

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNME GEÇİRMİŞ OLAN ÇOCUKLARDA *TROMBOMODULİN*
GENİNİN TARANMASI**

Hamit Emre KIZIL

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

2009-ANKARA

KABUL ONAY

Prof.Dr.Nejat AKAR danışmanlığında Hamit Emre KIZIL tarafından hazırlanan bu çalışmatarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

imza :

Üye :

imza :

Üye :

imza :

Üye :

imza :

Üye:

imza :

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA
Enstitü Müdür

İnme Geçirmiş Olan Çocuklarda Trombomodulin Geninin Taranması

ÖZET

İnme, dünyada en sık görülen üçüncü ölüm nedenidir, morbiditenin ise en sık sebebidir. Son on yıl içerisinde, inme nedeniyle ölüm oranları tüm dünyada oldukça azalmıştır ve bu nedenle morbiditeye neden olan inme risk faktörlerinin tespiti önem kazanmıştır.

Trombomodulin (TM), proteoglikan yapısında glikozile bir transmembran proteindir. Endotel hücrelerinde lokalize trombin reseptörüdür. Trombin fonksiyonları üzerinde düzenleyici rolü nedeniyle trombomodulin olarak isimlendirilmiştir. 557 amino asitten oluşur. Fonksiyonlarının bir kısmını trombinle kompleks yaparak protein C ve trombinle aktive edilen fibrinolizis inhibitörü (TAFI) üzerinden; bir kısmını da trombinden bağımsız olarak yapar.

Pediyatrik inmenin, pediyatrik yaş grubunda görülen tromboz olgularının büyük bir kısmını oluşturmasından dolayı çalışmamızda pediyatrik inmeli bireylerde, koagulyasyon ve fibrinoliz arasında denge görevi gören *Trombomodulin* geninde bulunan muhtemel değişimler gözlenmeye çalışılmıştır. Çalışmaya pediyatrik yaş grubundan inme teşhisi konmuş 190 birey dahil edilmiştir. Kanlardan izole edilen DNA'lar sırasıyla PCR, SSCP, DNA Dizi Analizi teknikleri kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda bireylerden birinin *trombomodulin* geninde c.519 C>G polimorfizmi gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: CVA, inme, trombomodulin, polimorfizm

Screening Thrombomodulin Gene In Pediatric Stroke Patients

SUMMARY

Stroke is the third most common cause of mortality and of morbidity in the world. In the past decade, the mortality rate from stroke has declined, but the risk factors which may cause morbidity have increased.

Thrombomodulin (TM) is a 557 amino acid a glycosylated transmembrane protein and is a thrombin receptor located on endothelial cell surface. It was named as thrombomodulin due to its modulator role on the functions of thrombin. While a part of TM's physiological functions are through the activity of the TM-thrombin complex on protein C and on thrombin activated fibrinolysis inhibitor (TAFI), a substantial number TM functions are independent from thrombin.

The pediatric stroke is the most observed type of thrombosis in the pediatric age. Here we aimed to study the *thrombomodulin* gene which play a balancing role in coagulation and fibrinolysis. We screened 190 samples of pediatric stroke patients. Following DNA extraction, PCR, SSCP and DNA sequencing analysis of *Thrombomodulin* gene was performed. We have identified a patient with c.519 C>G polymorphism in the thrombomodulin gene.

Key Words: Stroke, CVA, thrombomodulin, polymorphism

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde beni birimine kabul ederek her türlü yardım, bilgi ve desteğini esirgemeyen ve gelecekte de tecrübelerine ihtiyaç duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR' a; tecrübeleri ve bilgilerinden her zaman yararlandığım, laboratuara başladığım ilk günden beri hoşsohbetiyle sıcak bir çalışma ortamı yaratan Uzm. Bio. Ece AKAR' a; çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen ve her türlü sıkıntıda yardımına koşan, bundan sonra da bilgilerine ve dostluğuna ihtiyaç duyacağım Bio. Dr. Erkan YILMAZ' a; tecrübelerini ve sıcak dostluğunu her zaman arayacağım Uzm. Bio. Yonca EĞİN' e; bütün laboratuvar çalışmalarım için gerekli birikim ve tecrübe altyapısını edinmemi sağlayan Bio. Emel USLU' ya; dostluğunu ve yardımlarını benden eksik etmeyen Kadir SİPAHİ' ye; çalışmam boyunca arkadaşlığıyla, bilgi ve önerileriyle yanımda olan Bio. Dr. Ayşenur ÖZTÜRK' e; birlikte çalışmaktan keyif aldığım çalışma arkadaşlarım, Bio. Dilara Fatma AKIN, Uzm. Bio. Didem TORUN, Uzm. Bio. Afife KARABIYIK, Bio. Gülin GÜLBAHAR, Bio. Duygu SANLIDİLEK, Uzm. Bio. Özge CUMAOĞULLARI, Bio. Zehra VELİ, Bio. Sezen BALLI, Bio. Esin GÜNGÖR, Uzm. Bio. Filiz Başak CENGİZ, Uzm. Bio. Duygu DUMAN, Çiğdem ASLAN ve ismini sayamadığım bütün Pediatrik Moleküler Genetik ailesine çok teşekkür ederim. Ayrıca yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve her türlü başarımın asıl mimarı olan sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
DİZİLERİN LİSTESİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İNME (FELÇ)	3
2.1.1. İnmenin Anatomi Ve Patofizyolojisi	5
2.1.2. İnmede Etyoloji Ve Sınıflandırma	5
2.1.3. Risk Faktörleri.....	7
2.1.4. İnmede Tanı Yöntemleri.....	9
2.1.5. İnme Tedavisi.....	9
2.2. HEMOSTAZ.....	10
2.2.1. Koagülasyon Faktörlerinin Sınıflandırılması.....	12
2.2.2. Koagülasyon Fizyolojisi.	14
2.3. KOAGULASYON KASKADI.....	14
2.3.1. İntrinsik Yol.....	15
2.3.2. Ekstrensik Yol	15
2.3.3. Ortak Yol	16
2.4. FİBRİNOLİZİS	16
2.4.1. Plazma fibrinolitik sistemi	17
2.4.2. Hücresel fibrinoliz.....	17
2.5. TROMBOMODULİN	18
2.5.1. Doku Trombomodulin (hücresel form)	18
2.5.2. Çözünebilir TM	20
2.5.3. <i>Trombomodulin</i> Geni.....	20

2.5.4. Trombin – Trombomodulin Kompleksi	20
2.5.5. Protein C Sistemi.....	21
2.5.6. Trombomodulinin fibrinolizisdeki rolü	22
2.5.7. <i>Trombomodulin</i> Genindeki Değişimler	23
2.6. MOLEKÜLER TEKNİKLER	24
2.6.1. Çözelti Ve Solüsyonlar	24
2.6.2. DNA Ekstraksiyonu	24
2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	24
2.6.4. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformational Polymorphism)	28
2.6.5. DNA Dizi Analizi.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	32
3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI.....	32
3.2. YÖNTEMLER.....	32
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	32
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	33
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	37
3.2.4. SSCP Jeli için Poliakrilamid Jel Hazırlanması.	38
3.2.5. SSCP Jeli için Gümüş Boyama.	39
3.2.6. PCR Ürünlerinin Temizlenmezi (Pürifikasyon).....	39
3.2.7. DNA Dizi Analizi	40
3.3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	41
3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları	41
3.3.2. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) Bulguları.....	42
3.3.3. DNA Dizi Analizi Bulguları.....	44
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR	46
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1: Sinovenöz tromboz.....	4
Şekil 1.2: Pıhtılaşma Mekanizması.....	16
Şekil 1.3. Fibrinolizis Mekanizması.....	17
Şekil 1.4. Trombomodulin domain yapısı.....	19
Şekil 1.5: Endotelde bulunan trombinin TM ile bağlanarak PC'yi aktive etmesi	21
Şekil 1.6: Trombin – Trombomodulin kompleksinin koagülasyon ve fibrinolizisdeki rolü.....	22
Şekil 1.7. <i>Trombomodulin</i> geninde yer alan değişimler.....	23
Şekil 2.1. <i>Trombomodulin</i> genine ait bölgelerin PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	41
Şekil 2.2. <i>Trombomodulin</i> genine ait bölgelerin SSCP görüntüleri (1).....	42
Şekil 2.3. <i>Trombomodulin</i> genine ait bölgelerin SSCP görüntüleri (2).....	43
Şekil 2.4. <i>Trombomodulin</i> genine ait bölgelerin DNA dizi analizi görüntüleri (1).....	44
Şekil 2.5. <i>Trombomodulin</i> genine ait bölgelerin DNA dizi analizi görüntüleri (2).....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1: Risk Faktörlerinin Sınıflandırılması.....	8
Çizelge 1.2: Koagülasyon Faktörleri.....	13

DİZİLERİN LİSTESİ

Sayfa No

Dizi 1.1.	SSCP tekniği için amplifiye edilen TM promotor bölgesi.....	34
Dizi 1.2.	SSCP tekniği için amplifiye edilen TM birinci bölge.....	34
Dizi 1.3.	SSCP tekniği için amplifiye edilen TM ikinci bölge.....	34
Dizi 1.4.	SSCP tekniği için amplifiye edilen TM üçüncü bölge.....	35
Dizi 1.5.	SSCP tekniği için amplifiye edilen TM dördüncü bölge.....	35
Dizi 1.6.	SSCP tekniği için amplifiye edilen TM beşinci bölge.....	36
Dizi 1.7.	SSCP tekniği için amplifiye edilen TM altıncı bölge.....	36
Dizi 1.8.	SSCP tekniği için amplifiye edilen TM yedinci bölge.....	36

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
A	Adenin
AP	Aktive protein
Arg	Arjinin
bç	Baz çifti
C	Sitozin
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksigüanozin trifosfat
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
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
FVIIAg	FVII Antijen
FVII:C	FVII koagülasyon aktivitesi
g	Gram
G	Guanin
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 inhibitörü 1
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	Pikomol
s	Saniye
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Ser	Serin
SSCP	Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi
TE	Tris EDTA
TBE	Tris, Borik asit, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
TF	Doku Faktörü
TM	Trombomodulin
T	Timin
VWF	Von Willebrand Faktörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Trombomodulin (TM), endotel hücrelerinde lokalize trombin reseptörüdür (Esmon 1995). TM'in antifibrinolitik etkisi trombin üzerinden ve trombinden bağımsız olmak üzere iki farklı mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. TM, trombinle aktive edilen fibrinolitik inhibitörü (TAFI)'nin aktivitesini uyararak, fibrin pıhtıdaki plazminojenin aktivasyonunu ve sonuçta fibrinolizi inhibe eder. Karboksipeptidaz yapısındaki TAFI, TM ile aktive olduktan sonra, fibrin molekülünün karboksil terminalindeki arjinin ve lizini uzaklaştırarak, fibrinolitik enzimlerin fibrin molekülü tarafından tutulmasını önler. Bu şekilde fibrin molekülü lizise dirençli duruma gelir (Ermiş et al. 2006).

Trombomodulin geninde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu polimorfizmlerin bazıları TM konsantrasyonlarında azalmaya yol açtığından MI (miyokard infarktüsü) ve karotis arteriosklerozu ile ilişkili olabilmektedir. Genin lektin benzeri bölgesindeki A25T polimorfizminde MI riskinin 2 kat arttığı ve bu polimorfizmin diğer ateroskleroz risk faktörleri ile pozitif etkileşim gösterdiği bildirilmiştir. Ancak bu nokta mutasyonunda TM'in PC'yi aktive etme özelliği etkilenmediğinden, olumsuz etkilerin, TM'in PC'den bağımsız işlevleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca pulmoner emboli teşhisi konmuş İspanyol bir erkek hastanın *trombomodulin* geninde g.1456G>T mutasyonu bulunmuştur. TM düzeyleri ve serebrovasküler hastalıklar arasında da ilişki bulunmaktadır. Bir başka çalışmada da hemorajik inme ile plazma TM seviyeleri arasında negatif korelasyon olduğu bildirilmiştir (Johansson et al. 2002).

Pediyatrik inme, pediyatrik yaş grubunda görülen tromboz olgularının yaklaşık üçte birini oluşturmaktadır. Ortaya çıkışında altta yatan bireysel genetik değişikliklerin de rolü olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Pediyatrik inmenin oluşmasına yol açabilecek farklı mekanizmalardaki gen değişimleri değişik araştırmaların konusu olmuştur. Erişkin inmelerinden farklılık gösterdiğinden, kalıtsal etmenlerin pediyatrik inmedeki rollerinin de farklılıklar göstermesi beklenmektedir.

Çalışmamızda tromboza yatkınlığa neden olduğu düşünölen genlerden *trombomodulin* geni pediatrik inmele 190 bireyden elde edilen DNA örneklerinde taranarak olası gen değişimlerinin pediatrik inme üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNME (FELÇ)

İnme, Dünya Sağlık Örgütü'nün MONICA projesine göre damarlardaki tıkanma veya kanama sonucunda ortaya çıkan fokal serebral hasar olarak tanımlanır (Thorvaldsen et al. 1995). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) inmeyi; ani gelişen, 24 saat veya daha uzun süren, ölüme yol açabilen, damarsal kökenli, fokal veya global serebral fonksiyon bozukluğu ile oluşan klinik bulgular olarak tanımlamıştır. İnme, dünyanın en önemli üçüncü büyük ölümcül hastalığıdır (Bilguvar et al. 2008).

Türkiye için kesin sayılar bilinmemekle birlikte, ABD'de her yıl 500.000 yeni inme olgusu ve bunlara bağlı 150.000 ölüm gerçekleşmektedir. İskemik kaynaklı inmeler büyük oranda embolik arteriyel oklüzyona bağlıdır ve %75'i karotid arter sulama alanında gerçekleşir. Beyin dokusunun iskemiye olan direnci düşüktür. Akut inmede, tıkanma yerine ve vasküler kollaterallere göre değişen büyüklükte hücre ölümü meydana gelir. Akut dönemde işlevlerini yitiren ancak canlılığını henüz kaybetmemiş hücreler (penumbra) bulunmaktadır. Bu hücreleri kurtarabilmenin mümkün olması nörolojik kaybın sınırlanmasını sağlayacaktır (Baltacıoğlu et al. 2003).

Travma, enfeksiyon, tümör gibi nedenlere bağlı infarkt veya kanama, serebral iskemiye bağlı geçici iskemik ataklar tanımlama dışı bırakılmıştır (Kumral ve Kumral 1993). Tüm inmelerin %70-85'ini serebral infarkt, %7-15'ini intraserebral hematoma, %2-8'ini subaraknoid kanama oluşturur. İnmede temel özellik nörolojik bulguların ani başlamasıdır (Shinkawa et al. 1988).

Tıkanma sonucu oluşan inme; ya venöz sistemi (sino – venöz trombus) ya da arteriyel sistemi (arteriyel iskemik inme) etkiler. Arteriyel iskemik inmeye bağlı beyin hasarı veya infarkt, sino – venöz trombüse bağlı infarktan çok daha fazla görülmektedir. Arteriyel iskemik inmede arteriyel tıkanıklık genelde tromboemboliye sekonderdir. Arteriyel ya da sino – venöz

trombüsler kanamalı veya kanamasız olabilir. Damar rüptürü sonucunda gelişen inme “hemorajik inme” olarak adlandırılır ve en sık intra – serebral veya subaraknoid kanama sonucunda gelişir. Genel olarak arteriyel iskemik inme; emboli veya lokal trombüs oluşumu sonucunda gelişir (Şekil 1.1). Çocuklarda inme tanısı ve tedavisi erişkinlerdekinden oldukça farklı ve zordur. Bunun da bazı sebepleri vardır;

1. İnme erişkinlerde sıktır ve tanınması kolaydır ve tedavi prensipleri saptanmıştır,
2. Damardaki tıkanmaya bağlı inmelerin erişkinlerdeki en önemli sebebi aterosklerozdur. Bu nedenle tanım, önlem ve tedavi prensipleri saptanmıştır. Buna karşılık çocuklardaki inme sebepleri çok daha değişikdir, bu nedenle de tanım ve tedavi prensipleri henüz tartışmalıdır.
3. Erişkinde inmenin profilaksi ve tedavisi belirli prensiplere bağlanmıştır. Çocuklarda henüz profilaksi ve tedavi protokolleri geliştirilmemiştir.
4. Yeni doğan dönemi çocukluk çağı inmelerinin 1/3'ünün görüldüğü dönemdir. Çocuklardaki hemostatik, serebrovasküler ve nörolojik sistemdeki gelişim farklılıkları çocuklardaki inme izlemine, erişkinlerden farklı kılmaktadır (Andrew et al. 2000).



Şekil 1.1: Sinoventöz tromboz (Thromboembolic complications during infancy and childhood)

2.1.1. İnmenin Anatomi ve Patofizyolojisi

Arteriyel İskemik İnmenin Anatomi ve Patofizyolojisi:

Beynin arteriyel beslenmesi ön ve arka dolaşım olmak üzere iki sistem tarafından sağlanmaktadır. Ön dolaşım karotid arterler, arka dolaşım ise çift vertebral arterin birleşmesi sonucunda oluşan basiller arterden oluşur. Ön ve arka arteriyel sistem anterior ve posterior komünikan arterler tarafından birleştirilerek Willis poligonunu oluştururlar. Willis poligonundan anterior, orta ve posterior serebral arterler çıkar. Anterior ve orta serebral arterler karotid sistemin, posterior serebral arter de vertebro – basiller sistemin ana dallarıdır. Beynin derin yapılarını ve basal ganglionları sulayan arterler anterior, orta ve posterior serebral arterlerin dalları olan küçük perforan ve lentikülostriat dallarıdır.

Genel olarak arteriyel iskemik inme emboli veya lokal trombüs sonucunda gelişir. Trombüs gelişmesi için ya arter duvarının zedelenmesi ya da serebral arterde tıkanıklık olması ve buna bağlı olarak da nonlaminar kan akımının olması gerekir.

Emboli genelde konjenital ve akiz kalp hastalıkları veya arter disseksiyonu sonucunda gelişir. Lokal vasküler anormallikler kan akımını azaltarak trombüs oluşumuna yol açarlar (Swaiman et al. 1999).

2.1.2. İnmede Etyoloji ve Sınıflandırma

İnme etyolojisine yönelik ilk sınıflandırmalar genellikle lezyonun patolojisine göre yapılmış ve tüm inmeler “iskemik” ve “hemorajik” olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda ise, ileri nöroradyolojik, kardiyolojik, hematolojik ve biyokimyasal tetkiklerin kullanılmasıyla, lezyonun patolojisi ile birlikte, lezyon lokalizasyonu ve oluş mekanizması göz önüne alınarak sınıflandırmalar yapılmıştır. Buna göre inme alt gruplarının görülme

sıklığı; %3-10 subaraknoid kanama, %10-15 intraserebral hemoraji ve %60-80 serebral iskemi şeklindedir (Utku et al. 2005).

a.) Kanamalı İnme: Kanamalı inme, normal bir beyin damarında rüptür veya anevrizma veya arterivenöz malformasyon rüptürü sonucunda gelişir. Bu kanama sonucunda kan beyin parankimine, ventriküler sisteme veya subaraknoid alana sızar. Kanamalı inmeler kanamanın anatomik bölgesine göre isim alırlar ve “intraserebral kanama” ve “subaraknoid kanama” olarak sınıflandırılırlar.

Çocuklarda kanamalı inme, iskemik inme kadar sıktır. Kanamalı inme sebepleri iskemik inme sebeplerinden çok farklıdır.

a.1.) Intraserebral Kanama: Serebral arter ve venlerin rüptürü sonucunda intraserebral kanama olur. Kanama sonucunda oluşan hematoma mekanik olarak nöronal yapılarda hasara yol açar. Kanama ve kan – beyin bariyerinin bozulması sonucunda beyin ödemi gelişir ve buna bağlı olarak hastalarda ağır nörolojik hasar ve konvülsiyon olur. Eğer kanama ve ona eşlik eden beyin ödemi geniş ise kitle etkisi yaparak kafa içi basınç artışı ve fokal herniasyon bulguları gelişir, özellikle posterior fossada beyin sapına baskıyı engellemek için acil cerrahi müdahale gerekebilir.

a.2.) Subaraknoid Kanama: Subaraknoid bölge piamater ile araknoid arasındaki bölgedir. Bu bölgede normal olarak beyin omurilik sıvısı (BOS) vardır ve superior sagittal sinüsten subaraknoid mesafeye uzanan araknoid granülasyon tarafından absorbe edilir. Willis poligonunu oluşturan serebral arterler ve bunların major dalları subaraknoid bölgede yer alır ve bunlar beyin parankimine girerken orta ve küçük dalları subaraknoid bölgeyi terk ederler. Eğer arter rüptürü Willis poligonunun proksimal kısmında ise kanamanın büyük kısmı beyni çevreleyen subaraknoid mesafededir (Akar et al. 2005).

b.) Serebral İnfarkt: Serebral infarktlarda etyolojiye göre sınıflama, akut iskeminin tedavisi ve prognozunu yanı sıra, ikincil koruma açısından da çok önemlidir. Buna karşılık, klinik ve nöroradyolojik bulguların bazı inme alt gruplarında benzerlik göstermesi nedeniyle, etyolojik sınıflandırma oldukça güçtür.

1993 yılında yayınlanan *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)* çalışmasında kullanılan sınıflandırma, klinik bulguların yanı sıra etyolojiye de yer verdiğinden günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. (Adams et al. 1993) İskemik inmeler, *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)* çalışmasında kullanılan sınıflamaya göre beş gruba ayrılırlar:

- 1- Geniş arter ateroskleroza (tromboz veya emboli)
- 2- Kardiyoembolizm
- 3- Küçük damar oklüzyonu (lakün)
- 4- Diğer belirlenen etiyolojiler
- 5- Nedeni belirlenemeyenler (Utku et al. 2005)

2.1.3. Risk Faktörleri

Akut inme tedavisindeki gelişmelere rağmen, inme, ölüm ve özürlü oluşturmaktaki önemini hala korumaktadır. Bunun için risk faktörlerini belirleyip bunlardan korunmak, toplum sağlığı ve ülke ekonomisi açısından önemlidir.

Risk Faktörlerinin Sınıflandırılması

I– Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

- a) Yaş
- b) Cins
- c) Irk
- d) Aile öyküsü

II– Değiştirilebilen Risk Faktörleri

a) Kesinleşmiş Faktörler

- 1– Hipertansiyon
- 2– Değişik derecelerde glukoz intoleransı
- 3– Kalp Hastalıkları
- 4– Hiperlipidemi
- 5– Sigara
- 6– Asemptomatik karotis stenozu
- 7– Orak hücreli anemi

b) Kesinleşmemiş Faktörler

- 1– Alkol kullanımı
- 2– Obezite
- 3– Beslenme alışkanlıkları
- 4– Fiziksel inaktivite
- 5– Hiperhomosistinemi
- 6– İlaç kullanımı ve bağımlılığı
- 7– Hormon Tedavisi
- a) Oral kontraseptif kullanımı
- b) Hormon replasman tedavisi
- 8– Hiperkoagülabilité
- 9– Fibrinojen

Çizelge 1.1: Risk Faktörlerinin Sınıflandırılması

2.1.4. İnmede Tanı Yöntemleri:

İskemik inme geliştiği düşünölen hastalarda tam kan sayımı yapılmalı, eritrosit sedimentasyon hızı ölçölmeli, parsiyel tromboplastin zamanı, plazma glukoz seviyesi, kan üre nitrojeni ve serum kreatinini değeriendirilmeli, lipid analizi, sifiliz serolojisi, idrar analizi, göğüs filmi ve elektrokardiyografiyi içeren temel bir tarama yapılmalıdır. İnvasiv olmayan kan akımı incelemeleri, örneğin karotid ve transkranyal Doppler çalışmaları stenotik ya da tıkalı arterleri gösterebilir. Kontrastsız bilgisayarlı beyin tomografisi tüm hastalarda yapılmalıdır. Manyetik rezonans görüntöleme ve intrakranyal-ekstrakranyal manyetik rezonans anjiografi, akut inmenin lokalizasyonunu tanımlamada, ilgili kan damarlarının durumunu noninvaziv olarak ortaya koymada etkilidir. Difüzyon ve perfüzyon manyetik rezonans görüntöleme, iskemik beyin dokusunu görüntölemede en hassas tekniklerdir. Gerekli durumlarda embolinin kardiyak kökenini değeriendirmek amacıyla ekokardiyografik inceleme yapılmalıdır. Arteriyel yapıyı göstermede ve stenozun oranını tespit etmede altın standart; konvansiyonel anjiografi veya intraarteriyel dijital substraksiyon anjiografisidir. Kanamanın ilk birkaç saatinde bilgisayarlı beyin tomografisi intraserebral hemoraji için en duyarlı tetkiktir. Manyetik rezonans görüntöleme, kanamadan birkaç saat sonra intraserebral hematomu ve yaşını gösterir. Manyetik rezonans görüntöleme bulgularındaki değerişiklikler hemoglobin yıkımının evrelerine bağlıdır (Öztürk 2005).

2.1.5. İnme Tedavisi

Akut iskemik inme tedavisi acildir. İskemik inme patogenezinde dokuya kan sağlanması azalması söz konusu olduğu için, eğer kan akımındaki azalma süratle düzeltilmezse, dokuda geri dönüşü olmayan hasar meydana gelir (Futrell and Millikan 1996).

İskemik inmenin tedavisinde amaçlanan hedefler, hasarlanan beyin dokusu miktarını en alt düzeye indirmek, ilk iskemiye veya tekrarlayan iskemik olaylara ikincil meydana gelebilecek ek beyin dokusu hasarını engellemek ve hastanın fonksiyonel iyileşmesini kolaylaştırabilecek önlemleri almaktır. Bu hedeflerin yerine getirilebilmesinin en önemli gereklerinden biri de akut dönemde hasta için en uygun tedavi seçeneklerinin oluşturulması ve bu dönemde oluşabilecek komplikasyonların önüne geçmektir. Antiagregan, antikoagulan, trombolitik,

antiödem ve sitoprotektif tedaviler bu yaklaşımların ana başlıklarını oluşturmaktadır (Sarıbaş et al. 2005).

Intraserebral hemorajinin tedavisinin ana amacı kan basıncını kontrol etmek, solunum sistemini desteklemek, intrakranyal basıncı düzeltmek ve gerekirse cerrahi girişim yolu ile kanı boşaltmak esasına dayanmaktadır. Antiödem tedavinin yanı sıra, kan basıncı ortalama değerinin 90-130 mmHg arasında tutulması önerilmektedir. Arteriyel kan basıncı değerinin %25'ten daha fazla düşürülmemesi önemlidir (Özdemir ve Özbabalık 2005).

2.2. HEMOSTAZ

Hemostaz, kanın dolaşımında sıvı halde kalmasını sağlayan fizyolojik mekanizmadır. Fizyolojik mekanizmanın kanın sıvı halde kalmasını sağladığı gibi, kan damarlarında herhangi bir travma sonucu oluşan kanamayı durdurduğu ve daha sonra aynı damarın fonksiyonunu devam ettirmesi için damarın pıhtıdan temizlenerek açıldığı ve bu fonksiyonu da hemostaz- fibrinolitik aktivitelerin bir denge içinde çalışması aracılığı ile gerçekleştirdiği bilinmektedir (Goodnight and Hathaway 2001).

Hemostaz, koagulasyon ve fibrinoliz arasındaki hassas dengenin sonucunda oluşan bir fizyolojik süreçtir. Bu dengenin koagulasyon lehine bozulması trombüs oluşumuna, fibrinolizinin artışı ise kanamaya neden olmaktadır (Kumada et al. 1988).

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

Bir damarın hasara uğramasından sonra şu olaylar gelişmektedir:

1- Dolaşan trombositler normal endotele veya birbirlerine yapışmazken endotel bütünlüğü bozulunca trombositler açığa çıkan subendotelyal kollajene yapışırlar. Buna trombosit adhezyonu denir. Bu olayda, endotelyal hücreler tarafından yapılan Von Willebrand Faktör'ü (VWF), trombosit ile subendotelyumu birleştiren köprü vazifesi görür.

2- Trombositler hasar bölgesinde oluşan trombin ve kollajenin başlattığı reaksiyonlar ile aktive olur.

3- Uyarılar sonucu bir membran fosfolipidi olan fosfotidil inozitoltrifosfatı hidrolize eden fosfolipaz C enzimi aktive olur. Bu reaksiyon ürünleri proteinkinaz C'yi aktive ederken trombosit sitoplazmasındaki kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) konsantrasyonunu artırır.

4- Trombositler biçim değiştirir ve uzun psödopodlar oluştururlar.

5- Trombosit yüzey membranının Glikoprotein IIb / IIIa reseptörleri vardır. Fibrinojen ve diğer adhezif proteinler bu reseptörlere bağlanır ve trombositlerin birbirine yapışmasına neden olur. Bu olaya trombosit agregasyonu denir.

6- Membran fosfolipitlerinden arakidonik asit serbestleşir ve bu, prostaglandin H2 (PGH2) ile tromboksan A2'ye (TxA2) okside olur. PGH2, kollajen ile indüklenen trombosit aktivasyonu için önemli bir kofaktördür. TxA2 ise kendi başına bir diğer trombosit aktivatörüdür.

7- Trombosit içeriği sekrete edilir. ADP, trombosit aktivasyonunu uyarır ve geliştirmekte olan tıkaçta yeni trombositleri çağırır.

8- Trombosit yüzey membranı değişikliğe uğrar ve kan pıhtılaşmasının enzim / kofaktör komplekslerinin trombosit yüzeyinde oluşması için gerekli prokoagulan fosfolipitleri (trombosit faktör 3) ortaya çıkarır. Granüllerden trombosit faktör V'in salınımı, enzim / kofaktör komplekslerinden biri için diğer bir anahtar komponentini oluşturur. Sonuçta,

trombosit yüzeyinde artan miktarlarda trombin meydana gelir ve fibrinojeni fibrine dönüştürerek hasar bölgesindeki trombosit tıkaçının sağlamlaşmasına yardım eder.

9- Trombosit aktinomyozinin kontraksiyonu ile trombosit içinde bir mekanizma aktive olur. Bu mekanizma trombosit tıkaçını sağlamlaştırır. Böylece kan akımı durdurulmuş olur.

10- Daha sonra fibrinolitik sistemin aktive olması ile pıhtı çözülür (Kayaalp 1990).

2.2.1. Koagulasyon Faktörlerinin Sınıflandırılması:

A- K vitaminine bağımlı faktörler

1. Faktör II (Protrombin)
2. Faktör VII
3. Faktör IX
4. Faktör X
5. Protein C
6. Protein S

B- Trombine duyarlı faktörler

1. Faktör I (fibrinojen)
2. Faktör V
3. Faktör VIII
4. Faktör XIII

C- Kontakt faktörleri

1. Faktör XII
2. Faktör XI

3. Yüksek Molekül Ağırlıklı Kininojen (HMWK)

4. Prekallikrein

D- Fosfolipidler ve kalsiyum iyonları

E- Koagülasyon inhibitörleri (Çizelge 1.2)

Faktör	İsmi	Etkilediği yol
➤ Prekallikrein	Fletcher faktör	İntrensek
➤ YMAK	Kontakt aktivasyon faktör	İntrensek
➤ I	Fibrinojen	İntrensek+Ekstrensek
➤ II	Protrombin	İntrensek+Ekstrensek
➤ III	Doku Faktörü	Ekstrensek
➤ IV	Kalsiyum	İntrensek+Ekstrensek
➤ V	Labil faktör	İntrensek+Ekstrensek
➤ VI (Va)	Akselerin	
➤ VII	Prokonvertin	Ekstrensek
➤ VIII	Antihemofilik faktör	İntrensek
➤ IX	Kristmis faktör	İntrensek
➤ X	Stuat Prower	İntrensek+Ekstrensek
➤ XI	Pl tromboplastin an(PTA)	İntrensek
➤ XII	Hageman faktör	İntrensek
➤ XIII	Fibrin stabilize fak (FSF)	İntrensek+Ekstrensek

Çizelge 1.2: Koagülasyon Faktörleri

2.2.2. Koagülasyon Fizyolojisi:

Daha önceleri koagülasyon reaksiyonlarının zimojen pıhtılaşma faktörlerinin aktive olmalarının ardından sırası ile diğer faktörleri aktive etmeleri ile gelişen bir kaskat sistemi olduğu kabul edilirken, son zamanlarda enzim olduğu sanılan pıhtılaşma faktörlerinin aslında kofaktörler olduğunun anlaşılması ile bu görüş değiştirildi. Örneğin FVIII'in FIX'un

kofaktörü olduğu, FV'in de FX'un kofaktörü olduğu bulundu. Koagülasyon mekanizmasını kabul edenler intrinsek ve ekstrinsek koagülasyon yollarını tasarladılar. İntrensek sistem tamamen kan dolaşımında bulunan faktörlerden oluşurken, ekstrinsek sistemde dolaşım dışında bulunan ve FVII için reseptör görevi gören doku faktörü “tissue faktör” (TF) bulunmaktadır. FVIII'in dolaşımında von Willebrand faktörü (vWF) kompleks halde dolaştığı bilinmektedir. vWF, faktör VIII'i bağlayarak bu faktörü trombosit yüzeyine taşıyan bir taşıyıcı proteindir ve aynı zamanda trombositlerin damar duvarına adezyonunda da rol oynar (Ganidağlı et al. 2008).

2.3. KOAGULASYON KASKADI

Trombosit tıkaçının oluşumu ile eş zamanlı olarak plazma pıhtılaşma sistemi de aktive olur. Pıhtılaşma sisteminde, birbirlerinin aktivasyonu yada inhibisyonunu kontrol eden çok sayıda protein görev alır. Geleneksel pıhtılaşma basamakları iki yola ayrılır; ekstrinsek ve intrinsek sistem. Tüm faktörler normal koşullarda inaktiftir. Aktifleştikleri zaman faktör XII, faktör XI, faktör IX, faktör X ve protrombin, proteolitik enzim özelliği kazanırken faktör VIII ve faktör V bu proteoliz reaksiyonlarından bazılarını katalize eden kofaktöre dönüşür. Ekstrinsek yol, doku faktörünün salınmasıyla başlar. Hemostazı başlatmada ağırlıklı mekanizmanın ekstrinsek yol olduğu düşünülmektedir. Bu iki yolağın sonunda faktör X aktive olur ve trombin oluşmasını sağlar.

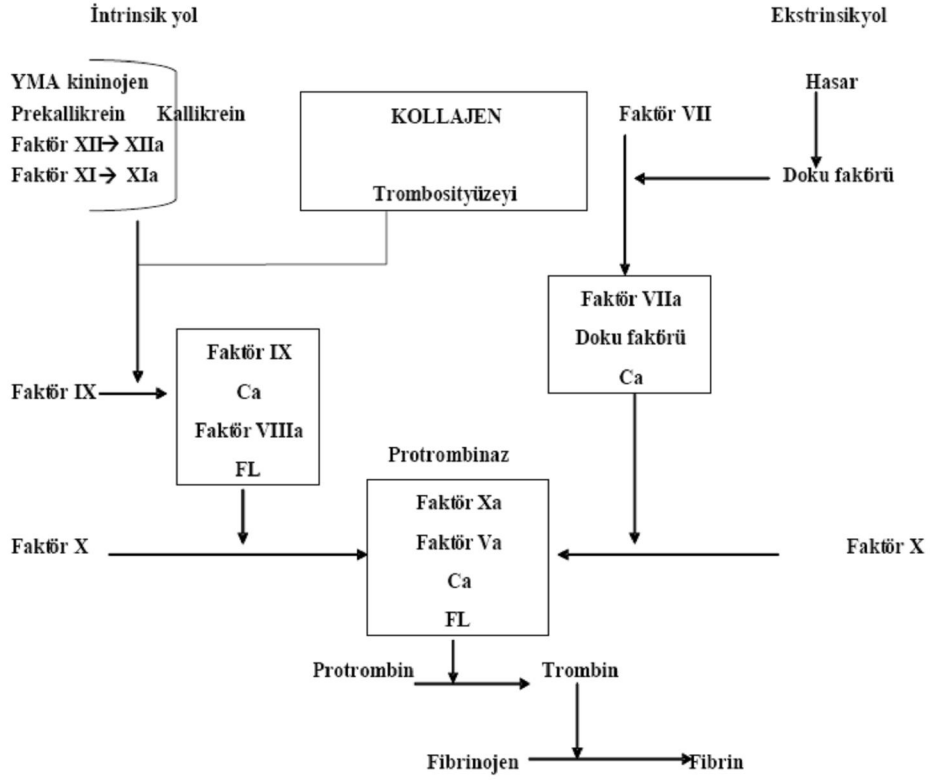
Arteriyel trombozda, trombin merkezi bir rol oynar. Pıhtı oluşumunda ortak son yolda fibrinojeni fibrine dönüştürür, trombosit agregasyonu için güçlü bir uyarandır ve faktör XIII'ü aktive ederek fibrin pıhtısının çapraz bağlanmasını, stabilizasyonunu sağlar. Trombinin trombojenik süreçte oynadığı roller şöyle özetlenebilir; trombosit aktivasyonu, fibrinojenden fibrin oluşumu, Faktör V, VIII, XI ve XIII aktivasyonu ve Faktör XIII fibrinle çapraz bağ oluşturur ve onu stabilize eder (Broze 1992).

Koagülasyon mekanizması fibrin yapıda pıhtı oluşumu ile sonuçlanan bir dizi kompleks basamağı içermektedir. Bu aşamalar: İntrensek yol, yavaş ve en önemli basamaktır;

ekstresek yol, hızlı ve erken aktive olan basamaktır; ortak yol, fibrin yapımı için gerekli son basamaktır (Şekil 2).

2.3.1. İntrensek Yol: İntrensek yola katılan faktörlerin hepsi dolaşımında inaktif olarak mevcuttur. Bu yol, faktör XII'nin endotel yüzeyinde, doku bütünlüğü bozulmuş bölgeye temasıyla aktivasyon başlar. Bu aktivasyonda prekallikrein ve yüksek molekül ağırlıklı (YMA) kininojenler önemli rol oynar, ve Faktör XII aktif serin proteaz formu olan Faktör XIIa'ya dönüşür. (Wachtfogel et al. 1993) Aktif FXI enzimatik etki ile FIX'u aktive eder. Aktif FIX, FVIII ve trombosit fosfolipidleriyle birlikte etki göstererek FX'u aktive ederler. Bu basamakta FVII ve TF kompleksinde FX'u aktive etmede rol alır. Bu reaksiyon agreg olmuş trombositlerin yüzeyinde oluşur. Faktörlerin trombosit fosfolipidlerine bağlanması kalsiyum iyonu köprüleri ile sağlanır. Aktif FX, FV ve trombosit birleşerek protrombin aktivatörünü oluşturur. Bu da protrombinin trombine parçalanmasını başlatır.

2.3.2. Ekstresek Yol: Doku faktörü (TF) tarafından hızla aktive olan bir yoldur. Doku faktörü bir lipoproteindir. Primer olarak endotel hasarlanması ile salınmaktadır. Ayrıca trombositler ve monosit / makrofajlar tarafından da sentezlenmektedir. Ca⁺⁺ iyonunun varlığında TF hızla FVII'yi (FVIIa) aktive etmektedir. TF / FVIIa kompleksi de hızla FX'i- aktive (FXa) etmektedir (<http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/anestezi-not/yogun.htm>). FXa, TF'ün bir parçası olan doku fosfolipitleri ile birlikte kalsiyum iyonu varlığında FV ile birleşerek protrombini trombine çevirecek ara kompleksi (protrombinaz) oluşturur. Böylece protrombin trombine parçalanır (Eigenbrot 2002). Bunu takiben trombin bir enzim görevi yaparak fibrinojen monomerlerini kalsiyum iyonu varlığında fibrin iplikçiklerine çevirir. Fibrin iplikçikleri trombositler, kan hücreleri ve plazmayı da içine alarak pıhtıyı oluşturur.



Şekil 1.2: Pıhtılaşma Mekanizması

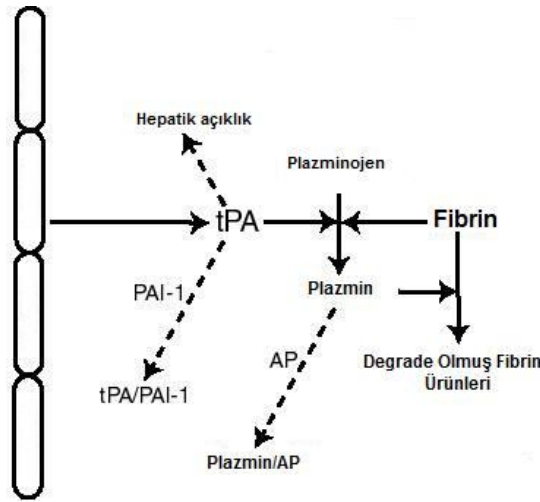
2.3.3. Ortak Yol: Doku faktörü-faktör VIIa kompleksi veya kofaktör olarak VIIIa'nın rol aldığı faktör IXa'nın katkısı ile oluşan Faktör X; ortak yolu başlatarak, inaktif plazma zimojeni olan protrombini bir proteaz olan trombine dönüştürür. Bu reaksiyon için vazgeçilmez kofaktör Faktör Va'dır. Trombinin birçok fonksiyonu vardır. Ortak yolda, en önemli rolü, çözülmüş fibrinojeni çözülmeyen fibrine dönüştürmektir. Trombin aynı zamanda fibrin stabilize edici faktör XIII'ü aktif faktör XIIIa'ya dönüştürerek fibrin pıhtısının stabil olmasını sağlar (Mosesson et al. 1997).

2.4. FİBRİNOLİZİS

Fibrinolitik sistem, vasküler lümeninde açıklığın korunması amacıyla fibrin fazlasını ortadan kaldırır. Fibrin yıkımı anlamına gelen fibrinolizi sağlayan madde plazminojendir. Anormal

veya bozuk işlevsiz plazminojeni olan hastalarda venöz tromboemboli sıklığı artar. Benzer olarak, transgenik farelerde PAI-1'in artışı sonucu venöz tromboembolizm riski artar. Endojen fibrinolizis iki yoldan gerçekleşir:

2.4.1. Plazma fibrinolitik sistemi: Bu sistemde plazminojeni plazmine çeviren aktivatörler, idrardan elde edilen ürokinaz damar duvarı endotelinden salgılanan vasküler plazminojen aktivatörü (PA) ve doku aktivatörleri yer alır. Fibrinolizisi sağlayan madde plazmindir. Plazmin vücutta plazminojen olarak bulunur. Doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve ürokinaz plazminojeni aktif bir proteinaz olan plazmine çevirir. Fibrinolizisi sınırlayan majör plazminojen aktivatör inhibitörü trombositlerden salgılanan plazminojen aktivatör inhibitör 1 (PAI-1)'dir. PAI-1, t-PA ve ürokinaz ile kompleks yapar ve fibrinolizis kontrolsüz bir şekilde oluşmasını engeller. PAI-1'den başka plasentada PAI-2 ve idrarda PAI-3 bulunmaktadır. PAI-1 plazminojen aktivasyonunu inhibe ederken oluşan plazmin ise alfa 2 anti-plazmin tarafından inhibe edilir. Alfa 2 anti-plazmin karaciğerde sentez edilir. Plazmin ile kompleks yapar ve plazminin fibrine bağlanmasını engeller (Bayır ve Ak 2003) (Şekil 3).



Şekil 1.3. Fibrinolizis Mekanizması

2.4.2. Hüresel fibrinoliz: Lökositlerden salgılanan proteolitik enzimlerden kaynaklanır.

2.5. TROMBOMODULİN

Trombomodulin (TM), endotel hücrelerinde lokalize trombin reseptörüdür. (Esmon 1995) TM en önemli vazoprotektif moleküllerden biridir, konstitütif olarak başlıca endotel hücrelerinde ekspres edilir. Molekülün büyük bir kısmı ekstrasellüler olup, trombin bağlayıcı bölge de burada bulunur. TM – trombin kompleksi hücre içine alınarak endotel hücreleri içinde parçalanır. Bu şekilde, TM, arter duvarını koruyucu ve trombotik eğilimi azaltıcı etki oluşturur. TM geninin ekstrasellüler kısmı ayrılarak dolaşıma geçer ve solübl TM olarak adlandırılır (Wu et al. 2003).

Endotel hücreleri yüzeyinde bulunan antikoagulan etkili bir integral membran glikoproteini olup trombin ile 1:1 kompleks oluşturur. TM'in 1981'de iki Amerikalı bilim adamı Esmon ve Owen tarafından keşfi, protein C'nin antikoagulyasyondaki rolüne de dikkat çekmiştir. Protein C antikoagulan yolağının başlangıcındaki kritik rolünün keşfinden sonra, TM'in biyokimyasal yapısı, işlevleri üzerinde yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır. Trombinin, bu yüksek afiniteli reseptörüne bağlanması, trombinin substrat spesifitesinde değişikliğe yol açar. TM, protrombotik etkili trombinin fizyolojik bir antikoagulanı dönüştürür. Trombinin işlevini bu şekilde modüle etme özelliğinden dolayı trombomodulin olarak adlandırılmıştır. Trombin – trombomodulin kompleksinin protein C'yi aktiveleme gücü, tek olarak trombinin etkisinden 1000 kez yüksektir. Aktive protein C, kofaktörü protein S ile birlikte FVa ve FVIIIa'yı parçalayarak protrombotik aktiviteyi azaltır. PC ve trombin üzerinden oluşturduğu antikoagulan etkilerin yanı sıra, son zamanlarda, fibrinoliz, inflamasyon, kanser ve embriyogenezle ilişkili olarak PC ve trombinden bağımsız etkileri de güncel araştırmalara konu olmaktadır (Ermış et al. 2006).

2.5.1. Doku Trombomodulin (hücreler form):

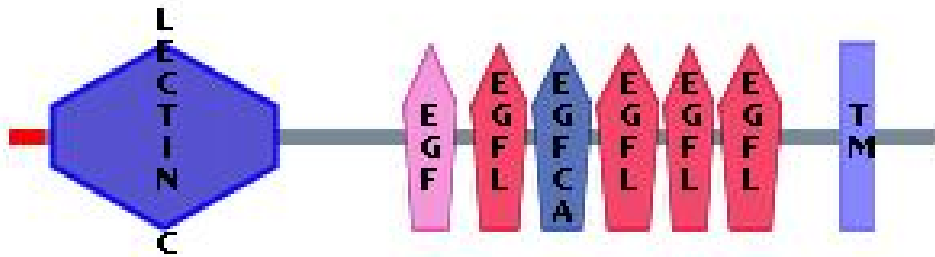
Glikozile tip 1 transmembran molekülü (intrinsek membran glikoproteini). 557 amino asitten oluşan tek bir zincirden meydana gelir. 60.3 kD ağırlığındadır. TM'nin yapısı NMR spektroskopisi ve X-ışını kristallografisi ile incelendiğinde şu kısımlardan oluştuğu gözlenmiştir.

21 a.a.'den oluşan bir sinyal peptidi, 223 a.a.'den oluşan bir amino terminal ligand bağlayıcı bölgesi (hidrofob), C-tipi lektin, reseptör endositozundan sorumlu olan kısımdır, tümör büyümesi ve endotel inflamasyonunun düzenlenmesinde etkindir.

236 a.a.'den oluşan EGF ile homolog kısmı, tekrarlayan 6 bölümden oluşur. EGF 4.-5.-6. bölgeler kalsiyum, trombin, protein C' yi; EGF 3 ise trombinle aktive edilen fibrinolizis inhibitör. (TAFI) bağlayan kısımları içerir. Bölgeler arasında disülfid bağları bulunur. EGF, TM'nin posttranslasyonel modifikasyonunda sinyal fonksiyonu görür. 34 a.a.'den oluşan bir serin ve treoninden zengin bölgesi, posttranslasyonel glikozilasyona uğrar, kondroitin sülfat içerir. Kondroitin sülfat, trombin yüzeyine bağlanır, heparinle etkileşerek trombinin TM'e olan affinitesini 10-20 kat artırır. Böylece trombinin konformasyon ve spesifitesini değiştirerek daha güçlü bir koagülasyon inhibitörü olmasını sağlar.

23 a.a.'den oluşan ve membranı kateden (transmembran) bir kısım: Endotel membranına tutunmayı sağlar.

38 a.a.'den oluşan bir karboksi terminal sitoplazmik kuyruk (serbest sistein içerir) sinyal iletiminde ya da proteinler arası etkileşimde rol aldığı bilinen ve bugüne kadar yapısı aydınlatılmış hiçbir proteine benzemeyen bir yapıya sahiptir (Şekil 4). Fosforilasyon için hedef bölgelerden biridir. Fosforilasyon, artmış endositoz ve yıkım için gereklidir (Ermiş et al. 2006).



Şekil 1.4. Trombomodulin domain yapısı

2.5.2. Çözünebilir TM:

Hücrel formun ekstrasellüler kısımlarına topluca verilen addır. Yapısında transmembranik bölge, oligosakkarid zincir ve sitoplazmik kuyruk bulunmaz (Weiler and Iserman 2003).

2.5.3 Trombomodulin Geni:

İnsan trombomodulini 20. kromozom üzerinde ve tek kopya olarak yer alır. Gen, intron taşımaz. İntronsuz genlerin avantajı azalmış mRNA işleme işine bağlı olarak artmış protein sentezi olabileceği ileri sürülmüştür. Vücudumuzdaki diğer intronsuz genler: beta adrenerjik reseptörler, alfa ve beta interferon, rodopsin, anjiogenin, bazı memeli ısı- şok genleri ve mitokondrial genlerdir. (Ermiş et al. 2006).

TM'in antikoagulan işlevi, trombin ve protein C ile etkileşimi ile ortaya çıkar. Endotel hücresinin membranına bağlı olarak bulunan TM, trombine yüksek afinite ile bağlanır. Oluşan TM/trombin kompleksi, trombinin fibrinojenle etkileşimini inhibe, protein C'yi güçlü bir şekilde aktive ederek antikoagulan etki gösterir. Aktive protein C (APC), FVa ve FVIIIa'yı inaktive ederek daha fazla trombin oluşumunu engeller. Aktive protein C (APC), FVa ve FVIIIa'yı parçalamanın yanı sıra, lökosit aktivasyonunu inhibe ederek sepsiste organ hasarı ve mikrotrombüs oluşumunu azaltır (Esmon 2005).

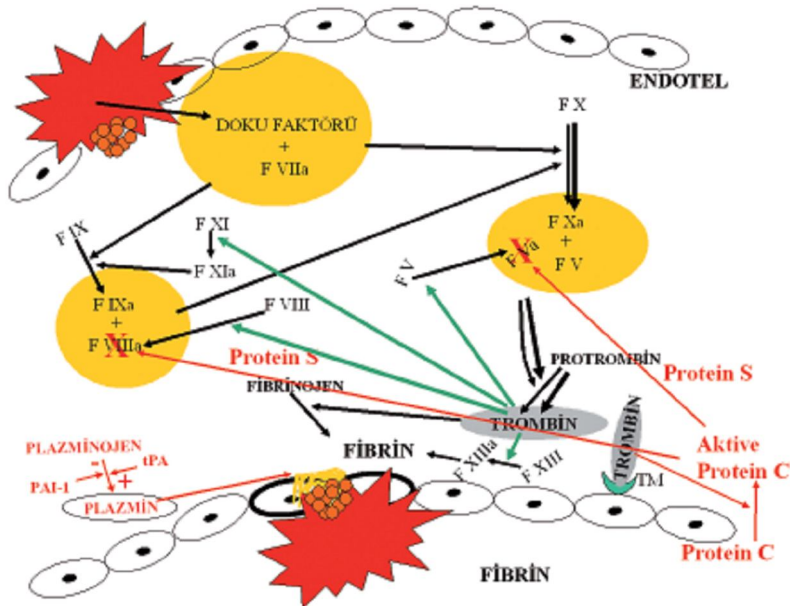
2.5.4. Trombin – Trombomodulin Kompleksi:

Trombin, koagulasyonda koagulan, prokoagulan ve antikoagulan özellikte ki önemli bir proteindir. Trombin serin proteazların kimotripsin ailesinin VIIa, IXa ve Xa ile homolog yapıya sahip olan üyesidir (James et al. 2004). Trombomodulin, trombinin fibrinojen ve trombositlerin bağlama bölgelerini maskeler. Serbest trombin güçlü bir prokoagulan enzimken, TM'e bağlandığı zaman antikoagulan ve antifibrinolitik özellik kazanmaktadır. Vasküler hasara cevapta, koagulasyon kaskadında üretilen serbest trombin pıhtı oluşmasını

katalizler. Bu arada oluşan trombin/trombomodulin kompleksi koagulasyon kaskadını inhibe eder. Trombin koagulasyon kaskadının sonunda olduğu için feedback işleminde kritik role sahiptir aynı zamanda hemostasisin meditörlüğünü de yapmaktadır (Weiler and Iserman 2003).

2.5.5. Protein C Sistemi:

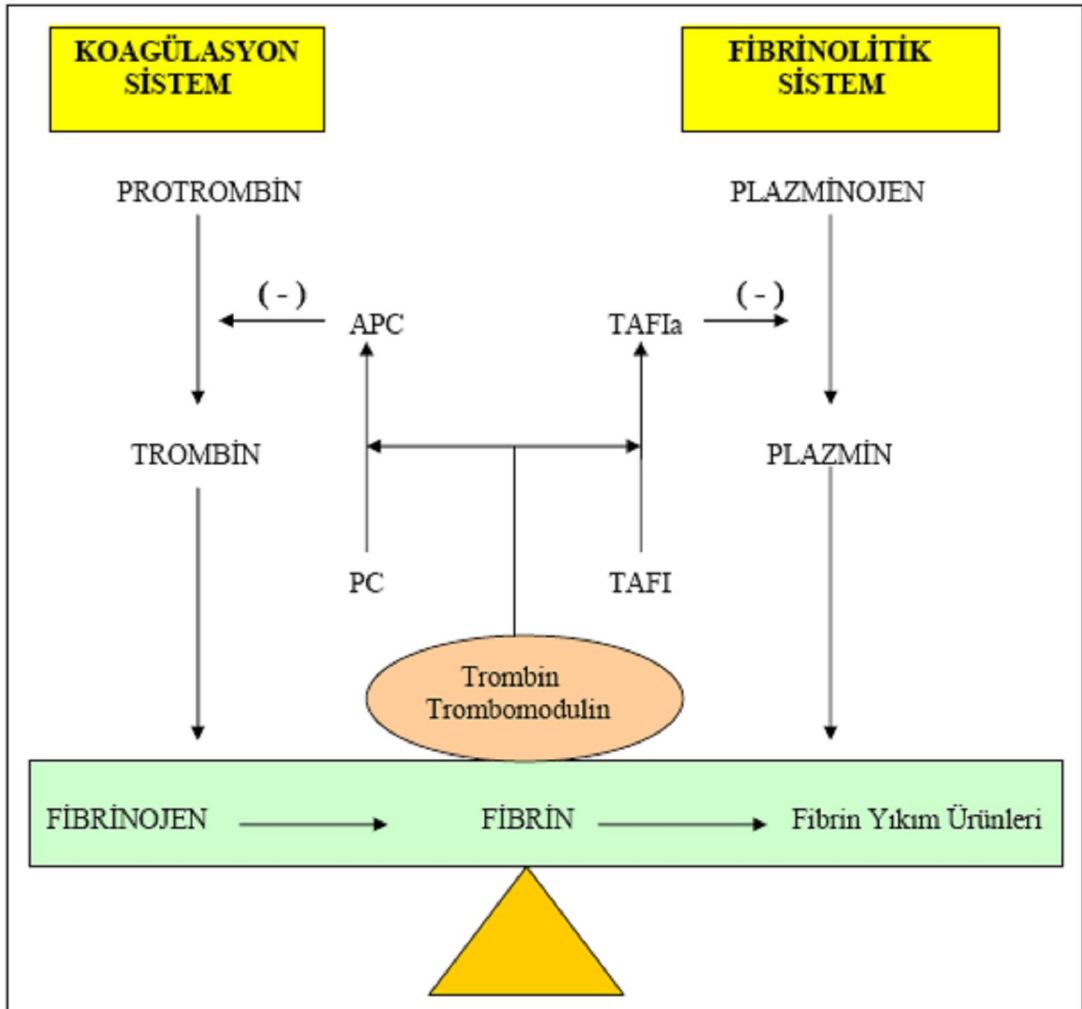
İlk kez 1960'da antikoagülan etkisi tanımlanan, Vitamin K'ya bağımlı bir protein olan protein C (PC), pıhtılaşma sisteminin önemli bir doğal inhibitörüdür. PC, pıhtılaşma önleyici etkisini Protein S (PS) ile birlikte FVa ve FVIIIa'yı inaktive ederek gösterir. Bu etkileri gösterebilmesi için, önce trombin tarafından aktive edilerek aktive PC (aPC)'ye dönüşür. Pıhtılaşma sırasında oluşan trombin, endotel yüzeyinde bulunan trombomodüline (TM) bağlanınca fibrinojeni fibrine dönüştürme özelliğini kaybeder; aksine PC'yi aktive eder (Şekil 5). PC'nin pıhtılaşmayı önleyici bu etkileri yanında, inflamasyon önleyici ve hücre koruyucu etkileri gibi farklı biyolojik etkilerinin olması nedeniyle, günümüzde üzerinde çok çalışılan bir protein haline gelmiştir (Saynalp 2007).



Şekil 1.5: Endotelde bulunan trombinin TM ile bağlanarak PC'yi aktive etmesi

2.5.6. Trombomodulinin fibrinolizisdeki rolü:

TM'in antifibrinolitik etkisi trombin üzerinden ve trombinden bağımsız olmak üzere iki farklı mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. TM, trombinle aktive edilen fibrinoliz inhibitörü (TAFI)'nün aktivitesini uyararak, fibrin pıhtılardaki plazminojenin aktivasyonunu ve sonuçta fibrinolizi inhibe eder. Karboksipeptidaz yapısındaki TAFI, TM ile aktive olduktan sonra, fibrin molekülünün karboksi terminalindeki arjinin ve lizini uzaklaştırarak, fibrinolitik enzimlerin fibrin molekülü tarafından tutulmasını önler. Bu şekilde fibrin molekülü lizise dirençli duruma gelir (Şekil 6) (Ermiş et al. 2006).

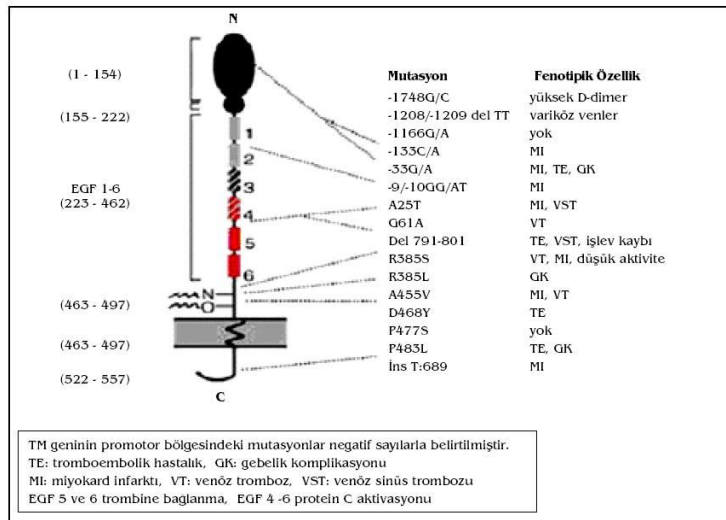


Şekil 1.6: Trombin – Trombomodulin kompleksinin koagulasyon ve fibrinolizisdeki rolü

2.5.7. Trombomodulin Genindeki Değişimler:

TM geninin promotor/regulator bölgesindeki gen polimorfizmleri (-133C/A ve -3 G/A) transkripsiyonda azalmaya ve sonuçta TM konsantrasyonlarında azalmaya yol açtığından MI ve karotis arteriosklerozu ile ilişkilidir. -3 G/A polimorfizmi Asyalılarda %12-15 oranında görülmektedir. Genin lektin benzeri bölgesindeki A25T polimorfizminde MI riskinin 2 kat arttığı ve bu polimorfizmin diğer ateroskleroz risk faktörleri ile pozitif etkileşim gösterdiği bildirilmiştir. Ancak bu nokta mutasyonunda TM'in PC'yi aktive etme özelliği etkilenmediğinden, olumsuz etkilerin, TM'in PC'den bağımsız işlevleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Tersine, EGF 4 kısmındaki Arg385Ser polimorfizmi, TM ekspresyonunun ve aktivitesinin belirgin olarak azalmasına yol açar. Bu polimorfizmin toplumdaki sıklığı bilinmemektedir. MI ve venöz trombozla ilişkisi açısından yoğun olarak araştırılan bir diğer polimorfizm ise EGF 6 kısmındaki Ala455Val polimorfizmidir.

İnsanlarda TM işlevlerinin tamamen kaybına yol açan ilk mutasyon, EGF 2'de bir stop kodonu oluşumuna yol açan 10 baz çiftlik bir delesyon (del791-801) olup bu mutasyonu heterozigot olarak taşıyan gen bir hastada pulmoner emboli, serebral venöz tromboz ve strok saptanmıştır. Bu mutasyonda, TM'in plazma düzeyi normalin yarısı kadardır (Ermiş et al. 2006).



Şekil 1.7. Trombomodulin geninde yer alan değişimler

2.6. MOLEKÜLER TEKNİKLER

2.6.1. Çözeltiler ve Solüsyonlar

DNA izolasyonunda alyuvarları parçalamak için Red Blood Cell (RBC) lizis çözeltisi, DNA ve protein tabakasını birbirinden ayırarak DNA'yı saf halde elde etmek için fenol / kloroform karışımı, polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerini görmek için kullandığımız agaroz jeli hazırlamak için TBE (Tris Hidrojen klorür Borik asit EDTA - Etilendiamin tetraasetikasit-), mutasyon analizi yapmak için kullandığımız SSCP jelini hazırlamak için akrilamid bisakrilamid çözeltisi, amonyum per sülfat çözeltisi (APS) ve TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin) solüsyonları kullanılmıştır.

2.6.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA, kan örneklerinden fenol-kloroform yöntemi ile izole edilmiştir. Eritrositleri parçalamak suretiyle ortamda lökositler elde edilmiştir. Bu lökositlerin önce membranları parçalanarak çekirdek materyali serbest hale getirilmiş daha sonra protein yapı enzimatik reaksiyonla eritilmiş ve fenol çözeltisiyle de bu protein yapı DNA'dan uzaklaştırılmıştır. İzole edilen DNA'yı çöktürmek için etanol kullanılmıştır.

2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İlk kez 1985'de bilim dünyasına sunulduğundan itibaren polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); hem araştırmada hem de klinik laboratuarlarda tanıya yeni bir çığır açmıştır. PCR, bir çeşit in-vitro klonlamadır. Bu buluşundan dolayı K. Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülünü almaya hak kazanmıştır. Bu yöntem polimeraz enzimi varlığında bir dizi DNA polimeraz reaksiyonu içerdiğinden, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olarak adlandırılmaktadır (Akar 1999). Polimeraz zincir reaksiyonu, dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in-vitro olarak

çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca, hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir. PCR yönteminin uygulamaları arasında klonlama, genetik bozuklukların tanısı, mutasyonların saptanması, in-vitro mutasyon yaratılması, DNA haritalaması, infeksiyon hastalıklarında bakteri ve virüs tanımı, insan embriyolarındaki tek bir hücrede ya da gametlerdeki genetik bozuklukların incelenmesi gibi uygulamalar yer almaktadır. Basit, hızlı ve çok yönlü bir teknik olması PCR teknolojisinin moleküler biyolojide ve modern genetikte çok kullanılan bir teknik olmasına neden olmuştur (Öner 2002).

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bu yöntemin uygulanabilmesi için, yok denecek kadar az miktardaki DNA bile yeterlidir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotit dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotit primerin sentezi için kullanılır. Bu primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı dizilerle hibridize olur. Isıya dayanıklı bir DNA polimeraz, çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. PCR reaksiyonunda üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürünün miktarı, teorik olarak, bu üç adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır (Öner 2002).

1. Denatürasyon: Bu basamakta çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır (90 – 95°C de yaklaşık 5 dakika süreyle).

2. Primerlerin bağlanması: Sıcaklık 50 ila 70°C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotitlerdir ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar.

3. Zincir uzaması (polimerizasyon): DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli (sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteriden elde edilen enzim, (*Taq polimeraz*) reaksiyon karışımına ilave edilir ve DNA sentezi 70 ila 75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi, nükleotitleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur. (Öner 2002)

Bir PCR döngüsü bu üç adımdan (çift iplikli DNA'nın ayrılıp tek iplikli hale getirilmesi, sentetik oligonükleotit primerlerin tek iplikli DNA'ya bağlanması, polimeraz enzimi ile zincirin uzaması) oluşur ve her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir (sırasıyla 94°C - 98°C, 37°C - 65°C, 72°C). Elde edilecek ürünün miktarı teorik olarak, bu üç temel basamağın tekrar sayısına bağlıdır. Oluşturulan DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Yani n sayıda döngü sonucu 2n sayıda ürün elde edilir. İşlem ısı dönüştürücü (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 parçaları elde edilir (Akar 1999).

Bir PCR için gerekli temel bileşenler ; Çoğaltılacak DNA bölgesini içeren DNA kalıbı, çoğaltılacak bölgenin başlangıcını ve sonunu belirleyen iki primer, çoğaltılacak bölgeyi kopyalayacak olan ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, yeni zincirin yapımında kullanılacak olan deoksिनükleotit trifosfatlar (dNTP), DNA polimeraz enzimi için gerekli olan kimyasal ortamı (uygun pH ve iyon koşullarını) sağlayan tampon karışımıdır.

PCR reaksiyonunda çoğaltılacak hedef gen bölgesi seçildikten sonra ilk adım; zincirlerin birbirinden ayrılmasıdır. İnsan genomik DNA'sı için 94-98°C uygundur. Reaksiyon karışımının 94°C'ye dek ısıtılması ile kalıp DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. Bir sonraki adım, çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen, 5' ucuna komplementer, 18-20 baz uzunluğundaki bir çift sentetik oligonükleotitin, 37-65°C arasında hedef DNA'ya bağlanması aşamasıdır. Ortam sıcaklığının primerlerin bağlanması için gerekli olan ısıya düşürülmesi ile iki primer tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan DNA dizilerini tanıyarak bağlanır. Son adım ise, 72°C'de ortama eklenen dNTP'lerle çift

zincirli DNA'ların sentezidir. DNA polimeraz enzimi uygun tampon ve dört çeşit dNTP varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Bu şekilde kalıp DNA zincirine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bunların üzerine hemen ısıya dayanıklı DNA polimerazlar tutunur ve primerlerin 3' ucuna deoksिनुकлеотитleri ekleyerek her iki zincir üzerinde DNA sentezi yaparlar. Bir PCR döngüsünü oluşturan bu üç adımın 20-30 kez tekrarlanması ile hedef DNA'yı 10^6 - 10^{12} kat çoğaltmak mümkündür (Akar 1999).

PCR reaksiyonu için kullanılan polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimidir. Enzim, yüksek ısılarda iyi çalışması ve hızlı DNA sentezi yapması nedeni ile tercih edilmektedir (Akar, 1999). Taq polimeraz enziminin hata yapma oranı oldukça yüksektir. Çünkü bu enzimin 3'-5' hata tamiri aktivitesi yoktur. Eğer yüksek oranda doğruluk gerekiyorsa hata tamir aktivitesi olan enzimler tercih edilmelidir.

Sentetik oligonükleotit primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca $T_m = 4(GC) + 2(AT)$ formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmekte ve hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini arttırmaktadır. Spesifikliği arttıran bir diğer unsur oligonükleotidlerin uzunluğudur. Optimal uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid olmalıdır. Kullanılacak oligonükleotidlerin seçimi PCR işlemi için çok önemlidir.

Kullanılacak sentetik oligonükleotit primerlerin seçimi sırasında primer dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan primer çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmamalıdır; aksi takdirde primerin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak PCR'ın olumsuz olarak etkilenmesine neden olur. Primerlerin nükleotit içerikleri de rastgele olmalıdır, tekrarlayan diziler içermemelidir.

PCR reaksiyonunda diğer bir önemli faktör deoksिनुकлеотид trifosfatlar (dNTP)dir ve bunlar son konsantrasyonları 2 mM olacak şekilde kullanılmalıdır. Reaksiyon sırasında ortamda dTTP, dCTP, dATP, dGTP'nin bulunması gereklidir. Kullanılan her bir deoksिनुकлеотид

trifosfatın (dNTP) konsantrasyonunun eşit olması doğru ürün elde edilmesi açısından önemlidir. dNTP'nin az miktarda kullanımı oluşan PCR ürününün miktarının azalmasına; fazla miktarda kullanımı ise yanlış oligonükleotid eşleşmesi sonucu hedef DNA dışındaki bölgelerin çoğalmasına neden olur.

PCR'dan iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlıdır. DNA polimerazın iyi çalışabilmesi en etkin olduğu pH'nın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerden birisidir. Bu amaçla genellikle Tris.HCl pH: 8,4 tepkime karışımında son değişimi 10mM olacak şekilde kullanılır. PCR karışımında tek değerli katyonların özellikle 50-60mM düzeyinde K^+ bulunmasının çoğaltılmayı önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Yine karışımında 100µg/ml jelatin bulunmasının benzer etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, serbest magnezyum ($MgCl_2$) konsantrasyonunun azalması ile Taq Polimeraz doğruluğu arttırılabilir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü Mg^{+2} iyonunu bağladıklarından; her PCR protokolünde Mg^{+2} konsantrasyonunu ampirik olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg^{+2} , enzimin spesifikliğini azaltır, azı ise enzimin inaktif olmasına yol açar (Akar 1999).

PCR'ın kullanım alanları; Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı, prenatal tanıda, klinik örneklerde patojen organizmaların saptanması, adli tıpta, onkogenesinin araştırılmasında, problemlerin oluşturulması, klonlanması ve gen ekspresyon araştırmalarında, DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında, bilinmeyen dizilerin tayininde, RFLP uygulamalarında kullanılmaktadır (Akar 1999).

2.6.4. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformational Polymorphism)

Mutasyon belirlenmesinde kullanılan tekniklerden biri olan SSCP denatüre olmayan jellerde tek iplikli DNA'da oluşan değişimin, jelde yürüme farklılığının belirlenmesine dayanır. Bu yöntem ile nükleotit dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşmuş tek baz değişikliklerini belirlemek mümkündür (Akar 1999).

Aynı boyuttaki tek zincirli DNA parçacıkları (ssDNA) içerdikleri nükleotit değişikliklerine bağlı olarak jelde farklı pozisyonlarda yürürler. DNA'daki herhangi bir değişiklik DNA parçacığının konformasyonunun ve dolayısı ile elektroforetik hareket yeteneğinin değişmesine neden olur (Öner 2002).

SSCP ile mutasyon taraması yönteminde mutasyon taranacak DNA bölgesi önce PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılan DNA molekülleri yüksek ısı ile çift iplikli halden tek iplikli hale getirilip (99°C'de denatüre edilir), elektroforez jeline yüklenir. Poliakrilamid jel elektroforezinde göç hızlarına bakılarak sonuçlar değerlendirilir. Tek iplikli DNA'nın farklı bantlar göstermesi; mutasyonu işaret etmektedir. SSCP tekniği aynı anda birçok örnekte düşük maliyette mutasyon taramasını sağladığından moleküler genetik çalışmalarına hız kazandırmaktadır. Yöntemden en iyi şekilde sonuç alabilmek için, kullanılan PCR ürününün 200 bç civarında olması gerekmektedir (Akar 1999).

Teorik olarak SSCP ile 200bç'lik bir dizide mutasyon belirleme oranı %90; 400bç'lik bir dizide mutasyon belirleme oranı %80'dir. İncelenen dizinin uzunluğu arttıkça SSCP'nin mutasyon belirleme yeteneği azalır. Ancak SSCP tekniğinin mutasyon belirleme yeteneği mutasyonun tek zincirli DNA'nın oluşturduğu konformasyonu ve elektroforetik hareketini nasıl etkilediğine bağlı olduğundan incelenen dizinin ve mutasyonun özelliklerine bağlı olarak duyarlılıkta çok büyük değişiklikler gözlemlenmiştir (Öner 2002).

Poliakrilamid jele yüklenen PCR örnekleri, elektroforez sonrasında gümüş boyama ile görünür hale getirilir. Bu yöntemle yapılan mutasyon analizi radyoaktif olmaması nedeni ile tercih edilen bir teknik olarak göze çarpmaktadır. SSCP hızlı ve basit bir yöntemdir ancak duyarlılığı sınırlıdır (Akar 1999).

2.6.5. DNA Dizi Analizi

Rekombinant DNA teknolojisinin geliştirilmesi ile DNA dizi analizi yöntemleri de geliştirilmeye başlanmıştır. DNA dizi analizi ya da “sequencing” DNA’nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir ve bunun için iki temel teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden Maxam ve Gilbert’in kimyasal yöntemi, DNA’nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir (Öner 2002).

a) Maxam-Gilbert yöntemi: DNA parçası bir ucundan P32 ile işaretlenir. Bu işaretlenen DNA parçası 4 örnek olarak bölünür. Her örneğe DNA’daki bazlardan birisini tahrip edecek şekilde bir kimyasal madde eklenir. Daha sonra piperidine kullanılarak hasarlanmış nükleotitlerin bulunduğu yerlerden DNA yapısı fosfodiester bağlarından kırılır. Böylece P32 ile işaretlenmiş kısıklı uzunlu parçalar elde edilir. Daha sonra elektroforez ve otoradyografi ile sonuç alınır (Akar 1999).

b) Sanger DNA dizi analizi yöntemi: Dideoksi ya da zincir sonlanma reaksiyonu olarak bilinen Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleşmektedir. Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır (Akar 1999).

Bu yöntem için dizisi belirlenecek olan DNA’ya, dört farklı dNTP’ye, dört farklı ddNTP’lere, reaksiyonu kataliz edecek DNA polimeraz enzimine ve serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır. İlk olarak analiz için kullanılacak kalıp DNA asimetrik amplifikasyon yöntemiyle hazırlanır. Böylece daha fazla kalıp DNA elde edilir. PCR’ da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir (Akar, 1999). Yöntemde kullanılan ddNTP’lerin 3’ ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmamaktadır. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA’ ya katılır ancak 3’ -OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı kalıp DNA zinciri, uygun primer, radyoaktif nükleotid trifosfatların dördü ve az miktarda ddNTP’den sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı

bir ddNTP bulunur. Elektroforez sonrası DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir. Bu bantlar yukarıdan aşağıya doğru okunarak dizi saptanır (Akar 1999).

Genomların dizi analizi için otomatik DNA dizi analizi aletleri, radyoaktif izotoplar yerine de floresan boyalar kullanılır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılarak dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI:

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmaya pediatrik yaş grubundan inme teşhisi konmuş 190 birey dahil edilmiş ve tüm bireylerin ailelerine çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır. Hasta örnekleri temel olarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Nöroloji bilim dalından olmak üzere, ülkenin farklı tıp fakültelerinden analiz için gönderilenleri kapsamaktadır. Projenin Etik Kurul Onayı, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 1997 yılından beri desteklenen farklı projeler kapsamındadır.

3.2. YÖNTEMLER:

3.2.1. DNA İzolasyonu:

Araştırmaya katılan bireylerden alınan 9ml kan, 1ml 0,5M Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) (Scharlau, İspanya) bulunan tüplere aktarılmıştır. Bu kan örneği 50mL'lik falkon tüpe konur ve içerisinde 25ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya) eklenir, 20 dk buzda bekletilir. +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür. Tüpün dibindeki çökelek üzerine tekrar RBC lizis solüsyonu ilave edilir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000µL RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800µL'si ependorf tüpüne alınarak -20°C sıcaklıkta stok olarak saklanır. Geriye kalan 200µL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20µg/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 10mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1mM pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Memmert, Almanya) bekletilir. İkinci gün işlemi olarak proteinlerin DNA'dan uzaklaştırılması amacıyla tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzooamilalkol (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 3M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilir.

Üçüncü gün tüpler +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500µL %70'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir ve +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda alkol dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C veya -20°C'de saklanabilmektedir.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

Çalışmamızda *trombomodulin* genine ait tek ekzon, inme geçirmiş olan 190 pediatrik yaş grubu hastada taranmıştır. Ekzon 4109 baz çifti içermekte olup çalışmamız süresince bu bölgenin ilk 1524 baz çiftlik kısmı bölgelere ayrılarak taranabilmektedir. Ayrıca 387 baz çiftlik promotor bölge de taranarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Promotor bölge: 387 bç.

F: 5' -ACCAAGAGATGAAAGAGGG- 3'

R: 5' -TGGGACGGACAGGAGAGGCT- 3'

AATCCAGGCTTTCCTTGGAAGTGGCTGTAACATGTATGAAAAGAAAGAAAGGAG
GACCAAGAGATGAAAGAGGGCTGCACGCGTGGGGGCCCGAGTGGTGGGCGGG
GACAGTCGTCTTGTACAGGGGTGCTGGCCTTCCCTGGCGCCTGCCCTGTTCGGC
CCCGCCCGAGAACCTCCCTGCGCCAGGGCAGGGTTACTCATCCCGGCGAGGTGA
TCCCATGCGCGAGGGCGGGCGCAAGGGCGGCCAGAGAACCCAGCAATCCGAGTA
TGCGGCATCAGCCCTTCCCACCAGGCACTTCCTTCTTTCCCGAACGTCCAGGA
GGGAGGGCCGGGCACTTATAAACTCGAGCCCTGGCCGATCCGCATGTCAGAGGC
TGCCTCGCAGGGGCTGCGCGCAGCGGCAAGAAGTGTCTGGGCTTGGGACGGACA
GGAGAGGCTGTCGCCATCGGAGTCCTGTGCCCTCTGCTCCGGCACG

Dizi 1.1. SSCP tekniği için amplifiye edilen TM promotör bölgesi

Birinci bölge: 152 bç.

F: 5' -CAGCGGCAAGAAGTGTCTG- 3'

R: 5' -GTAACATGCTTGGGGTCCTG- 3'

CCGATCCGCATGTCAGAGGCTGCCTCGCAGGGGCTGCGCGCAGCGGCAAGAAG
TGTCTGGGCTGGGACGGACAGGAGAGGCTGTCGCCATCGGCGTCTGTGCCCT
CTGCTCCGGCACGGCCCTGTGCGAGTGCCCGCGCTTTCCCGGGCGCCTGCACGCG
GCGCGCCTGGGTAACATGCTTGGGGTCCTGGTCCTTGGCGCGCTGGCCCTGGCC
GGCCTGGGGTTCCCCGCACCCGCA

Dizi 1.2. SSCP tekniği için amplifiye edilen TM birinci bölge

İkinci bölge: 161 bç.

F: 5' -GTAACATGCTTGGGGTCCTG- 3'

R: 5' -TCAATGCCAGTCAGATCTGC- 3'

GCCCTGTCGAGTGCCCGCGCTTTCCCGGGCGCCTGCACGCGGGCGCGCCTGGGTA
ACATGCTTGGGGTCCTGGTCCTTGGCGCGCTGGCCCTGGCCGGCCTGGGGTTCC
CCGCACCCGCAGAGCCGCAGCCGGGTGGCAGCCAGTGCCTCGAGCACGACTGCT
TCGCGCTTACCCGGGCCCCGCGACCTTCTTCAATGCCAGTCAGATCTGCGACG
GACTGCGGGGCCACCTAATGACA

Dizi 1.3. SSCP tekniği için amplifiye edilen TM ikinci bölge

Üçüncü bölge: 224 bç.

F: 5' -GACCTTCCTCAATGCCAGT- 3'

R: 5' -TACGGGAGACAACAACACCA- 3'

CCCGCGACCTTCCTCAATGCCAGTCAGATCTGCGACGGACTGCGGGGCCACCTA
ATGACAGTGCCTCCTCGGTGGCTGCCGATGTCATTTCTTGCTACTGAACGGCG
ACGGCGGCGTTGGCCGCCGGCGCCTCTGGATCGGCCTGCAGCTGCCACCCGGCTG
CGGCGACCCCAAGCGCCTCGGGCCCCTGCGCGGCTTCCAGTGGGTTACGGGAGA
CAACAACACCAGCTATAGCAGG

Dizi 1.4. SSCP tekniği için amplifiye edilen TM üçüncü bölge

Dördüncü bölge: 348 bç.

F: 5' -TACGGGAGACAACAACACCA- 3'

R: 5' -CCCCTCGGCTTACAGCTAA- 3'

CTCGGGCCCCTGCGCGGCTTCCAGTGGGTTACGGGAGACAACAACACCAGCTAT
AGCAGGTGGGCACGGCTCGACCTCAATGGGGCTCCCCTCTGCGGGCCCGTTGTGCG
TCGCTGTCTCCGCTGCTGAGGCCACTGTGCCAGCGAGCCGATCTGGGAGGAGCA
GCAGTGCGAAGTGAAGGCCGATGGCTTCTCTGCGAGTTCCACTTCCCAGCCACC
TGCAGGCCACTGGCTGTGGAGCCCGCGCGGCTGCCGCCGTCTCGATCACCT
ACGGCACCCCGTTCGCGGCCCGCGGAGCGGACTTCCAGGCGCTGCCGGTGGGCA
GCTCCGCCGCGGTGGCTCCCCTCGGCTTACAGCTAATGTGCACCGCGCCGCCCG
GAGCGGTCCAGGGGCACTGGGCCAGGGAGGCGCCGGGC

Dizi 1.5. SSCP tekniği için amplifiye edilen TM dördüncü bölge

Beşinci bölge: 238 bç.

F: 5' -CCCTCGGCTTACAGCTAAT- 3'

R: 5' -GACCTCTGCGAGCACTTCTG- 3'

GCGGACTTCCAGGCGCTGCCGGTGGGCAGCTCCGCCGCGGTGGCTCCCTCGGC
TTACAGCTAATGTGCACCGCGCCGCCGGAGCGGTCCAGGGGCACTGGGCCAGG
GAGGCGCCGGGCGCTTGGGACTGCAGCGTGGAGAACGGCGGCTGCGAGCACGCG
TGCAATGCGATCCCTGGGGCTCCCCGCTGCCAGTGCCAGCCGGCGCCGCCCTGC
AGGCAGACGGGCGCTCCTGCACCGCATCCGCGACGCAGTCCTGCAACGACCTCT
GCGGACTTCTGCGTTCCTCAACCCCGAC

Dizi 1.6. SSCP tekniği için amplifiye edilen TM beşinci bölge

Altıncı bölge: 208 bç.

F: 5' -GACCTCTGCGAGCACTTCTG- 3'

R: 5' -CCCTAACTACGACCTGGTGG- 3'

GCATCCGCGACGCAGTCCTGCAACGACCTCTGCGGACTTCTGCGTTCCTCAAC
CCCGACAGCCGGGCTCCTACTCGTGCATGTGCGAGACCGGCTACCGGCTGGCGG
CCGACCAACACCGGTGCGAGGACGTGGATGACTGCATACTGGAGCCCAGTCCGT
GTCCGACGCGCTGTGTCAACACACAGGGTGGCTTCGAGTGCCACTGCTACCTA
ACTACGACCTGGTGGACGGCGAG

Dizi 1.7. SSCP tekniği için amplifiye edilen TM altıncı bölge

Yedinci bölge: 246 bç

F: 5' -GAGTGCCACTGCACCCTAA- 3'

R: 5' -TAGCTGTGAGTGCCCTGAAG- 3'

AACACACAGGGTGGCTTCGAGTGCCACTGCTACCCTAACTACGACCTGGTGG
CGGCGAGTGTGTGGAGCCCGTGGACCCGTGCTTCAGAGCCAACTGCGAGTACCA
GTGCCAGCCCCTGAACCAACTAGCTACCTCTGCGTCTGCGCCGAGGGCTTCGCG
CCCATTCCCCACGAGCCGCACAGGTGCCAGATGTTTTGCAACCAGACTGCCTGTC
CAGCCGACTGCGACCCCAACACCAGGCTAGCTGTGAGTGCCCTGAAGGCTAC
ATCCTGGACGACGGTTTCATCTGCACGGAC

Dizi 1.8. SSCP tekniği için amplifiye edilen TM yedinci bölge

Trombomodulin geninin taranması için yapılan polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) son konsantrasyonu 10pmol/μl olacak şekilde seyreltilen primer çifti kullanıldı. PCR bileşenleri; 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) belirli oranlarda kullanılarak PCR şartları sağlanmış son hacim 50μl'e ddH₂O ile tamamlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu takip eden 34 siklusta; 94°C'de 1 dakika, 58°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika, 72°C'de 7 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Thermal Cycle, Biometra, Almanya).

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Bio Basic Inc, ABD); kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Biz bu çalışmamızda *Trombomodulin* geni promotor bölgesi için PCR ürünlerini %2'lik agaroz jelde değerlendirdik. %2'lik agaroz jel için 3g TBE 1X (Tris-HCl, Borik asit, EDTA) solüsyonu ile 150ml' ye tamamlandı. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanır. TBE 5X solüsyonunun hazırlanışı; 54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20ml 0.5M pH:8 EDTA (AppliChem, Almanya) ve deiyonize su (ddH₂O) ile 1000mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromid'in (Sigma, ABD) %5'lik stok solüsyonundan 8μl ilave edildikten sonra iyice karıştırılır ve jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür.

Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlanır. Agarozun donması için yaklaşık 45 dk beklenir. Agaroz donduktan sonra jel tabağıyla birlikte jel elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilir. Elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 10μl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 5μl Brom-Fenol Mavisi (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılır ve

jellere yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (Φ X174 DNA-HaeIII BioLabs, ABD; Φ X174 DNA-HinfI BioLabs, ABD) PCR ürünleriyle birlikte jele 3 μ l kadar yüklenir. 90-100 V akımda 30-40 dk kadar yürütülür (Biometra, ABD). Ultraviyole ışıkta (Spectroline, ABD) incelenir. Image Analyser'da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflarır.

3.2.4. SSCP Jeli İçin Poliakrilamid Jel Hazırlanışı:

% 7'lik poliakrilamid jelin hazırlanması: Bu jelin hazırlanmasında % 40'luk 49:1 oranındaki akrilamid / bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bunun için 196 g akrilamid (Merck, Almanya) ve 4 gr N,N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) 200 ml distile su ile 37°C'de ısıtılarak çözündürülür ve hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır (Sambrook 1989).

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu, 54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5 g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20 ml 0,5 M pH8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 ml hacme tamamlanarak yapılmıştır. Jelin polimerleşmesi için kullanılan % 10'luk Amonyum Persulfat; 0.3 g Amonyum Persulfat (AppliChem, Almanya) distile su ile 3 ml'lik hacme tamamlanarak hazırlanmıştır. Akrilamid monomerlerinin polimerleşme reaksiyonunu katalizleyen TEMED (Tetra Etil Metilen deamin) (AppliChem, Almanya) ise hazır olarak bulunur.

Elektroforez Aparatının Hazırlanması: Camlar bol su ile iyice yıkandıktan sonra deiyonize suyla durulanır. % 70'lik alkolle temizlenir ve kurulanır. 1.5 mm'lik spacerlar yardımıyla arada 1.5 mm boşluk bırakılması sağlanır ve klemplerle sabitlenir. Jel döküldükten sonra yine 1.5 mm'lik tarak oturtulur. Jelin polimerleşmesinden ve tarakların çıkarılmasından sonra camlar vertikal jel elektrofezine yerleştirilerek üzeri TBE 1X solüsyonuyla doldurulur. PCR ürünlerine spesifikliği arttırmak amacıyla belli bir oranda denatüre edici yükleme boyası eklenmiştir. Kullanılan yükleme boyası toplam hacminde % 95 formamid (Merck Almanya), 20mM EDTA, % 0,05 Xyelene Cyanol (Sigma Aldrich, ABD), % 0,05 Brom-fenol mavisi (Sigma Aldrich, ABD) içermektedir. 40 μ l PCR ürünlerine 8 μ l yükleme boyası eklenerek 99 °C'de 8 dk denatüre edilir. 48 örneklerden 10 μ l kuyucuklara yüklenerek 130 V'da baz çifti uzunluklarına göre 15-18 saat sureyle +4 °C'de akıma tabi tutulur. Bantlar, gümüş boyama tekniğiyle boyanarak görünür hale getirilir.

3.2.5. SSCP Jeli İçin Gümüş Boyama:

Gümüş boyama için üç farklı solüsyon kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi % 1'lik gümüş nitrat çözeltisidir. 5 g gümüş nitrat (AgNO_3) (AppliChem, Almanya) tartılıp distile su ile 500 ml'ye tamamlanır. İkinci çözelti % 15'lik sodyum hidroksit (NaOH) (Scharlau, İspanya) çözeltisidir. 150 g katı sodyum hidroksitin distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanır. Son solüsyon ise % 7,5'lik Sodyum bikarbonat solüsyonudur ve bu solüsyon % 7,5'lik sodyum bikarbonat (Na_2CO_3) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.

Elektroforez sonrası jel, stok solüsyonundan distile su ile 9:1 oranında seyreltilerek hazırlanan % 0,1'lik gümüş nitrat solüsyonu ile 5 dk muamele edilir. Daha sonra % 1,5'lik sodyum hidroksit solüsyonuna formaldehit eklenip gümüş solüsyonunu aşamasını takiben jelle muamele edilir. Jel % 0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonu içinde birkaç dakika bırakılarak boyama işlemi sonlandırılır. Böylelikle jeller görünür hale getirilerek bant farklılığı olan örnekler belirlenir.

3.2.6. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi (Pürifikasyon):

Trombomodulin geni bölgelerinin SSCP yönteminde bant profillerinin oluşturulmasını takiben bu bant profillerinin hangi polimorfizme ait olduğunu saptamak için DNA dizi analizine tabi tutulmuşlardır. Belirlenen örnekler DNA dizi analizi için hazırlanan primerler ile amplifiye edildikten sonra primer, dNTP fazlalıklarının uzaklaştırılması amacıyla pürifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Maksimum 50 μL PCR ürünü alınarak pürifikasyon işlemi yapılmıştır. İşlem pürifikasyon kitinin 96 kuyulu özel plakasında yapılır. Alınan PCR ürününün 1.8 katı AgenCourt temizleme solüsyonu eklenir ve karışması sağlanır. Plaka 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra mıknatıs özelliğindeki plaka üzerine yerleştirilir. 10 dk bekletilir. Solüsyon içindeki mıknatıs özellikli manyetik toparın PCR ürünü ile birlikte plakaya yapıştığı ve kahverengi halka oluştuğu gözlenir. Oluşan kahverengi alan dışında kalan kısım mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. 200 μL %70'lik etanol eklenir, 30s sonra alkol alınır. Bu işlem 2 kere tekrar

edilir. Oda sıcaklığında manyetik plaka üzerinde alkolün buharlaşması sağlanır. Kuruma sağlandıktan sonra 40µL bidistile su ile sulandırılır. %2'lik jelde sonuçlar incelenir. Bant yoğunluğuna göre DNA dizi analizinde kullanılacak PCR ürünü belirlenir.

3.2.7. DNA Dizi Analizi

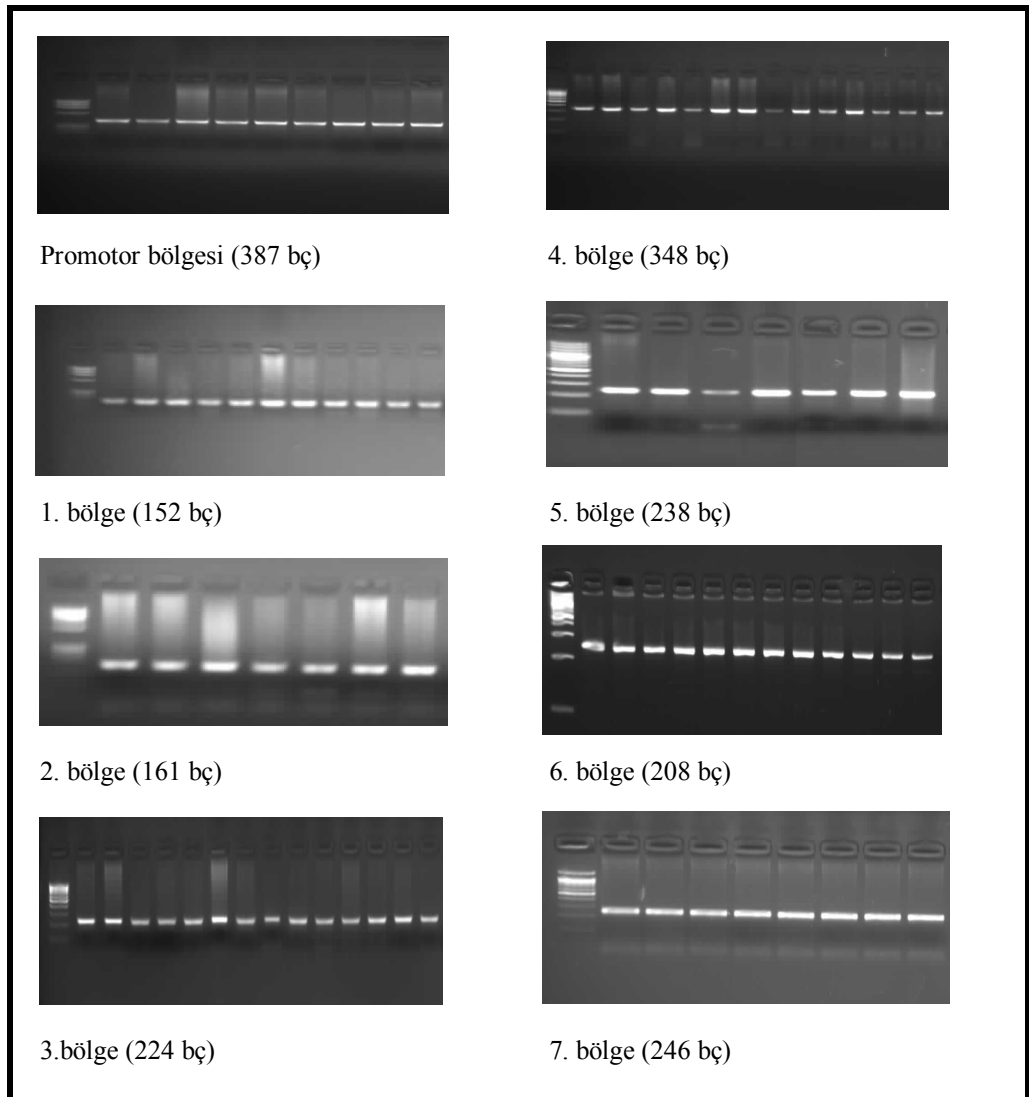
Her bir bölge için birbirinden farkları tespit edilen bant profilleri, nükleotit dizilerinin belirlenmesi için kapiller sistem otomatik sekans cihazı (CEQ800XL, Beckman Coulter, ABD) kullanıldı. DNA dizi analizi için hazırlanan primerlerle yapılan PCR işlemi sonrası pürifikasyon işlemine tabi tutulan örnekler DNA dizi analizine alındı. Bunun için 0,2ml'lik, 96 tane kuyucuk içeren plakalar kullanılıp her bir kuyucuğa 12µl premiks (2µl 10X reaksiyon tamponu, 1µl dNTP karışımı, 2µl ddUTP, 2µl ddGTP, 2µl ddCTP, 2µl ddATP, 1µl polimeraz enzimi), 5µl temizlenmiş PCR ürünü, 20pmol primer konularak "cycle sequencing" işlemi gerçekleştirildi. Bunun için plaka, PCR cihazına (Biometra, Almanya) yerleştirilip 94°C' de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C'de 20s denatürasyon, 50°C'de 20s yapışma ve 60°C' de 4 dk'lık uzama evresi gerçekleştirildi.

"Cycle sequencing" sonlandıktan hemen sonra reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğun dibine 5µl durdurma solüsyonu (1,5 M C2H3O2Na, 50mM EDTA, 20 mg/ml' lik Glikojen) pipetlendi. Örneklerin üzerine 60µl %95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000rpm'de 4 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama işlemi gerçekleştirildi. Üstteki kısım dökülerek %70'lik alkolden 200µl eklenip, +4°C'de 4000rpm'de 2 dk santrifüjlenerek üstteki kısım döküldü. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plak 300rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifüjlenip fazla etanol uzaklaştırıldı. Plate, liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilip ve yüksek vakum altında örnekler kurutuldu. Kuruyan örneklerin üzerine 25µl formamid içeren solüsyondan konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlandı. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plate, DNA dizi analizi cihazına yerleştirildi ve elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software programı kullanılarak dalgalar halinde görünür hale getirildi.

3.3. ARAŞTIRMA BULGULARI:

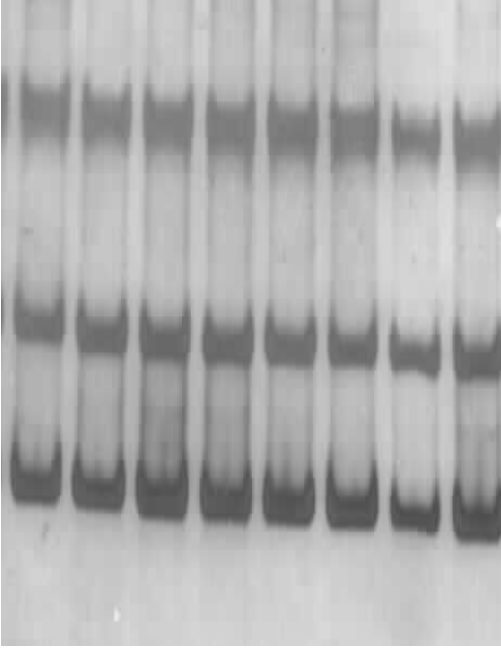
Çalışmamızda inme geçirmiş olan pediatrik yaş grubundan 190 bireyde olası *trombomodulin* gen değişimleri taranmıştır. *Trombomodulin* genine ait bölgeler önce PCR tekniği ile çoğaltılmış, daha sonrada SSCP tekniği ile farklı bant profilleri gözlemlenmeye çalışılmıştır.

3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları:

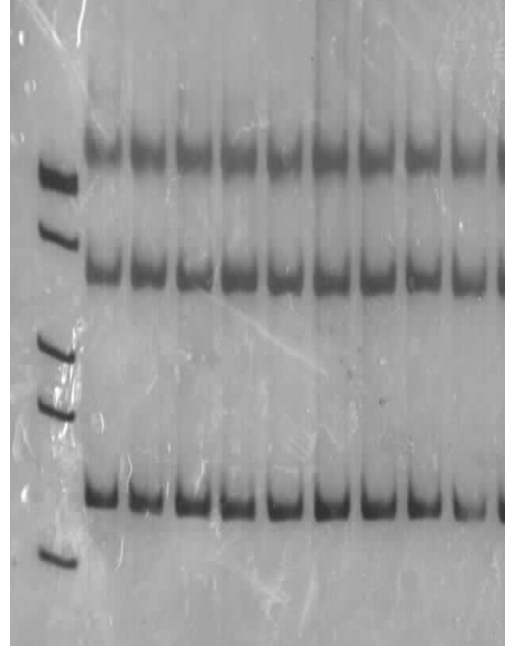


Şekil 2.1. *Trombomodulin* genine ait bölgelerin PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

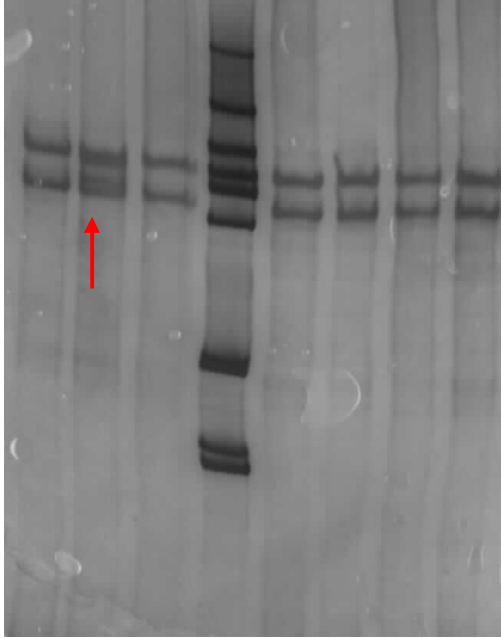
3.3.2. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) Bulguları:



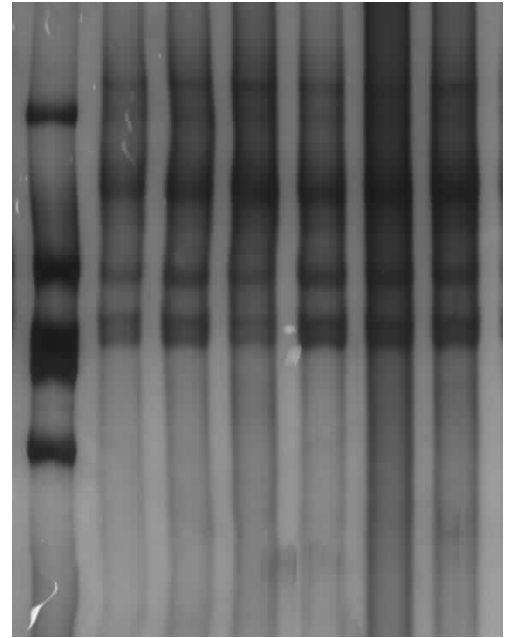
1. bölge SSCP görüntüsü



2. bölge SSCP görüntüsü

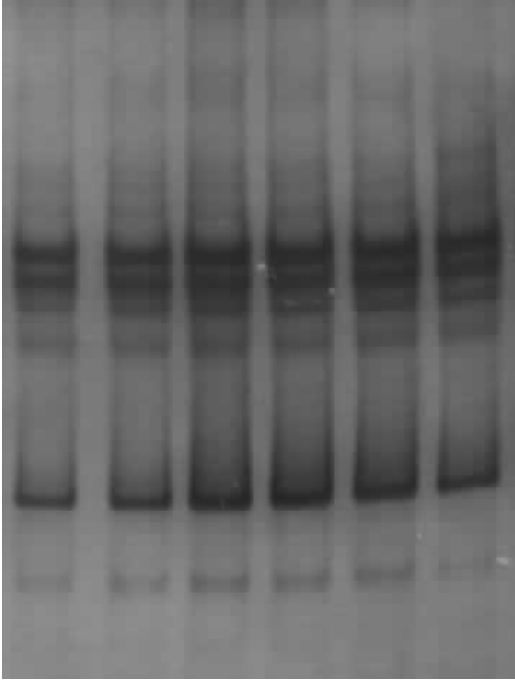


3. bölge SSCP görüntüsü

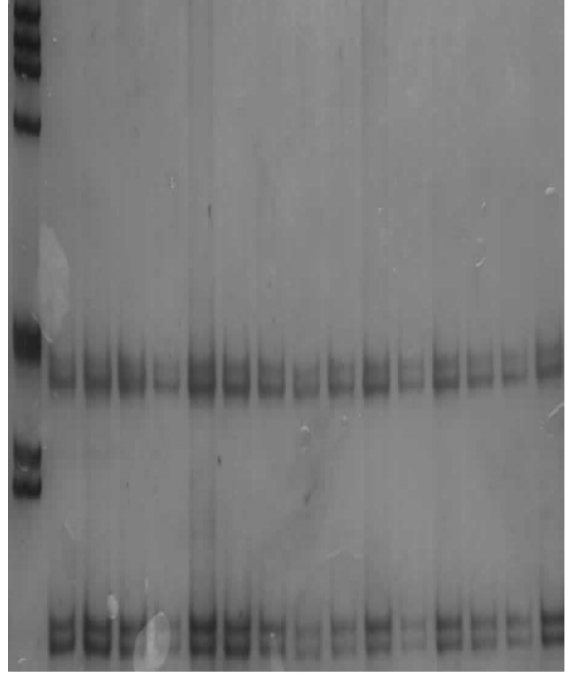


4. bölge SSCP görüntüsü

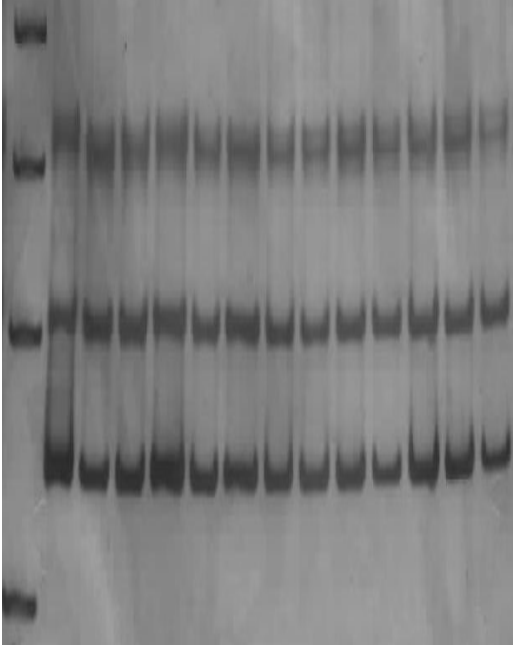
Şekil 2.2. *Trombomodulin* genine ait bölgelerin SSCP görüntüleri (1)



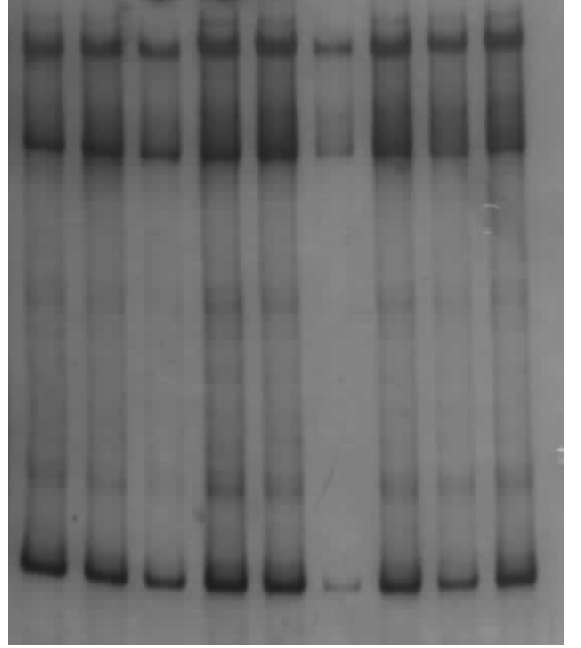
5. bölge SSCP görüntüsü



6. bölge SSCP görüntüsü



7. bölge SSCP görüntüsü



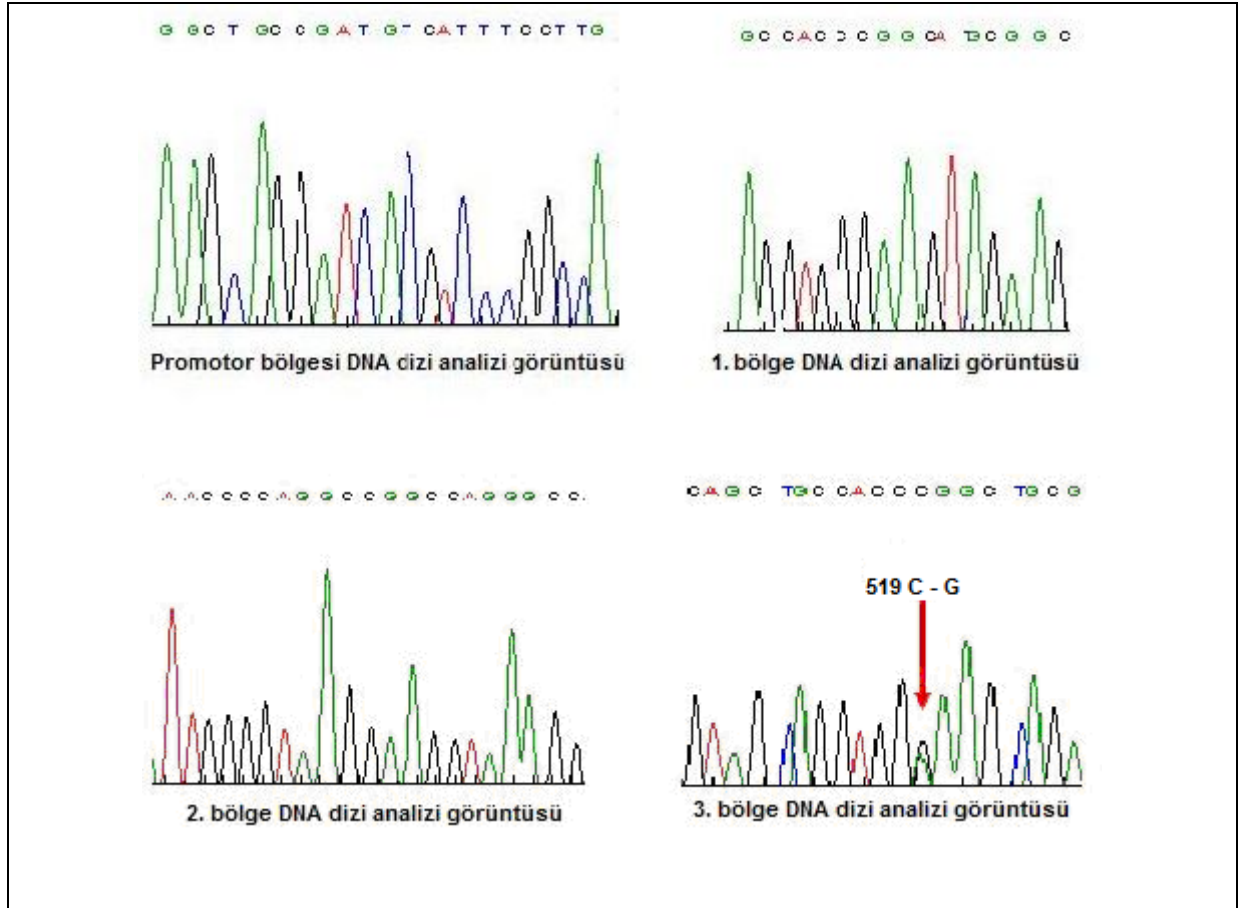
Promotor bölgesi SSCP görüntüsü

Şekil 2.3. *Trombomodulin* genine ait bölgelerin SSCP görüntüleri (2)

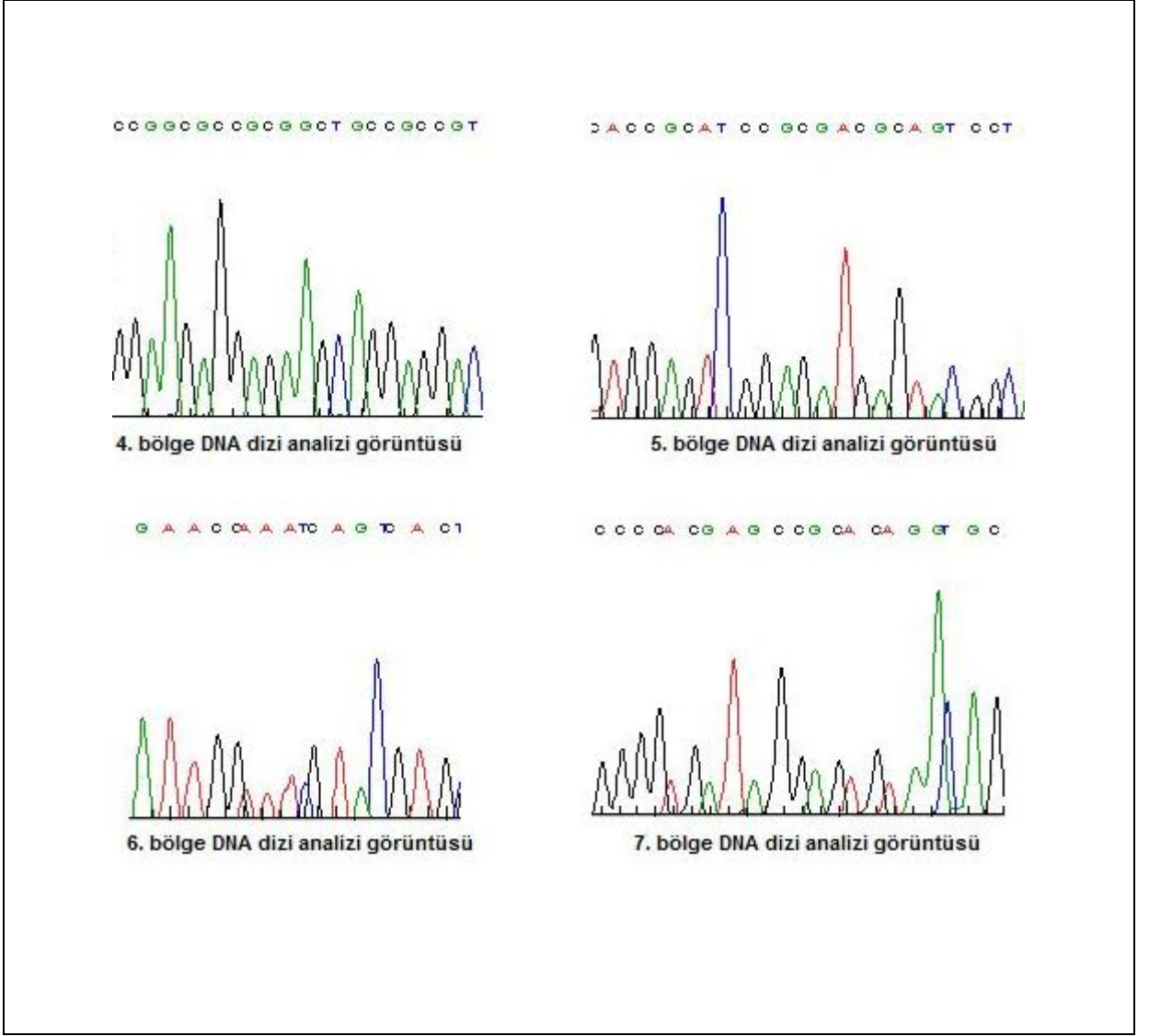
3. Bölgedeki 224 bç'lik bölgenin SSCP tekniği kullanılarak yapılan taraması sonucunda farklı bant profili tespit edilmiştir. Bu profili veren örnek DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan DNA dizi analizi sonuçları, TM geninde taranan bölgeye ait diziyle karşılaştırılarak farklılık olup olmadığına bakılmıştır. Ayrıca diğer bölgelerden de SSCP analizi yapılan örneklerden bazıları DNA dizi analizine tabi tutularak herhangi bir değişimin olmadığı teyit edilmiştir.

3.3.3. DNA Dizi Analizi Bulguları:

Hasta grubumuzun *trombomodulin* genine ait bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra PCR ürünleri, SSCP tekniğine tabi tutulmuş, sonrasında da farklı bant profili veren örneklere DNA dizi analizi tekniği uygulanmıştır.



Şekil 2.4. *Trombomodulin* genine ait bölgelerin DNA dizi analizi görüntüleri (1)



Şekil 2.5. *Trombomodulin* genine ait bölgelerin DNA dizi analizi görüntüleri (2)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Koagülasyon mekanizması; negatif ve pozitif geri besleme reaksiyonları, multienzim sistemleri, humoral ve hücrel prokoagülan ve antikoagülanları içinde barındıran kompleks bir tepkime dizisidir. Koagülasyon ile ilgili bilgilerin geçmişi çok eskilere dayandığı halde; uygulama alanına giren ilk bilgiler üzerine dayanan çalışmalar, farklı boyutları ile günümüzde de çok yoğun bir şekilde devam etmektedir. Koagülasyon, kalp damar hastalıklarının başlıca sorumlusu olarak kabul edilir. Hastalıkların nedenlerinin ortaya konması açısından son yıllarda yapılan genetik çalışmaların sayısı artmıştır.

Trombin, koagülasyon sisteminde koagülan, prokoagülan ve antikoagülan özellikte en önemli proteinlerden biridir. Trombin serin proteazların kimotripsin ailesinin üyesidir. TM, trombinin fibrinojen ve trombosit bağlayıcı bölgelerini maskeleyerek, trombinin bunlar üzerine olan etkilerini bloke eder. Serbest trombin güçlü bir prokoagülan enzimken, TM'e bağlandığı zaman antikoagülan ve antifibrinolitik özellik kazanmaktadır. Vasküler hasara cevapta, koagülasyon kaskadında üretilen serbest trombin pıhtı oluşmasının katalizler. Bu arada oluşan trombin / trombomodulin kompleksi koagülasyon kaskadını inhibe eder. Trombin koagülasyon kaskadının sonunda olduğu için feedback işleminde kritik role sahiptir aynı zamanda hemostasisin meditörlüğünü de yapmaktadır. Dolayısıyla trombinin aktivasyon ve inhibisyonu tüm koagülasyon sistemini etkileyecektir. Fibrinojen, trombinin substratıdır ve fibrin haline çevrildikten sonra da trombine bağlı kalmayı sürdürmektedir. TM gen ablasyonu yapılan farelerdeki deneylerde, canlı doğarlarda kısa zamanda arter ve venlerde yaygın ve spontan koagülopati nedeniyle ölüm görülmüştür (Ermış et al. 2006).

Trombomodulin geninde birçok moleküler genetik çalışma yapılmış ve bazı nükleotid değişimleri tanımlanmıştır. İnsan *trombomodulin* geninin promotor bölgesindeki -33G/A mutasyonu ilk kez Ireland tarafından Asyalılarda, düşük sıklıkta bulunmuştur (Ireland et al. 1997). Ancak yapılan çalışmalara göre -33G/A promotor bölge mutasyonunun koroner ateroskleroz için büyük bir genetik risk faktörü içerdiği anlaşılmıştır (Li et al. 2000).

1995 yılında, 45 yaşında, pulmoner emboli teşhisi konmuş İspanyol bir erkek hastanın *trombomodulin* geninde g.1456G>T mutasyonu bulunmuştur. Bu mutasyon Asp468Tyr değişimini yapmaktadır (Ohlin and Marlar 1995).

TM düzeyleri ve serebrovasküler hastalıklar arasında da ilişki bulunmaktadır. Hemorajik inme ile plazma TM seviyeleri arasında negatif korelasyon olduğu bildirilmiştir (Johansson et al. 2002).

Genin lektin benzeri bölgesindeki a.25A>T polimorfizminde MI riskinin 2 kat arttığı ve bu polimorfizmin diğer ateroskleroz risk faktörleri ile pozitif etkileşim gösterdiği bildirilmiştir. EGF4 kısmındaki Arg385Ser polimorfizmi, TM ekspresyonunun ve aktivitesinin belirgin olarak azalmasına yol açar. MI ve venöz trombozla ilişkisi açısından yoğun olarak araştırılan bir diğer polimorfizm ise EGF 6 kısmındaki Ala455Val polimorfizmidir ve bununla ilgili çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (Wu et al. 2003).

İnsanlarda TM işlevlerinin tamamen kaybına yol açan ilk mutasyon, EGF 2’de bir stop kodonu oluşumuna yol açan 10 baz çiftlik bir delesyon (del791-801) olup bu mutasyonu heterozigot olarak taşıyan bir hastada pulmoner emboli, serebral venöz tromboz ve inme saptanmıştır (Ermiş et al. 2006).

Pediyatrik inmeli 190 bireyin DNA örneklerinin kullanıldığı bu çalışmada; tek ekzon içeren *Trombomodulin* geninin promotör bölgesi ve ilk 1524 baz çiftlik bölge taranmıştır. Çalışmamız sonunda daha önce herhangi bir çalışmada saptanmamış olan c.519C>G değişimine rastlanmıştır. Ancak bu değişim ilgili kodonun şifrelediği Prolin amino asitinde herhangi bir değişiklik meydana getirmemiştir.

Sonuç olarak, trombomodulin geninin çok iyi korunduğu ve pediyatrik inmeli olgularda önem taşımadığı ileri sürülebilir. *Trombomodulin* genindeki olası bir defekt, ateroskleroz riskini

artırmaktadır, çocukluk çağı inmelerinde ateroskleroz olgusu görülmediğinden dolayı çalışma grubumuzda mutasyona rastlanmamış olması normal karşılanabilir.

Ayrıca tek ekzondan oluşan trombomodulin geninin 387 bç'lik promotor bölgesi ve ilk 1524 bç'lik bölgesi mevcut çalışma süremizde ancak taranabilmiştir. Genin devamının da taranması durumunda pediatrik inme ile ilişkilendirilebilir mutasyonlara rastlamak mümkün olabilir.

5. KAYNAKLAR

- Adams HP., Bendixsen BH., et al. (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of ORG10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*, (24): 35-41.
- Akar, N. (1999). Klinik Moleküler Patolojiye Giriş, AÜTF Antip AS Yayınları, 508 sayfa, Ankara.
- Akar N., Arsan S., et al. (2005). *Pediyatrik İnme*. Ankara: Çocuk Hastalıkları Araştırma Vakfı, 13.
- Andrew M., Monagle PT., et al. (2000). Thromboembolic complications during infancy and childhood. Hamilton, B.C. Decker Inc., 201 – 229.
- Baltacıoğlu F., Afşar N., et al. (2003). Akut iskemik inme tedavisinde lokal intraarteriyel tromboliz: teknik ve klinik sonuçlar *Tanısal ve Girişimsel Radyoloji* 9: 229-239.
- Bamford J., Sandcock P., et al. (1991). Classification and natural history clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet*; 337: 1521–26.
- Bayır A. and Ak A. (2003) Acil olgularda trombolitik tedavi. *Genel Tıp Dergisi*;13(2):81-88.
- Bilguvar K., Yasuno K., et al. (2008). Susceptibility Loci For Intracranial Aneurysm In European And Japanese Populations. *Nat Genet.* 40(12):1472-7.
- Broze GJ Jr. (1992) The role of tissue factor pathway inhibitor in a revised coagulation cascade. *Semin Hematol*; 29: 159-169.
- Eigenbrot, C. (2002). "Structure, function, and activation of coagulation factor VII." *Curr Protein Pept Sci* 3(3): 287-99.
- Emre U., Ergün U., et al. (2003). İnme epidemiyolojisi ve risk faktörleri. *Türk Nöroloji Dergisi.* 9: 141–8.
- Ermiş T., Turgan N., et al. (2006). Trombomodulin. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*; 4(1): 39 – 48.
- Esmon CT. (2005). The interactions between inflammation and coagulation. *British Journal of Haematology*; 131: 417-430.
- Esmon CT. (1996). Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *The FASEB Journal*; 9: 946 – 955.
- Futrell N. and Millikan CH. (1996). Stroke is an emergency. *Dis Mon.* 42: 199-264.

- Ganıdağlı S. and Gedik R. (2008).Yoğun bakımda koagulasyon. Tıp Araştırmaları Dergisi: 6 (1) :36 -44.
- Goodnight SH. and Hathaway WE. (2001). Disorders of Hemostasis & Thrombosis: A Clinical Guide. Third edition. New York: Mc Graw-Hill, Inc. 15- 29.
- Ireland H., Kunz G., et al. (1997). Thrombomodulin gene mutations associated with myocardial infarction. Circulation. 96:15–8.
- James C., Fredenburgh., et al. (2004). Modes and consequences of thrombin’s interaction with fibrin. Biophysical Chemistry. 112: 277-284.
- Johansson L., Jansson JH., et al. (2002). Prospective study on soluble thrombomodulin and von Willebrand factor and the risk of ischemic and hemorrhagic stroke. Thromb Haemost. 87: 211-7.
- Kayaalp O. (1990). Koagulasyon ve hemostaz. Tıbbi Farmakoloji, Cilt 2, 5. baskı s.1353-1421.
- Koagulasyonun ABC’si: Protein C. Türk Hematoloji Derneği 6. İlk Basamak Kursu 2007.
- Kumada T., Dittman WA., et al. (1988). A role for thrombomodulin in the pathogenesis of thrombininduced thromboembolism in mice. Blood. 71(3): 728-733.
- Kumral K. and Kumral E. (1993). Santral Sinir Sisteminin Damarsal Hastalıkları. Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Yayınları No:72 4-446.
- Li YH, Chen JH., et al. (2000). G-33A mutation in the promoter region of thrombomodulin gene and its association with coronary artery disease and plasma soluble thrombomodulin levels. Am J Cardiol. 85: 8–12.
- Maxam AM. and Gilbert W. (1992). A New Method for Sequencing DNA Natl. Acad. Sci. USA.
- Mosesson MW. (1997).Fibrinogen and fibrin polymerization. Appraisal of the binding events that accompany fibrin generation and fibrin generation and fibrin clot assembly. Blood Coagul Fibrinolysis. 8: 257-267.
- Ohlin AK. and Marlar RA. (1995). The first mutation identified in the thrombomodulin gene in a 45-year – old man presenting with thromboembolic disease. Blood. 85: 330-336.
- Öner, C. (2002). Genetik Kavramlar. Ankara, Palme Yayıncılık.
- Özdemir G., and Özbabalık D. (2005). İnteraserebral hemoraji. Balkan S (Editör). Serebrovasküler hastalıklar’da. Ankara: Güneş Kitabevi. s.167-79.
- Öztürk Ş. (2005). İnmede biyolojik ve elektrofizyolojik tanı özellikleri. Balkan S (Editör). Serebrovasküler Hastalıklar’da. Ankara: Güneş Kitabevi. s.263-88.

- Sambrook, J., Fritsch E.F. et al. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*(2nd Ed.). ISBN 0-87969-309-6.
- Sanger F. (2004). Determination of nucleotide sequences in DNA. *Biosci Rep.* 24 (4-5); 237-53.
- Sarıbaşı O., Topçuoğlu MA. et al. (2005). Akut iskemik inmede tedavi yaklaşımları. *Balkan S (Editör). Serebrovasküler Hastalıklar'da.* Ankara: Güneş Kitabevi. s.289-311.
- Shinkawa A., Veda K. et al. (1988). Seasonal Variation in Incidence In Hisayama, Japan. *Stroke.* 21: 1262-1267.
- Swaiman KF. and Ashwal S. (1999). *Pediatric Neurology, Principles and Practice,* St. Louis Mosby, 1099 – 1124.
- Thorvaldsen P., Asplund K. et al. (1995). Stroke incidence, case fatality and mortality in the Who Monica Project. *World Health Organisation Monitoring Trends And Determinants In Cardiovascular Disease.* *Stroke.* 26: 361 – 367.
- Utku U. and Çelik Y. (2005). Strokta Etyoloji, Sınıflandırma ve Risk Faktörleri. *Balkan S (Editör). Serebrovasküler Hastalıklar'da.* Ankara Güneş Kitabevi. 57-72.
- Wachtfogel YT., DeLa Cadena RA. et al. (1993). Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contract system. *Thromb Res.* 72:1-21.
- Weiler H. and Iserman BH. (2003). Thrombomodulin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 1: 1515-24.
- Weitz, J. I. (1997). Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med* 337(10): 688-98.
- Wu KK., Aleksic N. et al. (2003). Interaction between soluble thrombomodulin and intercellular adhesion molecule-1 in predicting risk of coronary heart disease. *107(13):* 1729-32.

<http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/anestezinot/yogun.htm>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hamit Emre KIZIL

Doğum Yeri : Erzurum / Türkiye

Doğum Tarihi : 06.11.1983

Yabancı Dili : İngilizce

e - mail: emrekizil25@gmail.com

EĞİTİM DURUMU

2002/2007 Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü

1998/2001 Özel Aziziye Koleji

1994/1998 Özel Aziziye Koleji

KONGRELER

I. Prof. Dr. Orhan ULUTİN Trombogenetik Sempozyumu, İstanbul, 2009

6. Ankara Biyoteknoloji Günleri, Ankara, 2007

Gen Ekspresyonu Semineri, Prof. Dr. İrfan Küfrevioğlu, Atatürk Üniversitesi Kimya Bölümü, Erzurum, 2007