTGAG  
AGCCAGAGGCTGCTGCTGCCGTTTGCAAGAAGTGCAGGGGAGGAGGACGCTGCCACCCACAGC  
CTCTAGAGCTCATTGCAGCTGGGA

**Dizi 3.2.** PCR reaksiyonuyla çoğaltılan bölge (597 bç)



**Resim 3.1.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu görüntüsü M:ΦX174 DNA, 597bç



**Resim 3.2.** Enzimle Kesim ve Agaroz Jel Elektorforez görüntüsü M:ΦX174 DNA, 1,5, 7 nolu örnekler

-426GG, 2,4, 6 nolu örnekler -426 GA, 3, 8, 9 nolu örnekler -426AA genotipi

## 4. BULGULAR

Light Cycler cihazında (Roche Diagnostics) gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle FVL homozigot tayini yapılmıştır. FVL mutasyonunu homozigot olarak taşıyan, tromboz geçirmiş 54 hasta ve kontrol amaçlı bireylerde, -426 G/A gen değişiminin tromboz oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. FVL mutasyonunu homozigot olarak taşıyan tromboz geçirmiş ve geçirmemiş bireyler arasındaki dağılımlar gösterilmiştir (Tablo4.1). A allelini homozigot olarak taşımak tromboz riski açısından anlamlı bulunamamıştır.

**Tablo 4.1.** FVL (+/+) tromboz geçiren hastalar ile kontrol gruplarında -426 G/A polimorfizminin genotip dağılımı

<b>FV -426 G/A</b>	<b>Kontrol (n=6)</b>	<b>Tromboz (n=54)</b>	<b>p</b>	<b>OR</b>
<b>GG</b>	4 (%66.7)	46 (%85.2)	-	1
<b>GA</b>	2 (%33.3)	7 (%12.9)	0.51	0.30 (0.04-1.98)
<b>AA</b>	-	1 (%1.8)		
<b>G</b>	10 (%83.3)	99 (%91.7)	-	1
<b>A</b>	2 (%16.7)	9 (%8.3)	0.67	0.45 (0.08-2.40)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kan koagülasyonu belirli bir pıhtılaşma faktörünün aktif formunun substratı katalizlediği enzimatik reaksiyonlar dizisidir. Kan pıhtılaşmasında çok sayıda kofaktör rol oynamaktadır. Bu kofaktörler koagülasyon mekanizmasındaki değişik enzimatik reaksiyonları hızlandırırlar. Faktör V (FV), protrombinaz kompleksinde Faktör X (FX) ile birlikte kofaktör olarak etki eder. Fizyolojik koşullarda prokoagülan ve antikoagülan mekanizmalar bir denge içersinde çalışırlar. Denge bozukluğu durumunda kanama ya da tromboemboliyle kendini gösteren patalojik durumlar oluşur (Ulutin vd 2000).

Faktör V'i kodlayan gende 10. ekzondaki 1691. nükleotide Guanin'in Adenin ile yer değiştirmesi (G1691A) sonucu 506. pozisyonda Arginin→Glisin (Arg506Gln) aminoasit değişikliği, FV Leiden mutasyonu olarak adlandırılmış ve FVa'nın ağır zincir domaininde APC kesim noktasını ortadan kaldırarak, APC rezistansına neden olan en önemli faktör olduğu bildirilmiştir (Dahlbäck B 1995). APC rezistansı, özellikle venöz tromboz için en sık görülen bağımsız bir risk faktörü olarak belirlenmiştir (Svensson *et al.* 1994). Sağlıklı beyaz bireylerde mutasyonun prevalansı %2-10 arasında bildirilmiştir ki bu da FVL mutasyonunun tromboza neden olan diğer genetik faktörlerden en az 10 kat daha yaygın olduğunu göstermektedir (Rees *et al.* 1995). Avrupa'da yüksek bir prevalansa sahip olmakla birlikte mutasyon, İtalya ve İspanya'da %2, Hollanda, İngiltere ve Almanya'da %3-5 ve İsveç'te %15 oranında bulunmuştur (Dahlbäck B 1997). Ayrıca, Suudi Arabistan, Arap ve İsrail Yahudilerinde de oldukça yaygındır. FVL mutasyonu beyaz ırkta yaygın görülmesine rağmen, Japon, Çin toplumları ile Afrika, Avustralya ve Amerika yerlilerinde de saptanmıştır (Rees 1996). Akar vd (1997,2009) yaptıkları çalışmada ise, FVL mutasyonunun sıklığı Türklerde %10.4, Kıbrıslı Türklerde ise bu oran %12.2 olarak bildirilmiştir.

FVL mutasyonunun ardından, *F5* geninde trombozla ilişkili olabileceği düşünülen diğer gen değişimleri de tanımlanmıştır. *F5* promotor bölgesi, plazma FV seviyelerini arttıran polimorfik adayların varlığının belirlenmesi amacıyla araştırılmıştır. İlk olarak van Wijk *et al.* (2001) tarafından genin promotor bölgesinde -426G/A polimorfizmi gösterilmiş ve kontrol grubundaki sıklığının yüksek oluşundan dolayı polimorfik olarak değerlendirilmiştir. Scanavini ve ark. (2004), plazma FV düzeyi üzerine etkili olabilecek

polimorfik adayların varlığını araştırmak üzere F5 geninin promotor bölgesini DNA dizi analizi yöntemiyle incelenmiş ve sadece daha önce de tanımlanmış olan -426G/A polimorfizmi saptanmıştır. -426G/A polimorfizmi ile yüksek FV düzeyi arasında bir ilişki kurulamamıştır. F5 geninin 3. ekzonunda yer alan Asp79His mutasyonunda 79His allelinin, genin promotor bölgesinde yer alan -426G/A polimorfizminin A alleli ile bağlantılı olup, birlikte kalıtım gösterdiği bildirilmiştir. Asp79His taşıyıcılarının yaklaşık %98'inde -426G/A polimorfizminin de bulunduğu gösterilmiştir. Asp79His taşıyıcıları arasında -426G/A polimorfizmi açısından da heterozigot olanlarda FV seviyesi benzer oranlarda iken, -426G/A homozigotluğunda FV seviyesinin düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar, -426G/A gen değişiminin, D79H mutasyonunun FV düzeyi üzerine etkisini arttırdığını göstermektedir (Lunghi vd 2005).

Bu çalışmada, FVL mutasyonunu homozigot olarak taşıyan, tromboz geçirmiş ve geçirmemiş bireylerde, -426 G/A gen değişiminin tromboz oluşumu üzerine etkisi araştırılmıştır. FVL mutasyonunu homozigot olarak taşıyan tromboz geçirmiş ve geçirmemiş bireyler arasında -426 G/A polimorfizminin genotip ve allel dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- Akar N, Akar E, Dalgın G, Sozuoğ A, Omurlu K, Cin S. Frequency of factor V (1691GA) mutation in Turkish population. *Thromb Haemost*. 1997;78:1527–1528.
- Akar N, Akar E, Yılmaz E. Factor V (his1299arg) in Turkish patients with venous thromboembolism. *Am J Hematol* 2000;63:102.
- Akar N, Arsan S, Deda G, Fitöz S, Soneltur B, Uysal Z. 2005, *Pediyatrik İnme*. Ankara: Çocuk Hakları Araştırma Vakfı, Baran Ofset.
- Akar N. 1999, *Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş (Genişletilmiş ikinci baskı)*. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi An Tıp A.Ş. Yayınları.
- Akar N. Factor V 1691 G-A mutation distribution in a healthy Turkish population. *Turk J Hematol* 2009;26:9-11.
- Altınışik J. Trombozlu Hastalarda Faktör V Leiden (G1691A) ve Protrombin G20210A Mutasyonlarının Araştırılması. T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2001.
- Altuntaş N, Soylu K, Suskan E, Akar N. Homocystein levels in Turkish children. *Turkish J. Hematology*.2004,21(2);79-82.
- Asselta R, Tenchini ML, Duga S. Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side. *J Thromb Haemost* 2006;4:26–34.
- Atakan M. Kütanoz Lökositoklastik Vaskülitli Hastalarda Hiperkoagülasyon Faktörlerinin Değerlendirilmesi. T.C. S.B. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Kliniği, Deri ve Zührevi Hastalıkları Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2006.
- Ateş H.Ö. Trombozlu Hastalarda Protein C Geninde Mutasyon Taraması.T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul 2001.
- Berber E, Kavaklı K, Akar N, Berber E, Çağlayan S.H Faktör V Geninde R506Q (FV Leiden) ve R485K Mutasyonları: Derin Venöz Tromboz ve Hemofili A Hastalarında insidans. *Turk J Hematol*. Yıl: 2003 Cilt: 20 Sayı;4:221-225.

- Bernardi F, Faioni EM, Castoldi E, Lunghi B, Castaman G, Sacchi E, Mannucci PM. A factor V genetic component differing from factor V R506Q contributes to the activated protein C resistance phenotype. *Blood* 1997; 90:1552–7.
- Bertina R, Koeleman B, Koster T, Rosendaal F, Dirven R, De Ronde H, Van Der Velden P, Reitsma P. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.
- Bick R.L, Kaplan H. Syndromes of Thrombosis and hypercoagulability Congenital and acquired Causes of Thrombosis. *Medical Clinics of North America* may 1998; 338; 25: 1840 – 1841. *Blood* 1999; 94: 3062–6.
- Bucciralli P, Rosendaal F.R, Tripodi A, Mannucci P.M. Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency or activated protein C resistance: A multicenter collaborative family study. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1999; Apr.19;1026–34.
- Büyükaşık Y. Arteriyel Tromboz ve Trombositler. *Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi: Hematoloji* 1(2/Özel Sayı: Kanama Ve Pıhtılaşma Bozuklukları) 2005;60–70.
- Castoldi E, Kalafatis M, Lunghi B, Simioni P, Ioannou PA, Petio M, Girolami A, Mann KG, Bernardi F. Molecular bases of pseudohomozygous APC resistance: the compound heterozygosity for FVR506Q and a FV null mutation results in the exclusive presence of FV Leiden molecules in plasma. *Thromb Haemost* 1998;80:403–6.
- Celkan T. Trombosit Fonksiyon Bozuklukları ve Vasküler Nedenli Kanamalar. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Kanama ve Tromboza Eğilim Sempozyum Dizisi* No: 36 • Kasım 2003; s. 37-60.
- Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998; 91:1135–9.
- Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry* 1992;3:3777–3785.

- Dahlbäck B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995;85:607–614.
- Dahlbak B. Resistance to activated protein C as risk factor for thrombosis: Molecular Mechanisms, Laboratory Investigation and Clinical Management. *Semin Hematol.* 1997; 34:217-234.
- de Paula Sabino A, Ribeiro DD, Carvalho MG, Cardoso J, Dusse LM, Fernandes AP. Factor V Leiden and increased risk for arterial thrombotic disease in young Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2006 Jun;17(4):271-5.
- Demiralp D.Ö, Akar, N. Prothrombin G20210A Gen Değişimi İle Protrombin Kompleks Proteinleri Ve Plazma Proteinleri Değişimlerinin Proteomik Analizler Değerlendirilmesi. XXXIII. Ulusal Hematoloji Kongresi Bildiri Özetleri Kitabı,2007.
- Dündar, S.M. Tromboz Tedavisi. *Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi: Hematoloji* 1(2/Özel Sayı: Kanama Ve Pıhtılaşma Bozuklukları) 2005;82– 90.
- Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, Margaglione M, De Stefano V, Cumming T, Arruda V, Hillarp A, Reny JL. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 case-control studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2001 Sep;86(3):809-16.
- Eskandari G, Demirkan F, Eskandari M M, Yazar M, Sucu N, Aydın S, Atik U: Cerrahi Girişim Yapılacak Hastalarda Factor V Leiden ve Protrombin G20210A Mutasyonlarının Prevalansı. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 4: 389–392, 2002.
- Esmon, C.T. 2001. Anticoagulant Protein C/ Thrombomodulin Pathway,(170);4327–4338.
- Faioni EM, Franchi F, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Finazzi G, Mannucci PM. Coinheritance of the HR2haplotype in the factor V gene confers an increased risk of venous thromboembolism to carriers of factor V R506Q (factor V Leiden).



- Ferhanoğlu B. Hemostaz Metabolizması. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Kanama ve Tromboza Eğilim Sempozyumu Dizisi, No:36, Kasım 2003:9–16.
- Guyton, A.C: Hemostasis and Blood Coagulation. Textbook of Medical Physiology, 8th. Edition. Ch.36,p: 390 – 99.An ABJ International Edition, W.D. Saunders Company, Philadelphia,1991.
- Güneş A.M, Baytan B, Günay Ü. Çocukluk Çağında Kalıtsal Tromboz. The Journal of Current Pediatrics. Cilt:2, Sayı:2,2004.
- Haliloğlu B. Açıklanamayan Tek Bir 3.Trimester Fetal Kayıp Olgularında Faktör V Leiden Ve Protrombin Gen Mutasyonunun Yeri. T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul 2004.
- Hiyoshi M, Arnutti P, Prayoonwivat W, Nathalang O,Suwanasophon C, Kokaseam R, Hashimoto S, Takubo T, Tagawa S,Fukui M, Tatsumi N. A polymorphism nt 1628G→A (R485K) in exon 10 of the coagulation factor V gene may be a risk factor for thrombosis in the indigenous Thai population. Thromb Haemost. 1998;80:705–6.
- İliçin G, Ünal S, Biberöglü K, Akalın S, Süleymanlar G. Pıhtılaşma Bozuklukları. Temel İç Hastalıkları. Güneş Kitapevi, Ankara, 1996:s:1350–1370.
- Jenny RJ, Pittman DD, Toole JJ, et al. Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:4846–4850.
- Jenny RJ, Tracy PB, Mann KG. The physiology and biochemistry of factor V. In: Bloom AL,Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds.Haemostasis and Thrombosis. 3rd ed. Edinburgh:Churchill Livingstone; 1994:465-476.
- Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Kofoed S, Jensen G, Nordestgaard BG. Factor V Leiden: The Copenhagen City Heart Study and 2 meta-analyses. Blood. 2002 Jul 1;100(1):3-10.
- Klug, Ws., Cummings, Mr.2000.Genetik Kavramlar, 6. Baskı. Prentice Hall, Prof. Dr. Cihan Öner, Ankara . ABD.

- Kostka H, Schwarz T, Schellong S, Mix C, Kuhlisch E, Temelkova-Kurktschiev T, Henkel E, Kohler C, Gehrisch S, Siegert G. Coagulationfactor V G allele and HR2 haplotype: factor V activity, activated protein C resistance and risk of venous thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003;14:49–56.
- Kumar, Cotran, Robbins. *Temel Patoloji (Basic Pathology)*. W.B.Saunders Company. 5th Ed. Çeviri editörü: Prof.Dr. Uğur Çevikbaş. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti,1992.
- Lane D.A, Mannucci P.M, Baver K.A. Inherited Thrombophilia. *Thrombosis Haemostasis* 1996;76:824–829.
- Lunghi B, Scanavini D, Girelli D, Legnani C, Bernardi F. Does factor V Asp79His (409 G/C) polymorphism influence factor V and APC resistance levels? *Thromb Haemost*. 2005;3:415-416.
- Le W, Yu JD, Lu L, Tao R, You B, Cai X, Cao WJ, Huang W, He RM, Zhu DL, Chen Z, Gong LS. Association of the R485K polymorphism of the factor V gene with poor response to activated protein C and increased risk of coronary artery disease in the Chinese population. *Clin Genet*. 2000;57:296–303.
- Lee R.G, Bithell T.C, Foerster J, Athens J.W, Lukens J.N. Platelets hemostasis and coagulation. *Wintrobe's clinical Hematology*, 9. Edition, 1993;511–16.
- Lunghi B, Castoldi E, Mingozi F, Bernardi F, Castaman G. A novel factor V null mutation detected in a thrombophilic patient with pseudohomozygous APC resistance and in an asymptomatic unrelated subject [letter]. *Blood*. 1998;92:1463-1464.
- Lunghi B, Iacoviello L, Gemmati D, Dilasio MG, Castoldi E, Pinotti M, Castaman G, Redaelli R, Mariani G, Marchetti G, Bernardi F. Detection of new polymorphic markers in the factor V gene: association with factor V levels in plasma. *Thromb Haemost* 1996;75: 45–8.
- Mumford AD, McVey JH, Morse CV, Gomez K, Steen M, Norström EA, Tuddenham EG, Dahlback B, Bolton-Maggs PH. Factor V I359T: a novel mutation associated with thrombosis and resistance to activated protein C. *Br J Haematol*. 2003;123:496–501.

- Noll G, Luschner T.F. Influence of lipoproteins on endothelial function. *Thrombosis Research*, 1995;74:45–54.
- Norstrom E, Thorelli E, Dahlback B. Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Blood* 2002;100:524–30.
- Page C, Rubin LE, Gusberg RJ, Dardik A. Arterial thrombosis associated with heterozygous factor V Leiden disorder, hyperhomocysteinemia, and peripheral arterial disease: importance of synergistic factors. *J Vasc Surg*. 2005 Nov;42(5):1014-8.
- Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995; 332:912–7.
- Rees DC. The population genetics of factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Haematol* 1996; 95:59-586.
- Rosen S.B, Sturk A. Activated protein C resistance – A major risk factor for thrombosis. *Eur J. Clin.Chem.Clin Biochem* 1997,35(7):501-516.
- Rosendaal F.R. Venous thrombosis: a multicausal disease. *The Lancet* April 1999; 353;3: 1167–1173.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230;4732:1351-354.
- Segers K, Dahlbäck B, Bock PE, Tans G, Rosling J, Nicolaes GA. The role of thrombin exosites I and II in the activation of human coagulation factor V. *J Biol Chem*. 2007 Nov 23;282(47):33915-24.
- Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 1994; 330 51-522.

- Sılan F. , Zafer C. : Faktör V Leiden Mutasyonu. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi,2004;1:33-36.
- Smith C, Marks A, Lieberman M. Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins.2.edition,2007.
- Steen M, Norström EA, Tholander AL, Bolton-Maggs PH,Mumford A, McVey JH, Tuddenham EG, Dahlback B. Functional characterization of factor V-Ile359Thr: a novel mutation associated with thrombosis. Blood 2004; 103: 3381–7.
- Suehiro Y, Veljkovic DK, Fuller N, et al. Endocytosis and storage of plasma factor V by human megakaryocytes. Thromb Haemost 2005; 94: 585–592.
- Terzioğlu M, Yiğit G, Oruç T. Kan Pıhtılaşması ve Kanamanın Durdurulma Mekanizmaları (Koagulasyon ve Hemostaz) sy:177–225 Fizyoloji Ders Kitabı Cilt II, İ.Ü.C.T.F Fizyoloji A.D. İstanbul, 1993.
- Uçar F, Ovalı E, Önder E, Değer O, Özdemir F. Faktör V Leiden Biyokimyası, Genetiği, Risk Grupları ve Moleküler Düzeyde Tayini. İbni Sina Tıp Dergisi 2001;6: 60 -65.
- Ulutin T, Cengiz M, Yüksel A, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü Tıbbi Biyoloji Ders Notları 1, Nobel Tıp Kitapevleri, 45–109,2000.
- Vos HL. Inherited defects of coagulation factor V: the thrombotic side. J Thromb Haemost 2006;4:35–40.
- van Wijk R, Nieuwenhuis K, van den Berg M, Huizinga EG, van der Meijden BB, Kraaijenhagen RJ, van Solinge WW. Five novel mutations in the gene for human blood coagulation factor V associated with type I factor V deficiency. *Blood*. 2001;98:358–367.
- Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306→Thr) associated with resistance to activated protein C. Blood 1998; 91: 1140–4.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Arjan J. Esmael

Doğum Yeri : IRAK-KERKÜK

Doğum Tarihi : 19.12.1982

Cinsiyet : Erkek

Medeni Hali : Bekar

Yabancı dili : Arapça(Çok iyi)-İngilizce(Orta)

Eğitim Durumu : Kerkük Fen Lisesi (1997-2001)

Kerkük Üniversitesi Teknik Fakültesi Tıbbi Laboratuvar Bölümü  
(2001-2006)

Gazi Üniversitesi-TÖMER (2006-2007)